

VİRAL MENİNGOENSEFALİT ŞÜPHELİ HASTALARDA HERPES SİMPEKS VİRUSUNUN MOLEKÜLER VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF HERPES SIMPLEX VIRUS IN VIRAL MENINGOENCEPHALITIS SUSPECTED CASES USING MOLECULAR AND SEROLOGICAL METHODS

Alper AKÇALI¹, Etem ÖZKAYA¹, Deniz YILMAZ², Yavuz UYAR¹, Özgür ÖNCÜL³

¹ Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara. (aakcali@isnet.net.tr)

² Dr. Sami Ulus Çocuk Hastanesi, Nöroloji Kliniği, Ankara.

³ Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Merkez Laboratuvarı, Ankara.

ÖZET

Antiviral tedavinin başlanmadığı herpes simpleks virus (HSV) meningoensefalitlerinde mortalite oranı yüksektir. Bu nedenle HSV meningoensefalitlerinde hızlı tanı önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, viral meningoensefalit ön tanılı hastalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve intratekal antikor sentezi ile HSV saptanmasının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bakteriyolojik kültürlerde üreme tespit edilmemiş, beyin omurilik sıvısı (BOS) mikroskopik ve biyokimyasal bulguları viral meningoensefalit ile uyumlu toplam 17 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Etken olarak BOS'da HSV'nin saptanabilmesi için Vero hücrelerinde kültür ve HSV-1, HSV-2 için ayrı ayrı primerlerin kullanıldığı (sırasıyla; US7 ve US2 bölgelerine özgül) PCR yöntemi uygulanmıştır. Hastalardan BOS örneği ile eş zamanlı alınmış olan serum örneklerinde, intratekal HSV antikor sentezinin araştırılması için "Reibergram" grafikleri ve antikor indeksi (AI) hesaplama yöntemi kullanılmıştır. Reibergram grafiklerini elde etmek için nefelometrik olarak (Dade-Behring, Almanya) serum ve BOS örneklerinde albumin ve total IgG değerleri belirlenmiş ve albumin ile IgG oranları hesaplanmıştır. AI belirlenmesi amacıyla, ELISA (HSV-1/2 Pool; Antibody Determination in CSF, Euroimmun, Almanya) ile serum ve BOS örneklerinde HSV 1+2 IgG düzeyleri kantitatif olarak araştırılmıştır. Semptomların başlangıcından bir hafta sonra BOS örneği alınmış olan bir hastada hem hücre kültüründen HSV-2 izole edilmiş, hem de PCR ile HSV-2 DNA'sı saptanmıştır. Bu olguda intratekal antikor sentezi saptanmamıştır. Üç haftadan uzun süredir semptomları olan iki hastanın BOS örneklerinde ise Reibergramlarda intratekal IgG sentezi saptanmış ve patolojik intratekal HSV AI (sırasıyla; 27.9 ve 7.9) tespit edilmiştir; ancak bu hastalarda virus izolasyonu ve PCR ile HSV-DNA saptanması mümkün olmamıştır. Diğer 14 hastada ise HSV varlığı (kültür veya PCR ile) ya da intratekal antikor sentezi tespit edilememiştir. HSV meningoensefalitinin tanısı, aynı günde sonuç alınabilen ve son yıllarda altın standart olarak kabul edilen PCR ile konulabilmektedir. Ancak, kliniğin başlamasından bir haftadan sonra alınacak BOS örneklerinde PCR ile HSV tespit olasılığı azalmaktadır. Sonuç olarak meningoensefalit hastalarının erken dönemlerinde BOS'da PCR ile HSV-DNA araştırılmasını, ilerleyen dönemde ise tanıda intratekal antikor tespitinin de dikkate alınması gerektiğini önermekteyiz.

Anahtar sözcükler: Meningoensefalit, herpes simpleks virus, beyin omurilik sıvısı, polimeraz zincir reaksiyonu, antikor indeksi, Reibergram.

