

La diagnosi liquorale delle infezioni del sistema nervoso centrale

P. Cinque, S. Bossolasco, A. Bestetti, S. Sala

Clinica di Malattie Infettive, Ospedale San Raffaele, Milano

Introduzione

L'esame del liquor cerebrospinale è una procedura fondamentale nei pazienti con un sospetto di infezione del sistema nervoso centrale (SNC). Questo esame permette di ottenere una diagnosi eziologica, mediante l'identificazione diretta del patogeno responsabile, o la dimostrazione di una risposta immunitaria intratecale specifica. Le metodiche dirette tradizionali utilizzate a questo scopo sono l'esame microscopico del liquor, l'esame colturale, e la ricerca di antigeni microbici. L'uso combinato di queste metodiche può essere sufficiente per giungere ad una diagnosi, come nel caso delle meningiti batteriche. In altri casi, come nella maggior parte delle infezioni virali del SNC, queste sono per lo più inadeguate, a causa di una relativamente bassa sensibilità diagnostica. Nel corso degli ultimi 10-15 anni, tuttavia, le infezioni virali del SNC hanno tratto grandi vantaggi dallo sviluppo di tecniche molecolari di amplificazione genica, prima di tutte la polymerase chain reaction (PCR). Questa relazione tratterà prevalentemente l'utilizzo delle metodiche molecolari nella diagnosi delle infezioni virali del SNC, descrivendo alcuni esempi ritenuti particolarmente significativi, così come i progressi più recenti in questo campo.

La diagnosi liquorale delle infezioni virali del SNC

Tra le metodiche convenzionali di analisi liquorale, solo l'isolamento virale in colture cellulari si è dimostrato utile in passato, essendo in grado di identificare la presenza di enterovirus in circa la metà dei casi di meningiti asettiche. Questa metodica, tuttavia, è poco utile per la diagnosi di infezioni causata da altri virus, come le encefaliti erpetiche o le forme causate da arbovirus. A causa della natura intracellulare dei virus, le tecniche per l'identificazione di antigeni virali, così come l'esame microscopico diretto del liquor, richiedono un elevato numero di cellule infette nel liquor stesso e sono quindi per lo più ina-

deguate. D'altro canto, la diagnosi indiretta mediante dimostrazione di una risposta anticorpale specifica a livello intratecale è generalmente utile solo nelle fasi più avanzate di infezione (1).

In questo contesto, l'applicazione di metodiche per l'amplificazione di genomi virali nel liquor ha aperto nuove e rivoluzionarie possibilità. Queste tecniche sono state utilizzate per la prima volta per l'analisi del liquor all'inizio degli anni '90, dimostrando di essere promettenti nella diagnosi delle meningiti da enterovirus e nelle encefaliti erpetiche. Da allora, il numero di esperienze in questo campo è aumentato drasticamente e le metodiche per l'amplificazione dei genomi virali nel liquor, oggi alla portata della maggior parte dei laboratori, sono diventate il test diagnostico di prima scelta in alcune infezioni del SNC, come l'encefalite erpetica (2).

Oltre al loro utilizzo strettamente diagnostico, queste metodiche si sono rivelate fondamentali per stabilire una eziologia virale in sindromi neurologiche di origine incerta, come per esempio la meningite ricorrente di Mollaret, o per riconoscere e caratterizzare clinicamente forme poco conosciute, come i casi atipici di encefalite erpetica o le ventricolo-encefaliti da citomegalovirus (CMV). Attraverso l'utilizzo di metodiche molecolari sono stati identificati nel liquor virus normalmente responsabili di infezioni sistemiche, come i rotavirus, il parvovirus B19, il CMV o il virus erpetico umano di tipo 6 (HHV-6), suggerendone un ruolo eziologico anche a livello del SNC. Infine, l'amplificazione di genomi virali, seguita dal loro sequenziamento, ha contribuito all'identificazione di nuovi virus responsabili di infezioni del SNC, ad esempio i paramyxovirus Hendra e Nipah virus, responsabili di casi isolati o epidemici di encefalite alla fine degli anni '90.

