

ARTIKEL PENELITIAN

## Identifikasi virus herpes simpleks pada anak dengan ensefalitis: sebuah studi pendahuluan

Rahmi Lestari<sup>1</sup>, Andani Eka Putra<sup>2</sup>

1. Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Andalas; 2. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

**Korespondensi:** Rahmi Lestari, email: [rahmilestari@yahoo.com](mailto:rahmilestari@yahoo.com)

### Abstrak

Ensefalitis Herpes simpleks merupakan salah satu penyebab infeksi virus yang paling berat pada otak manusia. Tanpa terapi yang adekuat mortalitas mencapai 70% dan sebagian besar dari pasien yang bertahan hidup akan menderita sekuele neurologis berat. Data tentang prevalensi dan proporsi Herpes simpleks ensefalitis pada anak di Indonesia belum tersedia. **Tujuan:** Untuk menentukan proporsi ensefalitis Herpes simpleks pada anak dengan ensefalitis di RSUP M. Djamil Padang. **Metode:** Penelitian dilaksanakan di Instalasi Rawat Inap Anak RSUP M. Djamil Padang dari bulan Agustus hingga Desember 2016. Ensefalitis didefinisikan menurut konsensus *International Encephalitis Consortium*. Variabel yang dicatat meliputi usia, jenis kelamin, manifestasi klinis, dan luaran. Subjek dikatakan menderita ensefalitis Herpes simpleks bila hasil pemeriksaan *polymerase chain reaction* Herpes simpleks pada cairan serebro spinal memberikan hasil positif. Sebanyak empat belas orang anak memenuhi kriteria inklusi selama periode penelitian. **Hasil:** Manifestasi klinis yang paling sering ditemukan adalah demam, kejang, dan penurunan kesadaran. Sebagian besar subjek pulang dengan sekuele. Tidak ada virus Herpes simpleks yang ditemukan pada pemeriksaan PCR terhadap cairan serebrospinal. **Kesimpulan:** Tidak ada ensefalitis Herpes simpleks yang teridentifikasi pada penelitian ini. Dibutuhkan studi lebih lanjut dengan subjek yang lebih besar dan periode penelitian yang lebih panjang untuk mendapatkan gambaran besarnya masalah ensefalitis Herpes simpleks pada anak di Indonesia.

**Kata kunci:** ensefalitis; herpes simpleks; insiden

### Abstract

*Herpes simplex encephalitis is one of the most severe cause of viral infection affected human brain. The diagnostic modality become very important since without appropriate therapy, the mortality is up to 70 % with the long-term neurology sequelae in most of the survivals. No data is available about the prevalence of Herpes simplex encephalitis in Indonesia. Objective: To determine the proportion of Herpes simplex encephalitis among children with encephalitis in M Djamil Hospital, Padang. Method: This was a descriptive prospective study conducted in pediatric ward of M Djamil Hospital from August to December 2016. Encephalitis was defined according to the International Encephalitis Consortium consensus statement. Age, sex, clinical manifestation and outcome were recorded. Herpes simplex encephalitis was diagnosed if the polymerase chain reaction of the cerebrospinal fluid gave positive result for Herpes simplex virus. Fourteen subjects fulfilled the inclusion criteria during the study period. Result: Most of subjects came with fever, seizure, and decrease of consciousness. Most subjects left the hospital with sequelae. No Herpes simplex virus was identified in cerebrospinal fluid on PCR examination. Conclusion: No Herpes simplex encephalitis was identified in this study. Future research with larger number of subjects and longer duration of study period was extremely needed.*

**Keywords:** herpes simplex; encephalitis; incidence

## PENDAHULUAN

Ensefalitis merupakan sindrom neurologi kompleks akibat proses inflamasi pada parenkim otak. Manajemen ensefalitis merupakan tantangan tersendiri mengingat cepatnya progresivitas penyakit dan kebutuhan akan perawatan intensif. Terdapat variasi presentasi yang luas dengan banyaknya kemungkinan agen etiologi. Dokter yang menangani anak yang sakit akut mesti paham bagaimana menangani seorang anak yang dicurigai menderita ensefalitis mengingat beberapa agen penyebab akan berespons terhadap pengobatan spesifik dan keterlambatan diagnosis dapat berakibat fatal.<sup>1,2</sup>

