

P. Cinque · S. Bossolasco · A. Bestetti · A. Lazzarin

L'esame del liquor nella diagnosi delle encefaliti virali

Riassunto Nel corso degli ultimi 10 anni, la diagnostica delle infezioni virali del sistema nervoso centrale (SNC) ha tratto grandi vantaggi dallo sviluppo delle metodiche molecolari di amplificazione genica, prima di tutte la *polymerase chain reaction* (PCR). Questi test, caratterizzate da un'elevatissima sensibilità analitica, hanno dimostrato un'altrettanto elevata sensibilità e specificità diagnostica, e costituiscono oggi il test di scelta in alcune encefaliti virali, come l'encefalite erpetica. Oltre al loro utilizzo strettamente diagnostico, queste metodiche si sono rivelate fondamentali per definire un'eziologia virale in sindromi neurologiche di origine incerta, e nel consentire l'identificazione nel liquor di virus normalmente responsabili di infezioni sistemiche, suggerendone un ruolo eziologico anche a livello del SNC. Questa relazione tratterà l'utilizzo delle metodiche molecolari nella diagnosi delle encefaliti virali, descrivendo alcuni esempi ritenuti particolarmente significativi, e discutendone i principali vantaggi e limitazioni.

Parole chiave Liquor · Encefalite · Virus · Encefalite erpetica · Diagnosi molecolare · *Polymerase chain reaction*

P. Cinque (✉) · S. Bossolasco · A. Bestetti · A. Lazzarin
Clinica di Malattie Infettive
Ospedale San Raffaele
Via Stamira d'Ancona 20, I-20127 Milano, Italia

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 ottenerne la diagnosi eziologica, mediante l'identificazione diretta del patogeno responsabile, o la dimostrazione di una risposta immunitaria intratecale specifica. Le metodiche dirette, tradizionalmente utilizzate a questo scopo, consistono nell'esame microscopico e colturale del liquor e nella ricerca di antigeni microbici. Nelle infezioni sostenute da virus, tuttavia, le metodiche tradizionali sono caratterizzate da una relativamente bassa sensibilità diagnostica, a causa della natura intracellulare di questi patogeni. D'altra parte, la diagnosi indiretta, mediante dimostrazione di una risposta anticorpale specifica a livello intratecale, è generalmente utile solo nelle fasi più avanzate di infezione. Durante gli ultimi 10 anni, la diagnostica delle infezioni virali del SNC ha, invece, tratto grandi vantaggi dallo sviluppo delle metodiche molecolari di amplificazione genica, prima di tutte la *polymerase chain reaction* (PCR). Questa relazione tratterà l'utilizzo di questi test nella diagnosi delle encefaliti virali, descrivendo alcuni esempi ritenuti particolarmente significativi, e discutendone i principali vantaggi e limitazioni.

Le metodiche molecolari per l'amplificazione di genomi virali. Cenni metodologici

Le metodiche di amplificazione genica permettono di produrre, a partire anche da poche molecole, elevate quantità di acidi nucleici (oltre 10^6 copie), che possono essere rilevate da semplici procedure di laboratorio [1]. 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 microrganismi in elevate concentrazioni. Inoltre, l'intera procedura richiede solitamente poche ore, così che il risultato finale può essere utile per una diagnosi rapida. La PCR è la metodica più conosciuta, e può essere 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 è basata sull'uso di due copie di *primer*, il secondo dei quali è "annidato" all'interno del primo, ed 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 isoterma 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*.

Un recente contributo al successo delle metodiche molecolari è stato fornito dallo sviluppo di tecniche quantitative, che consentono la misurazione delle quantità di acidi nucleici presenti nei campioni. La quantificazione dei genomi virali nel liquor è importante, sia al momento della diagnosi di infezione del SNC, in quanto può fornire indicazioni sull'estensione delle lesioni, utili per stabilire una prognosi, sia durante il successivo monitoraggio clinico-terapeutico. Le metodiche utilizzate a questo scopo comprendono sia procedure semplici, per esempio basate sulle diluizioni limite dei campioni, che però sono poco accurate (frequentemente denominate "semiquantitative"), che analisi più complesse. Quest'ultime permettono una stima più precisa dei livelli di DNA o RNA presenti nei campioni, mediante la coamplificazione, insieme al *target*, di molecole *standard* a concentrazione nota. Queste molecole, oltre a rappresentare il riferimento per la misurazione degli acidi nucleici, permettono anche di controllare l'efficienza dell'amplificazione [2].