Le metodiche molecolari per l'amplificazione di genomi virali

Le metodiche di amplificazione genica permettono di produrre, a partire anche da poche molecole, elevate quantità di acidi nucleici (oltre un milione di

copie), che possono essere rilevate da semplici procedure di laboratorio (3). Questo processo è basato sull'ibridazione di sequenze (primer) al frammento scelto per essere riprodotto (target), e sulla successiva sintesi in vitro di nuove molecole di DNA o RNA da parte di enzimi (polimerasi). Questo principio è alla base della straordinaria sensibilità di queste procedure, e del loro successo per lo studio del liquor, che normalmente non contiene microorganismi in elevate concentrazioni. Inoltre, l'intera procedura richiede anche poche ore, così che il risultato finale è spesso utile per una diagnosi rapida. La PCR è la metodica più conosciuta, che si svolge attraverso la ripetizione ciclica di tre fasi a diverse temperature che consentono la denaturazione del DNA target, l'appaiamento dei primer e la sintesi di nuove molecole di DNA ad opera dell'enzima Taq polimerasi (3). La PCR viene utilizzata per l'identificazione di virus sia a DNA che a RNA. Nel caso di virus a RNA, è necessario che questo venga trasformato in DNA complementare (cDNA) prima dell'amplificazione, mediante l'uso dell'enzima retrotrascrittasi. Una variante della PCR classica, frequentemente utilizzata per lo studio del liquor, è la PCR "nested". Questa metodica, basata sull'uso di due coppie di primer, il secondo dei quali è "annidato" all'interno del primo, è caratterizzata da una superiore sensibilità e specificità rispetto alla metodica classica. Oltre alla PCR, altre metodiche di amplificazione genica possono essere utilizzate per l'analisi del liquor, per esempio la NASBA (nucleic acid sequence based amplification), o la branched DNA. NASBA, differentemente dalla PCR, è basata sull'amplificazione di RNA virale, anziché DNA, inoltre la sintesi di nuove molecole di acido nucleico avviene mediante una reazione isotermica che prevede l'uso di tre diversi enzimi. La branched DNA è una tecnica basata sull'amplificazione del segnale prodotto dopo l'ibridazione di sonde specifiche con il target. In generale, un potenziale problema nell'utilizzo delle metodiche di amplificazione genica consiste nel rischio di generare risultati falsamente positivi, in seguito alla contaminazione dei campioni con i prodotti delle amplificazioni precedenti (carry-over) o con gli acidi nucleici presenti in altri campioni. Allo scopo di minimizzare questo rischio, è necessario applicare strette misure precauzionali durante tutte le fasi di manipolazione ed analisi del campione, prima di tutto il mantenimento della sterilità dell'ambiente e dei reagenti. Inoltre, l'analisi di diversi controlli negativi in parallelo ai campioni clinici, e l'analisi dei campioni in duplicato, sono ulteriori accorgimenti per riconoscere eventuali falsi positivi. D'altra parte, risultati falsamente negativi possono essere generati in seguito alla presenza di inibitori, cioè di molecole in grado di compromettere il corretto funzionamento degli enzimi utilizzati nel processo di amplificazione. Per rilevare la presenza di inibitori, si è rivelato utile utilizzare delle molecole standard a concentrazione nota che vengono intro-

dotte nel campione clinico ed amplificate contemporaneamente.

Applicazioni cliniche dell'analisi del liquor mediante amplificazione genica

Vi sono numerosissimi esempi di applicazioni cliniche delle metodiche di amplificazione genica per la diagnosi di infezioni virali del SNC, riguardanti sia le infezioni in età pediatrica che in età adulta, sia quelle più frequenti nei pazienti immunocompromessi che negli immunocompetenti. Verranno qui di seguito discussi alcuni esempi tra quelli ritenuti più significativi, mentre si rimanda ad una review più ampia per una trattazione più completa dell'argomento (4).