Infeksi Herpes simpleks pada susunan syaraf pusat merupakan salah satu dari infeksi virus paling berat pada otak manusia. Insidennya berkisar antara 1 dalam 250.000 hingga 500.000 penduduk per tahun. Sebelum era *West Nile Encephalitis*, ensefalitis Herpes simpleks mencapai 10% hingga 20% dari ensefalitis virus di Amerika. Tanpa pemberian anti virus yang adekuat angka kematian mencapai 70% dengan hanya 9% dari pasien yang selamat bisa kembali berfungsi normal setelah sakit.<sup>3,4</sup>

Mengingat fatalnya akibat yang ditimbulkan, berbagai konsensus dan *guideline* sepakat bahwa anak yang dicurigai menderita ensefalitis mesti segera mendapatkan acyclovir intra vena bila hasil investigasi awal cairan serebro spinal (CSS) dan pencitraan mendukung ke arah ensefalitis virus. Bahkan meskipun

hasil pemeriksaan mikroskopi awal CSS maupun pencitraan normal, acyclovir tetap mesti diberikan dalam 6 jam pertama rawatan bila terdapat kecurigaan klinis ke arah ensefalitis Herpes simpleks sambil menunggu hasil konfirmasi diagnosis lebih lanjut.<sup>1,2</sup>

Di luar negeri hal ini tidaklah terlalu menjadi masalah mengingat pemeriksaan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) virus Herpes simpleks pada CSS yang merupakan baku emas untuk diagnosis tersedia luas. 3-5 Sementara di Indonesia, pemeriksaan PCR Herpes simpleks pada CSS belum merupakan pemeriksaan rutin yang selalu tersedia di rumah sakit. Pemberian terapi anti virus spesifik tanpa bukti diagnosis yang kuat juga merupakan problem tersendiri mengingat obat ini sangat mahal dan juga tidak termasuk ke dalam Formularium Nasional.

Hingga saat ini data tentang insiden ensefalitis Herpes simpleks pada anak di Indonesia sangat langka. Di Padang sendiri belum ada data tentang frekuensi kejadian maupun luaran ensefalitis Herpes simpleks akibat terkendala pemeriksaan PCR Herpes simpleks untuk konfirmasi diagnosis. Penelitian ini bermaksud mengetahui insiden, tipe virus, gejala klinis, dan luaran ensefalitis Herpes simpleks pada anak dengan ensefalitis yang dirawat di Rumah Sakit M. Djamil yang merupakan rumah sakit rujukan tersier di Sumatera Barat dan sekitarnya.

## METODE

Penelitian ini bersifat prospektif dan deskriptif. Penelitian dilaksanakan di Instalasi Rawat Inap Anak RSUP M. Djamil Padang dari bulan Agustus hingga Desember 2016. Semua pasien ensefalitis yang dirawat pada periode tersebut diambil sebagai subjek. Kriteria inklusi adalah persetujuan orang tua (*informed consent*) dan keadaan pasien yang memungkinkan untuk tindakan pungsi lumbal.

Ensefalitis didefinisikan menurut konsensus dari *International Encephalitis Consortium*, yaitu anak dengan:<sup>17</sup>

1. Ensefalopati (ditemukannya beberapa atau semua dari gambaran berikut: gangguan kesadaran, gangguan kognitif, perubahan perilaku, letargi; berlangsung lebih dari 24 jam).
2. Disertai dengan dua atau lebih dari kriteria berikut:
  - a. Demam atau riwayat demam ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) dalam 72 jam sebelum atau sesudah presentasi.
  - b. Kejang umum atau parsial yang bukan disebabkan oleh kelainan yang sudah ada sebelumnya.
  - c. Pleositosis CSS ( $\geq 5$  leukosit/ $\mu\text{l}$ ).
  - d. Onset baru dari defisit neurologi fokal.
  - e. Pencitraan abnormal yang mendukung ke arah ensefalitis.
  - f. Abnormalitas EEG yang konsisten dengan ensefalitis dan bukan berhubungan dengan penyebab lain.