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 virali del SNC [3].

Applicazioni cliniche dell'analisi del liquor mediante amplificazione genica

Le metodiche per l'amplificazione di genomi virali sono state utilizzate per la prima volta, per l'analisi del liquor, all'inizio degli anni '90, nello studio di campioni con meningiti da enterovirus e nelle encefaliti erpetiche. Da allora, il numero di esperienze nel campo delle infezioni del SNC è aumentato drasticamente e questi test, oggi alla portata della maggior parte dei laboratori di virologia, costituiscono lo standard diagnostico di numerose infezioni del SNC, come l'encefalite erpetica.

Oltre al loro utilizzo strettamente diagnostico, le metodiche molecolari si sono rivelate fondamentali per definire un'eziologia virale in sindromi neurologiche di origine incerta o poco caratterizzate dal punto di vista clinico, come i casi atipici di encefalite erpetica o le encefaliti da citomegalovirus (CMV). Questi test hanno, inoltre, consentito l'identificazione nel liquor di virus normalmente responsabili di infezioni sistemiche, suggerendone un ruolo eziologico anche a livello del SNC, come nel caso dei rotavirus o del virus erpetico umano di tipo 6 (HHV-6). Infine, l'amplificazione di genomi virali, seguita dal loro sequenziamento, ha contribuito all'identificazione di nuovi virus, ad esempio i paramyxovirus Hendra e Nipah, responsabili di casi di encefalite alla fine degli anni '90 (Tabella 1).

Gli esempi di applicazioni cliniche delle metodiche di amplificazione genica nella diagnosi delle encefaliti virali sono numerosissimi, i più significativi dei quali vengono presentati nella Tabella 1 e in parte discussi qui di seguito. Si rimanda ad una *review* più ampia per una trattazione più approfondita dell'argomento [4].

Encefalite erpetica

L'encefalite erpetica è l'encefalite virale più frequente 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 risultato associato a

Tabella 1 Applicazioni cliniche dell'analisi del liquor mediante amplificazione genica

Famiglia	Virus	Significato dell'identificazione di acidi nucleici nel liquor *	Significato della quantificazione degli acidi nucleici nel liquor
Herpesviridae di tipo 1	Herpes simplex virus (HSV-1)	Diagnosi dell'encefalite erpetica (HSV-1, test di prima scelta); definizione eziologica e diagnosi di encefaliti atipiche; diagnosi delle forme subacute (da HSV-1 o HSV-2) in pazienti con infezione da HIV	Ampia variazione dei livelli di DNA tra pazienti (fino a 107 copie/ml); associazione di elevati livelli con prognosi infausta; riduzione livelli di DNA in seguito a terapia con aciclovir
	Virus varicella-zoster (VZV)	Diagnosi delle complicanze della varicella (es. Atassia cerebellare) o dell'herpes zoster; diagnosi delle forme meningoencefalitiche nell'ospite immunocompromesso	Livelli di DNA più elevati in pazienti con complicanze dell'herpes zoster che della varicella
	Citomegalovirus (CMV)	Definizione eziologica e diagnosi delle forme di meningoencefalite nel paziente immunocompetente (rare) o immunocompromesso (ventricolo-encefalite, encefalite micronodulare)	In pazienti con infezione da HIV: associazioni di elevati livelli di DNA con poliradicomielite o ventricoloencefalite, e con l'estensione delle lesioni; riduzione dei livelli di DNA in seguito a terapia antivirale
	Virus di Epstein-Barr (EBV)	Definizione eziologica e diagnosi delle forme di meningoencefalite nel paziente immunocompetente (rare)	
	Herpesvirus umano di tipo 6 o 7 (HHV-6, HHV-7)	Identificazione del genoma virale in corso di convulsioni febbrili e, sporadicamente, di encefalite.	Bassi livelli di DNA di HHV-6 in bambini con convulsioni febbrili (inferiori a 103 copie/ml).
Polyomaviridae (dsDNA)	Virus JC (JCV)	Diagnosi (test di scelta non invasivo) della leucoencefalite multifocale progressiva	Riduzione e negativizzazione livelli di DNA in pazienti con stabilizzazione della malattia in seguito ad HAART
	Virus BK (BKV)	Associazione occasionale con encefalite	
Reoviridae (dsRNA)	Rotavirus	Identificazione di rotavirus come responsabili di encefalite in corso di infezione sistemica; potenzialmente utile nella diagnosi	
Togaviridae (ss+RNA)	Virus della rosolia	Associazione occasionale con encefalite	
Flaviviridae (ss+RNA)	Virus Dengue, Japanese encephalitis, West Nile, Tick borne encephalitis, Saint Louis encephalitis	Potenzialmente utile nella diagnosi	
Bunyaviridae (ss-RNA)	Virus Jamestown Canyon, La Crosse	Potenzialmente utile nella diagnosi	
Orthomyxoviridae (ss-RNA)	Virus dell'influenza	Identificazione del virus dell'influenza come possibile responsabile di encefalite in corso di infezione sistemica; potenzialmente utile nella diagnosi	
Paramyxoviridae (ss-RNA)	Virus del morbillo	Potenzialmente utile nella diagnosi dell'encefalite acuta e della panencefalite subacuta sclerosante (PESS)	
	Virus Nipah, Hendra	Potenzialmente utile nella diagnosi	
Arenaviridae (ss-RNA)	Virus Lassa	Associazione occasionale con encefalite	
Rhabdoviridae (ss-RNA)	Virus della rabbia	Potenzialmente utile nella diagnosi	
Retroviridae (DNA e RNA)	Virus dell'immunodeficienza umana (HIV)	Utile nella diagnosi di demenza ed encefalite HIV-correlata, ma non specifico	Associazione di elevati livelli di RNA con demenza o encefalite da HIV; riduzione dei livelli di RNA in seguito alla terapia con farmaci anti-HIV