Encefalite erpetica

L'encefalite erpetica è la forma più frequente di encefalite virale nel mondo occidentale. Si tratta di una forma a prognosi grave, tuttavia l'impiego terapeutico dell'aciclovir, ha ridotto la mortalità da circa il 50% al 20% ed è associato a guarigione clinica fino nel 50% dei casi. L'identificazione del virus herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) nel liquor di pazienti con questa patologia è tra gli esempi più convincenti dell'uso delle metodiche molecolari in diagnostica. Questo approccio diagnostico ha oggi rimpiazzato l'uso della biopsia cerebrale, che rappresentava in passato il metodo diagnostico di scelta per la diagnosi di encefalite erpetica. Un gran numero di studi ha dimostrato che la PCR su liquor è altamente affidabile, con valori di sensibilità e specificità diagnostiche ampiamente superiori al 90% (5). Inoltre, questa metodica ha permesso il riconoscimento di forme atipiche di encefalite erpetica. Da un punto di vista pratico, l'analisi viene effettuata rapidamente, permettendo l'immediato utilizzo del risultato per le decisioni terapeutiche. Tuttavia, è importante che i risultati vengano interpretati con cautela e tenendo conto sia della presentazione clinica che di un'eventuale trattamento in corso con farmaci antivirali. E' infatti possibile osservare dei risultati negativi nelle fasi più precoci dell'encefalite, probabilmente a causa di una replicazione virale nel SNC ancora limitata. D'altra parte, la probabilità di ottenere un risultato positivo in pazienti con encefalite erpetica si riduce con la durata del trattamento con aciclovir, ma è scarsa anche in pazienti non trattati in cui il liquor viene ottenuto in fasi avanzate di malattia. In questi ultimi casi, è importante considerare, ai fini diagnostici, l'utilizzo di metodiche sierologiche per la dimostrazione di una risposta intratecale di anticorpi anti-HSV (2).

Meningite da enterovirus

Gli enterovirus - oltre 70 sierotipi differenti, comprendenti coxsackievirus A e B, echovirus e poliovirus - sono di gran lunga la causa più frequente di me-

ningiti asettiche. Si tratta generalmente di forme benigne, che non necessitano di terapia, tuttavia la presentazione clinica è spesso clinicamente indistinguibile da quella delle ben più gravi forme batteriche. Sebbene l'esame colturale del liquor permetta l'isolamento virale in un gran numero di casi di meningite da enterovirus, l'uso delle metodiche molecolari ha ulteriormente aumentato le possibilità di diagnosi di queste infezioni (6). I protocolli diagnostici in uso sono in grado di riconoscere quasi tutti i sierotipi di enterovirus, con l'eccezione degli Echovirus 22 e 23. Grazie all'estrema sensibilità di queste procedure, RNA virale può essere identificato anche in campioni di liquor prelevati dopo alcuni giorni dalla comparsa dei sintomi, da cui il virus non è più isolabile in colture cellulari. Inoltre, queste tecniche hanno ridotto i tempi necessari per ottenere una diagnosi dai 4-10 giorni delle colture cellulari a un giorno. La validità diagnostica delle metodiche di amplificazione genica è risultata molto elevata, in confronto all'isolamento virale, con valori di sensibilità superiori al 90% e di specificità del 48-89%, questi ultimi riflettendo essenzialmente l'identificazione di enterovirus mediante amplificazione genica in pazienti con meningite da enterovirus ma coltura virale negativa.

Infezioni opportunistiche del SNC in corso di infezione da HIV

Le complicanze del SNC in pazienti con infezione da HIV consistono principalmente nelle infezioni opportunistiche e nelle patologie da HIV, conseguenti all'effetto diretto della replicazione del virus nel SNC. L'utilizzo, negli ultimi anni, delle potenti terapie antiretrovirali di combinazione (HAART), ha portato ad una drastica riduzione della frequenza di queste patologie nei paesi industrializzati. Tuttavia queste rappresentano ancora un enorme problema per coloro che non hanno accesso o che non rispondono alle terapie. Le infezioni opportunistiche virali comprendono encefaliti, meningiti, mieliti, o forme miste causate da virus erpetici, e la leucoencefalite multifocale progressiva (PML), risultante dall'infezione del SNC con il polyomavirus JC virus (JCV). L'impatto delle metodiche di amplificazione genica da liquor è stato rilevante per la diagnosi di queste complicazioni (7). Le tecniche molecolari per l'identificazione del DNA di CMV nel liquor si sono rivelate altamente specifiche e sensibili per la diagnosi di encefalite da CMV, una forma molto grave riportata in circa un terzo dei pazienti con AIDS. La dimostrazione nel liquor del DNA di altri virus erpetici - HSV-1, HSV-2 e varicella-zoster virus (VZV) - ha inoltre contribuito all'identificazione ad alla caratterizzazione clinica delle complicazioni neurologiche causate da questi virus nei pazienti immunocompromessi.