3. Dan tidak ada diagnosis atau penyebab alternatif lain yang teridentifikasi

Dilakukan pencatatan data karakteristik subjek meliputi usia dan jenis kelamin. Dicatat pula gejala klinis yang terkait dengan kejadian ensefalitis (demam, kejang, perubahan status mental, penurunan kesadaran, defisit neurologi fokal seperti afasia dan hemiparesis), maupun gejala penyerta. Luaran adalah keadaan pasien saat keluar rumah sakit (normal, sekuele, meninggal dunia).

Subjek dikatakan menderita ensefalitis Herpes simpleks bila hasil pemeriksaan PCR Herpes simpleks pada cairan serebro spinal memberikan hasil positif.

### Pengambilan sampel CSS

Pungsi lumbal dilakukan pada L4-5 atau L3-4 dengan posisi pasien berbaring pada satu sisi. CSS diambil sebanyak 2 cc untuk pemeriksaan rutin di rumah sakit (Nonne, Pandy, mikroskopik, glukosa) dan untuk PCR Herpes simpleks di Laboratorium Biomolekular Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unand.

### Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan Purelink DNA kit (invitrogen) terhadap 100  $\mu\text{l}$  LCS. Tahapan kerja terdiri dari lisis sel, binding dengan spin column, washing dan elusi menggunakan *purelink elution buffer*. Pada akhir prosedur didapatkan 50–100  $\mu\text{l}$  DNA.

### Primer dan PCR Amplifikasi

Primer ditujukan terhadap posisi DNA polimerase virus Herpes simpleks (VHS)<sup>7</sup>

yang terdiri dari 4 tipe virus, yaitu: VHS 1, VHS 2, VHS 3, dan VHS 4.

PCR dilakukan 35 siklus, dengan suhu denaturasi awal 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 46°C selama 60 detik, dan ekstensi 72°C selama 60 detik dilanjutkan dengan ekstensi final 72°C selama 3 menit.

### Visualisasi

Visualisasi dilakukan menggunakan gel red (Biotium) menggunakan agarose 0.8% dalam TBE 45 mM.

Semua pemeriksaan, pengobatan suportif, maupun prosedur tindakan lainnya diperlakukan sama seperti kasus-kasus ensefalitis sebelumnya sesuai standar yang berlaku di rumah sakit. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Kaji Etik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas maupun orang tua pasien.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 23 pasien yang dirawat dengan ensefalitis selama periode penelitian, 14 orang pasien memenuhi kriteria inklusi. Sebanyak 6 pasien datang dalam keadaan penurunan kesadaran sangat berat, syok, gagal nafas, atau sepsis berat dan meninggal dalam beberapa jam rawatan. Dua orang pasien membutuhkan topangan inotropik dan ventilator jangka panjang sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan pungsi lumbal. Satu orang pasien lagi menolak pungsi lumbal dan pulang atas permintaan sendiri pada 1 hari rawatan karena alasan keluarga.

Empat belas pasien yang memenuhi kriteria inklusi terdiri atas 8 orang perempuan dan 6 orang laki-laki. Rentang usia berkisar antara 4 bulan hingga 11 tahun.

**Tabel 1.** Karakteristik Pasien.

Subjek	Usia	Jenis Kelamin
1	4 th 11 bl	L
2	8 bulan	L
3	19 bulan	P
4	2 bulan	L
5	4 th 4 bl	L
6	3 th 6 bl	P
7	9 th	P
8	4 th 10 bl	L
9	11 tahun	P
10	7 th	P
11	11 th	L
12	7 thn	P
13	1 th 10 bl	P
14	8 th 9 bl	P

### Manifestasi Klinis

Ensefalitis harus dicurigai pada anak yang datang dengan kombinasi gejala yang berkaitan dengan gangguan neurologis (misalnya penurunan kesadaran, kejang, sakit kepala, atau tanda neurologis lokal) bersamaan dengan tanda-tanda infeksi (misalnya demam, ruam, tanda infeksi lokal). Ensefalitis juga perlu dipertimbangkan pada perubahan kronis dari tanda dan gejala neurologis dan pada anak dengan ensefalopati tanpa demam.<sup>6,8,9</sup>