Sono stati considerati solo i virus responsabili di encefalite, mentre sono stati esclusi i virus prevalentemente responsabili di forme meningitiche (es. enterovirus o virus Toscana)

* Il termine "potenzialmente utile nella diagnosi" si riferisce ai casi in cui il genoma virale può essere identificato nel liquor, ma il significato diagnostico non è ancora ben definito. *Ds*, double strand; *ss*, single strand

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 diagnostico delle metodiche molecolari. Questo approccio 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 superiori al 90% [5]. Da un punto di vista pratico, l'analisi è rapida, consentendo 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. È, 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.

Accanto alla diagnosi delle forme "classiche" di encefalite erpetica, le metodiche molecolari hanno consentito il riconoscimento di forme atipiche o con localizzazioni insolite. Si ricordano, tra le altre, forme caratterizzate da sintomi psichiatrici, localizzate al tronco encefalico od al midollo spinale, o ad andamento cronico o subacuto [5]. A questo proposito, la dimostrazione nel liquor del DNA di HSV-1 o HSV-2 ha contribuito all'identificazione ed alla caratterizzazione clinica delle complicazioni neurologiche causate da questi virus nei pazienti immunocompromessi, in particolar modo nei pazienti con infezione da HIV [6]. In questi ultimi, l'esordio è subacuto, il quadro clinico-patologico è quello di una ventricolo-encefalite, spesso associata ad infezione da CMV, e l'evoluzione, per lo più progressiva, correlata ad una scarsa risposta ai farmaci antivirali.

Metodiche quantitative sono state recentemente applicate allo studio delle concentrazioni di DNA virale nel liquor di pazienti con encefalite erpetica, tuttavia, questi non sono ancora ampiamente diffuse nei laboratori diagnostici. In generale, i livelli di DNA virale nel liquor sono ampiamente variabili tra pazienti, e, in alcune casistiche, i valori più elevati sono risultati associati ad una prognosi infausta dell'encefalite [7]. L'uso delle metodiche quantitative permette, inoltre, di monitorare la risposta virologica alla terapia antivirale. Anche se l'aciclovir è quasi invariabilmente associato ad una buona risposta virologica nel paziente immunocompetente, è possibile individuare differenti cinetiche di risposta nei diversi pazienti.