L'analisi del liquor mediante PCR per JCV DNA ha in gran parte rimpiazzato l'uso della biopsia cerebra-

le come strumento diagnostico di scelta per porre diagnosi di PML, anche se sequenze virali sono identificabili solo in circa due terzi dei soggetti con PML. Tuttavia, le probabilità di ottenere un risultato positivo aumentano con la progressione della malattia. Recentemente, è stato osservato che alcuni pazienti mostrano una stabilizzazione clinica in seguito a trattamento con HAART e che in questi casi il virus JCV non è più identificabile nel liquor. Infine, un'importante complicanza HIV-correlata del SNC è il linfoma cerebrale primitivo, che è quasi sempre associato al virus di Epstein-Barr (EBV) nelle cellule tumorali. Diversi studi hanno dimostrato la presenza di EBV DNA nel liquor nella quasi totalità dei pazienti con questa patologia. In alcuni casi, inoltre, EBV è stato rilevato nel liquor già settimane o mesi prima della comparsa delle manifestazioni cliniche di linfoma.

Metodiche quantitative di amplificazione genica

Un importante progresso delle metodiche molecolari è stato lo sviluppo di tecniche che consentono la misurazione delle quantità di acidi nucleici presente nei campioni. Queste comprendono sia le metodiche cosiddette semiquantitative, per esempio quelle basate sulle diluizioni limite dei campioni o sul confronto dei prodotti di amplificazione con standard "esterni" a concentrazione nota, che quelle più propriamente quantitative (8). Queste ultime permettono una stima più precisa dei livelli di acidi nucleici presente nei campioni, mediante la coamplificazione, insieme al target, di molecole standard a concentrazione nota. Queste, oltre a rappresentare il riferimento per la misurazione degli acidi nucleici, permettono anche di controllare l'efficienza dell'amplificazione.

Tra gli sviluppi più recenti delle metodiche quantitative, vi sono quelle basate sulla determinazione in tempo reale ("real-time") delle quantità di acidi nucleici presenti nei campioni. La PCR real-time è basata sulla detezione e quantificazione di un segnale fluorescente che viene prodotto durante ciascun ciclo di amplificazione, grazie all'uso di sonde marcate con molecole fluorescenti. Questo rende possibile il monitoraggio in tempo reale della reazione di PCR durante la sua fase esponenziale, in cui la quantità di prodotto amplificato corrisponde alla quantità di molecole target presenti nel campione stesso. In confronto alle metodiche quantitative classiche, in cui la quantità di DNA viene invece misurata alla fine della reazione di PCR, in cui l'efficienza dell'amplificazione è ridotta, la PCR real-time è più accurata ed associata ad un più ampio range di linearità. Nonostante questa metodica sia da poco entrata nella pratica di laboratorio, sono già frequenti le applicazioni su liquor. In particolare le tecnologie TaqMan e LightCycler sono già state utilizzate con successo per lo studio del liquor di pazienti con

infezioni da herpesvirus del SNC o con meningite da enterovirus (9).

Applicazioni cliniche delle metodiche quantitative di amplificazione genica

La quantificazione dei genomi virali nel liquor è importante sia al momento della diagnosi di un'infezione del SNC, in quanto può fornire indicazioni sull'estensione delle lesioni, utili per stabilire una prognosi, sia durante il monitoraggio clinico-terapeutico successivo alla diagnosi (4).

Due esempi significativi sono la quantificazione di genomi virali nelle infezioni da CMV e da HIV del SNC. Nell'encefalite da CMV, i livelli liquorali di CMV-DNA sono proporzionali all'estensione del danno tissutale e quindi utili nel distinguere lesioni estese da forme più limitate (10). Inoltre, la misurazione dei livelli di CMV-DNA è utile nel monitorare la risposta virologica alla terapia con farmaci anti-CMV. Sebbene i livelli di CMV-DNA liquorali tendano a ridursi in seguito alla terapia con ganciclovir o foscarnet, spesso persistono a lungo nel liquor in parallelo ad una mancata risposta sul piano clinico.