Adapun gejala klinis dari ensefalitis herpes simpleks (EHS) berupa perubahan kesadaran, demam, sakit kepala, perubahan perilaku, kejang, muntah, hemiparesis dan hilangnya daya ingat. Pada saat dibawa biasanya kita dapat menemukan adanya demam, perubahan

perilaku, disfasia, gangguan otonom, ataksia, hemiparesis, kejang, gangguan nervus kranial, hilangnya lapangan pandang atau terdapat edema papil.<sup>3</sup>

Pada penelitian ini semua pasien mengeluhkan adanya demam. Kejang juga

hampir selalu didapatkan, baik yang bersifat umum, fokal maupun keduanya. Selain itu terdapat penurunan kesadaran, hemiparesis, gerakan involunter, afasia, gangguan koordinasi, serta gejala penyerta berupa muntah, nyeri kepala, batuk, sesak nafas, dan berak-berak encer.

**Tabel 2.** Manifestasi Klinis Pasien Ensefalitis.

Subjek	Demam	Kejang	Parese	Afasia	Gerakan Involunter	Gangguan Perilaku	Gangguan Koordinasi
1	+	Fokal, Umum	+	-	+	-	-
2	+	Umum	-	-	-	-	-
3	+	Umum	-	-	-	-	-
4	+	Umum	-	-	-	-	-
5	+	Umum	-	-	-	-	-
6	+	Kejang, Umum	-	-	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-	-
8	+	Fokal, Umum	+	-	+	-	-
9	+	Umum	-	-	-	-	-
10	+	-	-	+	-	-	+
11	+	Fokal, Umum	+	-	-	-	-
12	+	Fokal	-	+	-	-	-
13	+	Fokal, Umum	-	-	-	-	-
14	+	Fokal	-	-	-	-	-

### Pemeriksaan Penunjang

Analisis CSS penting untuk menentukan ada tidaknya inflamasi dan menetapkan etiologi penyebab. Pungsi lumbal harus dilakukan sesegera mungkin, idealnya saat gejala muncul. Pleositosis LCS ( $\geq 5$  leukosit/mm<sup>3</sup>) sering ditemukan pada kasus ensefalitis namun bisa saja tidak ditemukan pada fase awal penyakit. Predominan sel PMN dapat muncul pada ensefalitis virus, diikuti dengan pergeseran mononuklear 24 sampai 48 jam setelahnya. Limfositosis CSS terjadi pada

ensefalitis virus, listeria, dan tuberkulosis (TB). Hitung protein CSS hasilnya dapat normal atau meningkat pada ensefalitis virus, sedikit meningkat pada ensefalitis bakterialis, dan sangat meningkat pada TB.<sup>10-12</sup>

Pada penelitian ini ditemukan CSS yang jernih dengan jumlah sel bervariasi antara 1 sampai 37 sel per mm<sup>3</sup>, sedangkan hitung protein tidak bisa dilakukan karena keterbatasan fasilitas laboratorium di rumah sakit. Tidak didapatkan pertumbuhan kuman pada kultur CSS.

EEG berguna dalam menilai keterlibatan otak pada stadium awal ensefalitis, khususnya pada anak yang tidak jelas apakah gejala tersebut akibat kelainan organik atau psikiatri. EEG juga dapat membantu mengidentifikasi kejang sub-klinis atau status non-konvulsif. *Periodic lateralising epileptiform discharge* pada hari ke 5-10 penyakit yang muncul akibat HSV-1 atau perlambatan fokal di daerah temporal atau frontotemporal dapat ditemukan pada ensefalitis Herpes simpleks. Namun lebih sering EEG hanya memperlihatkan perlambatan umum yang tidak spesifik dan menunjukkan disfungsi otak menyeluruh.<sup>8,9</sup> Meskipun sebagian subjek menunjukkan kejang fokal ataupun defisit neurologi fokal, namun pada penelitian ini tidak didapatkan gambaran *Periodic lateralising epileptiform discharge* yang khas untuk ensefalitis Herpes simpleks.