Encefaliti trasmesse da vettori

Nonostante la disponibilità di metodiche di amplificazione genica per l'identificazione dei più importanti virus trasmessi da vettori (insetti e roditori) e responsabili di encefalite, il loro utilizzo diagnostico rimane limitato a pochi casi. Questo è, in parte, dovuto alla relativa rarità della maggior parte di queste encefaliti, che ne rende difficile uno studio sistematico, ma anche, probabilmente, alle caratteristiche biologiche di queste infezioni. Alcuni esempi sono la *tick-borne encephalitis* (TBE), in cui la maggior parte dei tentativi per rilevare l'RNA virale nel liquor sono stati fallimentari, l'encefalite giapponese e quelle causate dai virus *Western, Eastern and Venezuelan equine encephalitis* e della Dengue. In questi casi, la PCR su liquor necessita di essere affiancata dalle metodiche di ricerca di anticorpi nel siero o nel liquor. D'altra parte, l'uso di PCR nel liquor sembra essere più utile in altre forme di encefaliti virali, come quelle causate dai virus delle encefaliti *West Nile, La Crosse o Jamestown Canyon*. Per esempio, l'analisi mediante PCR *real-time* di campioni di liquor ottenuti da pazienti con encefalite *West Nile*, durante l'epidemia nell'area di New York nel 1999, ha mostrato una sensibilità e specificità diagnostiche rispettivamente del 57% e 100% [8].

Encefalite da HIV ed encefaliti da agenti opportunisti virali in corso di infezione da HIV

Nonostante l'utilizzo delle potenti terapie antiretrovirali di combinazione (HAART) abbia portato ad una drastica riduzione della frequenza e della mortalità associata alle patologie HIV-correlate nei paesi industrializzati, le complicanze neurologiche dell'infezione da HIV rappresentano ancora un enorme problema, soprattutto per coloro che non hanno accesso o che non rispondono alla terapia.

La demenza da HIV rappresenta la più eclatante manifestazione clinica dell'infezione del SNC dal virus HIV stesso. La diagnosi è clinica, basata sulla presenza di alterazioni cognitive in assenza di altre patologie del SNC, per cui diversi parametri liquorali, tra cui la quantità di RNA virale, sono stati valutati in passato per un eventuale utilizzo diagnostico. La quantificazione di HIV RNA nel liquor viene generalmente effettuata mediante l'impiego di metodiche commerciali, che comprendono la PCR, 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 quasi sempre rilevabile nel liquor a qualsiasi stadio di infezione ed indipendentemente dalla presenza di sintomi neurologici. Tuttavia, il carico virale è generalmente più elevato nei pazienti con

un'infezione produttiva da HIV del SNC, come nelle forme di demenza HIV-correlata. Nonostante questa associazione, l'utilizzo diagnostico dei test di amplificazione genica ha alcuni limiti, poichè elevate concentrazioni di RNA virale sono misurabili anche in pazienti con infezioni opportunistiche del SNC [9]. Nella pratica clinica, è comunque importante misurare le concentrazioni di HIV RNA a livello liquorale, per monitorare la risposta virologica alla terapia antiretrovirale a livello del SNC, soprattutto in pazienti che mostrano un "fallimento virologico" a livello plasmatico [9].

Le encefaliti causate da agenti opportunisti virali, in corso di infezione da HIV, comprendono le forme da virus erpetici (CMV, o, più raramente, HSV-1, *herpes simplex virus* di tipo 2 e virus varicella-zoster) e la leucoencefalite multifocale progressiva (PML), risultante dall'infezione del SNC con il polyomavirus JC virus (JCV). Nel complesso, l'impatto delle metodiche di amplificazione genica da liquor è stato rivoluzionario per la diagnosi di queste complicazioni [6]. Questi test si sono rivelati altamente specifici e sensibili per la diagnosi di encefalite da CMV, una forma molto grave riportata in circa un terzo dei pazienti con AIDS. Nell'encefalite da CMV, i livelli liquorali di CMV-DNA sono, inoltre, proporzionali all'estensione del danno tissutale e quindi utili nel distinguere lesioni estese da forme più limitate. 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 clinica. Un altro esempio rilevante è rappresentato dall'utilizzo della PCR per JCV DNA su liquor nella diagnosi della PML. Questo esame ha in gran parte rimpiazzato l'uso della biopsia cerebrale come strumento diagnostico di scelta per porre diagnosi di PML, anche se sequenze virali sono identificabili solo in circa due terzi dei soggetti con questa patologia [6]. 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.

Considerazioni pratiche

Significato delle metodiche molecolari nelle infezioni meno frequenti del SNC

Nonostante il potenziale diagnostico delle metodiche molecolari sia ormai largamente dimostrato per diverse forme di encefaliti virali, come nel caso dell'encefalite erpetica, questo non è così chiaro per altre infezioni meno

frequenti, ad esempio quelle causate da arbovirus, od associate di malattie esantematiche virali quali 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, non è noto in che percentuale di casi con o senza malattia può essere rinvenuto il virus.