La quantificazione di HIV RNA nel liquor viene generalmente effettuata mediante l'impiego di metodiche commerciali, che comprendono sia PCR che NASBA o branched DNA, le stesse che vengono più frequentemente utilizzate per monitorare il carico virale nel plasma di soggetti con infezione da HIV. Poiché il virus HIV invade il SNC precocemente dopo la prima infezione, RNA di HIV è rilevabile nel liquor a qualsiasi stadio di infezione ed indipendentemente dalla presenza di sintomi neurologici. Tuttavia, il carico virale liquorale è generalmente più elevato nei pazienti con un'infezione produttiva da HIV del SNC, come nelle forme di encefalite da HIV o di demenza HIV-correlata. Gli attuali trattamenti antiretrovirali, inoltre, inducono una riduzione sostanziale dei livelli liquorali di HIV-RNA, per cui queste metodiche sono utilizzate anche per monitorare la risposta virologica alla terapia a livello del SNC.

Considerazioni pratiche

Amplificazione degli acidi nucleici nelle infezioni meno frequenti del SNC

Nonostante il potenziale diagnostico delle metodiche molecolari sia largamente dimostrato per diverse infezioni del SNC, come negli esempi sopra descritti, questo non è così chiaro per altre infezioni meno frequenti, ad esempio le encefaliti e meningiti causate da arbovirus, o le complicazioni neurologiche di malattie esantematiche virali come il morbillo o la rosolia. In queste patologie, alcuni studi hanno in realtà dimostrato la presenza dei rispettivi genomi

virali nel liquor, tuttavia, a causa del relativamente basso numero di casi studiati, la percentuale di detezione in pazienti con o senza malattia non è conosciuta.

Interpretazione dei risultati ottenuti mediante amplificazione degli acidi nucleici

Accade talvolta che genomi virali vengono identificati nel liquor di pazienti con infezioni del SNC o altre malattie neurologiche, senza che vi sia tuttavia una chiara associazione con la malattia stessa. Questo è più frequente con virus che rimangono latenti nell'organismo dopo la prima infezione, come alcuni virus erpetici. Ad esempio, EBV è stato rinvenuto nel liquor di pazienti con altre infezioni del SNC, come l'encefalite erpetica o alcune infezioni opportunistiche del SNC (7). DNA di JCV o di HHV-6 è stato rilevato nel liquor di pazienti con sclerosi multipla, nonostante non sia mai stato provato un ruolo eziologico di questi virus in questa patologia. In teoria, questi risultati possono essere la conseguenza di un passaggio di virus dal sangue attraverso delle barriere cerebrali danneggiate, ma possono anche riflettere una riattivazione intrinseca del virus stesso in concomitanza con altre patologie. In altri casi, invece, acidi nucleici virali possono essere rilevati nel liquor prima della comparsa dei sintomi neurologici specifici. Questo è stato osservato in pazienti con AIDS, in cui sia CMV che EBV possono essere identificati nelle fasi precliniche di encefalite da CMV o linfoma, rispettivamente. Purché interpretati adeguatamente, questi riscontri possono risultare vantaggiosi in quanto permettono di ottenere una diagnosi in fasi molto precoci.

In generale, gli esempi sopra riportati sono la conseguenza dell'elevatissima sensibilità delle metodiche di amplificazione genica e sottolineano l'importanza di un'attenta interpretazione del dato di laboratorio, che tenga conto anche del contesto clinico del singolo caso. A questo scopo, l'utilizzo delle metodiche molecolari quantitative può risultare utile per discriminare un'infezione clinicamente importante, accompagnata da importante replicazione virale, da un risultato accidentale.

Costi e benefici delle metodiche di amplificazione genica

Un potenziale svantaggio delle metodiche di amplificazione genica è rappresentato dai costi relativamente elevati. È stato calcolato che, tenendo conto esclusivamente delle spese per i reagenti ed altro materiale di laboratorio, il costo per l'analisi di un campione si aggira tra i 20 e i 200 Euro. I kit commerciali hanno alcuni vantaggi, come la standardizzazione e, a volte, l'automatizzazione, ma sono generalmente i più costosi. Le procedure "casalinghe" sono più economiche e le spese possono venire ulteriormente controllate per esempio evitando l'uso di

procedure costose per la preparazione del liquor e la detezione dei prodotti di amplificazione, o utilizzando protocolli per l'analisi contemporanea di più agenti infettivi, come la PCR multiplex o la PCR con primer consensus. La PCR multiplex permette di amplificare due o più sequenze mediante l'utilizzo di due o più coppie di primer, ciascuna specifica per una sequenza, purchè vengano utilizzate condizioni di amplificazione adeguate per le diverse coppie di primer. La PCR con primer consensus viene utilizzata per amplificare sequenze conservate tra microorganismi simili, per esempio i differenti virus erpetici. Il prodotto dell'amplificazione può essere identificato mediante analisi di sequenza, enzimi di restrizione o sonde specifiche.