CT scan kepala lebih mudah didapatkan dan dapat mengeksklusikan diagnosis banding yang muncul dengan gejala demam, khususnya apabila dengan menggunakan kontras. Namun MRI lebih sensitif dibandingkan dengan CT scan untuk menentukan ensefalitis. MRI merupakan modalitas pilihan dan harus dilakukan idealnya dalam 48 jam setelah munculnya gejala untuk mendapatkan diagnosis dan tatalaksana dini.

Secara umum *neuroimaging* digunakan untuk: i) mengeksklusikan diagnosis banding (misalnya lesi pada ruang intrakranial, stroke), ii) menunjukkan inflamasi otak dan komplikasi yang terjadi

(misalnya herniasi serebral). Temuan MRI spesifik dapat mengindikasikan etiologi tertentu seperti keterlibatan lobus temporal pada infeksi virus Herpes simpleks, demyelinasi pada *Acute Disseminated Encephalomyelitis* (ADEM), dan vaskulitis pembuluh darah besar pada re-aktivasi *Varicella Zoster Virus* (VZV).<sup>5,12,13</sup>

Gambaran CT Scan dan MRI pada pasien penelitian ini tidak menunjukkan khas adanya infeksi virus, kebanyakan ditemukan gambaran CT yang normal, edema serebri maupun brain atrofi.

### Luaran

Satu orang pasien pada penelitian ini dirawat kurang dari 24 jam dan meninggal karena syok sepsis. Satu orang pasien lagi sempat mengalami perbaikan kesadaran namun kemudian juga meninggal karena sepsis. Dalam *follow up* selanjutnya sebagian subjek sembuh sempurna dan sebagian lagi mengalami sekuele berupa spastisitas, gerakan involunter, hemiparesis, dan afasia.

**Tabel 3.** Luaran Pasien.

Subjek	Sembuh	Sekuele	Meninggal
1		V	
2	V		
3		V	
4			V
5			V
6		V	
7		V	
8		V	
9	V		
10		V	
11	V		
12	V		
13	V		
14	V		



Perkiraan luaran dari ensefalitis beragam bergantung pada patogen, status imunologis *host*, tingkat pelayanan kesehatan dan efek bias perlakuan yang berbeda pada setiap individu. Penelitian terbaru menunjukkan data dari beberapa penelitian mengenai ensefalitis di Eropa, Amerika Utara dan Asia selama 24 tahun. Pada *review* tersebut, perkiraan mortalitas 0-29% dan sekuele neurologis berkisar 10-67%.<sup>12</sup> Pada ensefalitis akibat *M. pneumoniae*, angka sekuele neurologis berkisar 48-64%.<sup>14</sup> Pada akhirnya, prognosis ensefalitis anak sangat ditentukan oleh etiologi.

### PCR Herpes Simpleks

Sejak berkembangnya pemeriksaan PCR, diagnosis infeksi susunan syaraf pusat telah menjadi lebih sensitif dan spesifik. PCR telah menjadi baku emas diagnosis ensefalitis Herpes simpleks. PCR mampu mendeteksi kuantitas DNA atau RNA virus yang terdapat pada cairan atau jaringan tubuh dengan mengamplifikasi asam nukleat dalam waktu singkat.

Dari semua subjek penelitian, tidak teridentifikasi adanya virus Herpes simpleks pada pemeriksaan PCR terhadap cairan serebrospinal. Adapun sensitivitas dan spesifisitas PCR itu sendiri dilaporkan melebihi 95% dengan nilai duga positif dan negatif berturut-turut 95% dan 98% bila dibandingkan dengan biopsi otak.<sup>15</sup>

Terdapat beberapa laporan tentang hasil PCR Herpes simpleks yang negatif pada kasus yang kemudian terbukti menderita ensefalitis Herpes simpleks.<sup>16,17</sup> Namun

kasus-kasus tersebut menunjukkan gejala klinis yang khas, dengan *imaging* dan EEG yang mendukung ke arah ensefalitis Herpes simpleks. Sedangkan pada penelitian ini tidak didapatkan gambaran *imaging* maupun EEG yang khas untuk ensefalitis Herpes simpleks. Sebagian besar pasien juga mengalami kesembuhan tanpa sekuele berat; suatu hal yang sangat jarang bisa ditemukan pada pasien ensefalitis Herpes simpleks tanpa terapi acyclovir yang adekuat.