Interpretazione dei risultati ottenuti mediante amplificazione degli acidi nucleici

Accade, talvolta, che genomi virali vengano 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, il virus di Epstein-Barr è stato rinvenuto nel liquor di pazienti con encefalite erpetica o infezioni opportunistiche del SNC [6]. 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, per esempio, in pazienti con AIDS, in cui CMV può essere identificato nelle fasi precliniche di encefalite da CMV. Purché interpretati adeguatamente, questi riscontri possono risultare vantaggiosi, in quanto permettono di ottenere una diagnosi in fasi molto precoci. In questi casi, l'utilizzo delle metodiche quantitative può risultare utile per discriminare un'infezione clinicamente importante, accompagnata da importante replicazione virale, da un risultato accidentale.

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 proposito, è, inoltre, sempre da tenere presente la possibilità di risultati falsamente positivi, dovuti a "contaminazione" dei campioni stessi, anche se questa è molto bassa quando vengono applicate strette misure precauzionali durante tutte le fasi di manipolazione ed analisi del campione. Infine, risultati falsamente negativi possono essere osservati, seppur sporadicamente, in seguito alla presenza, nei campioni clinici, di inibitori, cioè di molecole in grado di compromettere il corretto funzionamento degli enzimi utilizzati nel processo di amplificazione.

Costi e benefici delle metodiche di amplificazione genica

Un potenziale svantaggio delle metodiche di amplificazione genica è rappresentato dai costi relativamente elevati. Si calcola 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 rivelazione dei prodotti di amplificazione, o utilizzando protocolli per l'analisi contemporanea di più agenti infettivi, come le PCR *multiplex*.

Indipendentemente dalle tecniche impiegate, ottenere una diagnosi rapida di infezione del SNC 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. È 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 negativa [10].

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 sono raramente disponibili campioni *standard* di riferimento per valutare la sensibilità delle metodiche a livello dei singoli laboratori. 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 di controllo di qualità (QC) delle procedure di amplificazione per i principali virus responsabili di infezioni del SNC, basati sull'uso di "pannelli diagnostici" costituiti da campioni contenenti quantità note di acidi nucleici, che vengono distribuiti ai laboratori partecipanti, ed analizzati in cieco.

In generale, l'analisi dei risultati ha rivelato differenze rilevanti tra i singoli laboratori, soprattutto nei campioni

contenenti basse concentrazioni di acidi nucleici, differenze in genere non associate all'utilizzo di metodiche commerciali o "casalinghe". Inoltre, non infrequentemente sono stati riportati risultati falsamente positivi [11]. È quindi evidente che, nonostante i notevoli progressi ottenuti, l'ottimizzazione e la standardizzazione delle metodiche molecolari per l'analisi del liquor rappresentano un obiettivo ancora da raggiungere. Conseguire questo obiettivo è tuttavia necessario per rendere i test molecolari altamente affidabili, indipendentemente dalle condizioni in cui vengono eseguiti.

Bibliografia

1. Tang YW, Persing DH (1999) Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Tenover FC, Tenover RH (eds) Manual of clinical microbiology, American Society for Microbiology. Washington D.C. , pp215-244
2. Preiser W, Elzinger B, Brink NS (2000) Quantitative molecular virology in patient management. *J Clin Pathol* 53:76-83
3. Niesters HG (2002) Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 25[Suppl 3]:S3-12
4. Cinque P, Bossolasco S, Lundqvist A (2003) Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 26:1-28
5. Cinque P, Cleator GM, Weber T, Monteyne P, Sindic CJ, van Loon AM (1996) 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* 61:339-345
6. Cinque P, Scarpellini P, Vago L, Linde A, Lazzarin A (1997) Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS* 11:1-17
7. Domingues RB, Lakeman FD, Mayo MS, Whitley RJ (1998) Application of competitive PCR to cerebrospinal fluid samples from patients with herpes simplex encephalitis. *J Clin Microbiol* 36:2229-2234
8. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS et al (2000) Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 38:4066-4071
9. Cinque P, Bestetti A, Morelli P, Presi S (2000) Molecular analysis of cerebrospinal fluid: potential for the study of HIV-1 infection of the central nervous system. *J Neurovirol* 6[Suppl 1]:S95-S102
10. Tebas P, Nease RF, Storch GA (1998) Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of herpes simplex encephalitis: a decision analysis model. *Am J Med* 105:287-295
11. Schloss L, van Loon AM, Cinque P et al (2003) An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. *J Clin Virol* (*in press*)