Indipendentemente dalle tecniche impiegate, l'ottenimento di una diagnosi rapida di infezione del SNC mediante amplificazione genica è comunque vantaggioso in termini di costi-benefici. Nella diagnosi di encefalite erpetica, ad esempio, non solo la PCR su liquor è più vantaggiosa della biopsia cerebrale, ma è conveniente anche rispetto alla pratica comune di iniziare la terapia antivirale in modo empirico. E' stato infatti dimostrato che l'uso della PCR su liquor è associato sia ad una prognosi migliore per il paziente, che ad un significativo risparmio dell'uso di aciclovir, risultante dall'interruzione della terapia in pazienti con PCR su liquor negativo. Un altro esempio è rappresentato dalle meningiti da enterovirus, in cui una diagnosi rapida mediante amplificazione genica è associata ad una riduzione dei costi derivanti dalla richiesta di ulteriori indagini diagnostiche, dai trattamenti antibiotici empirici e dai più lunghi periodi di ospedalizzazione.

Standardizzazione delle metodiche e controlli di qualità

Un importante problema legato all'uso delle metodiche molecolari ai fini diagnostici consiste nella limitata standardizzazione delle procedure utilizzate. I protocolli diagnostici differiscono frequentemente tra i diversi laboratori, inoltre standard di riferimento per valutare la sensibilità delle metodiche a livello dei singoli laboratori sono spesso inesistenti. D'altra parte, l'analisi dei campioni può essere soggetta ad errori di laboratorio, dovuti per esempio ad inadeguatezza delle fasi di validazione del test, dei reagenti utilizzati o della preparazione del personale. Allo scopo di ottimizzare le procedure diagnostiche nelle infezioni del SNC a livello dei singoli laboratori, sono stati avviati dei programmi, sponsorizzati dalla Comunità Europea, di controllo di qualità (QC) delle procedure di amplificazione per i principali virus responsabili di infezioni del SNC tra cui HSV-1 e HSV-2. Questi QC sono basati sull'uso di "pannelli diagnostici" costituiti da campioni contenenti quantità note di acidi nucleici. Questi vengono distribuiti ai laboratori partecipanti dove vengono analizzati in cieco. In generale, l'analisi dei risultati

riportato dai diversi laboratori ha rivelato differenze rilevanti tra i singoli laboratori, soprattutto riguardanti campioni contenenti basse concentrazioni di acidi nucleici. Inoltre, sono stati non infrequentemente riportati risultati falsamente positivi, mentre non si è osservata alcuna correlazione tra la qualità della prestazione e l'utilizzo di metodiche commerciali rispetto a quelle "casalinghe". E' evidente quindi che, nonostante i notevoli progressi ottenuti dall'uso delle metodiche molecolari per l'analisi del liquor, un obiettivo non ancora raggiunto è quello dell'ottimizzazione di queste metodiche a livello dei singoli laboratori, tale da rendere questi test altamente affidabili indipendentemente dalle condizioni in cui vengono eseguiti.

Bibliografia

1. Rubin SJ. Detection of viruses in spinal fluid. *Am J Med* 1983;75:124-8.
2. Cinque P, Cleator GM, Weber T, Monteyne P, Sindic CJ, van Loon AM. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. The EU concerted action on virus meningitis and encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61:339-45.
3. Tang YW, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999. pp. 215-44.
4. Cinque P, Bossolasco S, Lundqvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002 (in press).
5. Linde A, Klapper PE, Monteyne P, Echevarria JM, Cinque P, Rozenberg F, et al. Specific diagnostic methods for herpesvirus infections of the central nervous system: a consensus review by the European Union concerted action on virus meningitis and encephalitis. *Clin Diagn Virol* 1997;8:83-104.
6. Jeffery KJ, Read SJ, Peto TE, Mayon-White RT, Bangham CR. Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. *Lancet* 1997;349:313-7.
7. 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.
8. Preiser W, Elzinger B, Brink NS. Quantitative molecular virology in patient management. *J Clin Pathol* 2000;53:76-83.
9. Aberle SW, Puchhammer-Stockl E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002;25 (Suppl):79-85.
10. 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;(Suppl 1):S95-102.