Faktor-faktor yang diduga dapat memberikan hasil PCR yang negatif pada kasus ensefalitis Herpes simpleks antara lain: pengiriman sampel pada awal perjalanan penyakit (hari 1-4), volume cairan CSS yang terlalu sedikit, dan *viral load* yang terlalu rendah. Namun sebagian ahli meragukan peranan *viral load* ini dengan pertimbangan amplifikasi memungkinkan deteksi virus hingga serendah 10 kopi.<sup>18-20</sup>

Di samping itu, jumlah sel CSS yang sedikit, variasi primer yang digunakan, pengenceran sampel, dan lokasi infeksi pada susunan syaraf pusat merupakan faktor-faktor yang diduga dapat menyebabkan hasil negatif palsu.<sup>19,21,22</sup> Karena itu Denes et al merekomendasikan pemeriksaan ulang PCR setelah 4 hari perjalanan penyakit sebelum menghentikan terapi acyclovir secara dini pada kasus yang secara klinis sangat dicurigai ensefalitis Herpes simpleks.<sup>23</sup>

Mengingat Rumah Sakit M. Djamil merupakan rumah sakit rujukan tersier tipe A untuk daerah Sumatera Barat dan

sekitarnya, maka sebagian besar pasien datang setelah dirawat dulu di rumah sakit lain. Dengan demikian sampel CSS yang dikirim untuk pemeriksaan PCR tidaklah terlalu dini pada awal perjalanan penyakit. Sebagian besar menjalani pungsi lumbal setelah lewat dua hari onset penyakit, bahkan ada yang sudah mendapatkan perawatan hampir seminggu di rumah sakit sebelumnya. Ini dapat menyingkirkan kemungkinan negatif palsu akibat *viral load* yang masih rendah pada awal onset ensefalitis. Di samping itu, jumlah sampel CSS yang dikirim juga sesuai standar sehingga hasil negatif yang didapatkan bukanlah akibat kekurangan volume sampel.

Laporan proporsi kejadian ensefalitis Herpes simpleks sendiri di literatur dunia sangat bervariasi mulai dari 1% hingga 30% dari kasus ensefalitis pada anak.<sup>24,25</sup> Terlepas dari singkatnya waktu penelitian, ini merupakan studi pertama di Indonesia yang berusaha mengidentifikasi besarnya kejadian ensefalitis Herpes simpleks pada anak berdasarkan pemeriksaan PCR cairan serebrospinal. Tidak ditemukannya hasil pemeriksaan PCR yang positif bukan berarti kejadian ensefalitis Herpes sangat langka di

Sumatera Barat atau Indonesia pada umumnya. Diharapkan studi pendahuluan ini dapat dilanjutkan untuk mendapatkan gambaran yang lebih tepat mengenai besarnya kejadian ensefalitis herpes simpleks pada anak di Indonesia. Dengan periode penelitian yang lebih lama dengan sendirinya subjek yang terkumpul akan lebih besar sehingga nantinya juga dapat dilihat hubungan antara hasil PCR Herpes simpleks pada CSS dengan gejala klinis dan luaran ensefalitis pada anak.

## KESIMPULAN

Tidak ada ensefalitis Herpes simpleks yang teridentifikasi pada penelitian ini. Dibutuhkan studi lebih lanjut dengan subjek yang lebih besar dan periode penelitian yang lebih panjang untuk mendapatkan gambaran insiden ensefalitis Herpes simpleks pada anak di Indonesia berikut gambaran klinis dan luarannya.

## DUKUNGAN FINANSIAL

Penelitian ini dibiayai oleh dana PNPB Universitas Andalas tahun 2016 nomor 75/BBPT/PNK-FK-Unand-2-16.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Britton PN, Eastwood K, Paterson B, Gurrheim DN, Dale RC, Cheng AC. Consensus guidelines for the investigation and management of encephalitis in adults and children in Australia and new Zealand. *Internal Medicine Journal* 2015; 45:563-576.
2. Kneen CR, Michael BD, Menson E, Mehta B, Easton A, Hemingway C. Management of suspected viral encephalitis in children – Cassociation of British Neurologists and british Paediatric Allergy Immunology and Infection Group National Guidelines. *J Infect* 2012; 64:449-477.



3. Whitley RJ, Kimberlin DW. Herpes simplex: encephalitis children and adolescents. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16:17-23.
4. Whitley J. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Research* 2006; 71:141-148.
5. Bale JF. Viral infection of the nervous system. In: Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM, Schor NF. *Swaiman's pediatric neurology*. 5th edition. London: Saunders. 2012; p.1262-1290.
6. Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, et al. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin Infect Dis* 2013; 57: 1114-28.
7. VanDevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz E, Coulter S, Garber RL, Rose TM. Detection and analysis of diverse Herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiology* 1996;34:1666-71.
8. Granerod J, Cousens S, Davies NWS, Crowcroft NS, Thomas SL. New estimates of incidence of encephalitis in England. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1455-62.
9. Pusponegoro HD. Ensefalitis herpes simplex pada anak. *Sari Pediatri*. 2000;77:77-81.
10. De Tiege X, Heron B, Lebon P, Ponsot G, Rozenberg F. Limits of early diagnosis of herpes simplex encephalitis in children: a retrospective study of 38 cases. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1335-9.
11. Solomon T, Hart IJ, Beeching NJ. Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol* 2007; 7:288-305.
12. Nigrovic LE, Shah SS, Neuman MI. Correction of cerebrospinal fluid protein for the presence of red blood cells in children with a traumatic lumbar puncture. *J Pediatr* 2011; 159:158-9.
13. Whitley RJ, Lakeman F. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: therapeutic and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 1995; 20:414-20.
14. Bitnun A, Ford-jones EL, Petric M, et al. Acute childhood encephalitis and *Mycoplasma pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001 Jun 15; 32:1674-84.
15. Lakeman FD, Whitley RJ. Diagnosis of Herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1995; 171:857-63.
16. Adler AC, Kadimi S, Apaloo C, Marcu C. Herpes simplex encephalitis with two false –negative cerebrospinal fluid PCR tests and review of negative PCR results in the clinical setting. *Case Rep Neurol* 2011; 3:172-8.
17. Gkrania-Klotsas E, Lever AML. Herpes simplex I encephalitis presenting as a brain haemorrhage with normal cerebrospinal fluid analysis: a case report. *J Med Case Reports* 2008; 2:387.
18. DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Weinberg A, Tyler KL: Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002; 25:S5-S11.
19. Puchhammer-Stockl E, Presterl E, Croy C, Aberle S, Popow-Kraupp T, Kundi M, Hofmann H, Wenninger U, Godl I: Screening for possible failure of herpes simplex virus PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of herpes simplex encephalitis. *J Med Virol* 2001; 64:531–536.

20. Selvaraju SB, Wurst M, Horvat RT R.S.: Performance of three different HSV ID/typing assays for detection and typing of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63:286-291.
21. Domingues RB, Lakeman FD, Mayo MS, Whitley RJ: Application of competitive PCR to cerebrospinal fluid samples from patients with herpes simplex encephalitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2229-2234.
22. Puchhammer-Stockl E, Heinz FX, Kundi M, Popow-Kraupp T, Grimm G, Millner MM, Kunz C: Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of herpes simplex virus encephalitis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:146-148.
23. Denes E, Labach C, Durox H, Adoukonou T, Weinbreck P, Magy L, Ranger-Rogez S: Intrathecal synthesis of specific antibodies as a marker of herpes simplex encephalitis in patients with negative PCR. *Swiss Med Wkly* 2010; 140:E1-E4.
24. Schlede L, Bueter W, Baumgartner S, et al. Pediatric Herpes simplex encephalitis: a retrospective multicenter experience. *J Child Neurol* 2013; 28:321-31.
25. Beig FK, Malik A, Rizvi M, Acharya D, Khare S. Etiology and clinic-epidemiological profile of acute viral encephalitis in children of Western Uttar Pradesh, India. *Int J Infect Dis* 2010; 14:e141-6.