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) meningoencephalitis has a high mortality rate if proper antiviral therapy is not applied. Thus rapid diagnosis is of peculiar importance in such cases. In this study we aimed to evaluate the use of polymerase chain reaction (PCR) and detection of intrathecally synthesized antibodies by serological methods in viral meningoencephalitis suspected cases to determine HSV as the causative agent. Seventeen cases with cerebrospinal fluid (CSF) samples with microscopical and biochemical findings compatible with viral encephalitis were included in this study. CSF samples yielded no bacterial growth. Cell cultures propagated in Vero cell line and PCR with different primer sets against HSV-1 and HSV-2 (specific for US7 and US2 gene regions, respectively) were used to investigate the presence of HSV in CSF. Serum samples were taken simultaneously with the CSF sampling and "Reibergram" graphics and antibody index (AI) calculations were used for the evaluation of intrathecal antibody synthesis. Albumin and total IgG levels in serum and CSF samples measured with nephelometry (Dade-Behring, Germany) for Reibergram graphics, albumin and IgG ratios were calculated. Quantitative levels of HSV 1+2 IgG were measured in serum and CSF samples using ELISA (HSV-1/2 Pool; Antibody Determination in CSF, Euroimmun, Germany) for AI determination. One of the CSF samples obtained one week after the neurological symptoms had started, yielded HSV-2 in cell culture and also HSV-2 DNA was detected by PCR. Intrathecal antibody synthesis was not detected in this case. In two cases with symptoms lasting for more than three weeks, intrathecal IgG synthesis in Reibergrams and pathological intrathecal HSV AI (27.9 and 7.9, respectively) were detected, however, virus isolation and PCR detection were not successful. For the other 14 cases, HSV-DNA were found negative and no intrathecal antibody synthesis were detected. HSV meningoencephalitis can be diagnosed via using PCR which has been accepted as gold standard in recent years, with 24 hours turn-around time. However, if CSF samples were taken later than the first week following the beginning of symptoms, possibility of HSV detection by PCR is lowered. According to the data obtained from this limited study, it may be suggested that PCR may be used for the detection of HSV-DNA in CSF samples during the early phase of meningoencephalitis cases, however, consideration must be taken to detect the intrathecal antibodies during the later phases of the infection where intrathecal antibody synthesis starts.

Key words: Meningoencephalitis, herpes simplex virus, cerebrospinal fluid, polymerase chain reaction, antibody index, Reibergram.

GİRİŞ

Herpesviridae ailesi, alfa-herpesvirus alt ailesi içinde yer alan zarflı, ikozahedral simetrikli ve çift zincirli DNA içeren herpes simpleks viruslar (HSV), tip 1 (HSV-1) ve tip 2 (HSV-2) nörotropik virusları içermektedir^{1,2}. HSV primer veya tekrarlayan nörolojik enfeksiyonlarının tanısı temel olarak laboratuvara dayalıdır³. Santral sinir sistemi HSV enfeksiyonu tanısında, HSV DNA'sının beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir^{2,4}. PCR pozitif sonuçlar sıklıkla akut veya devam etmekte olan enfeksiyonla uyumludur. Ancak subakut (yedi günden uzun süreli) veya kronik enfeksiyonlarda, PCR sonuçlarının çoğunlukla negatif olduğu hastalarda intratekal immün yanıt sonucunda gelişen intratekal antikör sentezinin saptanması mümkün olmaktadır⁵⁻⁷.

Intratekal immün yanıtın saptanmasında kalitatif yöntemlerin yanında kantitatif yöntemlerin kullanılması objektif bir bilgi vermektedir. Kantitatif amaçlı birçok yöntem olmasına karşılık kan-BOS arasındaki akışta proteinlerin moleküler boyutlarının temel alındığı Reiber'in önerdiği hiperbolik fonksiyonun kullanıldığı yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü

daha yüksektir⁸. Oluşturulan grafiklerin (Reibergram) kullanılması, görsel değerlendirme ile kullanım kolaylığı sunmaktadır^{8,9}. Bunun yanında etkene özgül antikorların ELISA ile kantitasyonu sonucu hesaplanan antikor indeksi (AI), etkenin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Ancak BOS örneklerinde, serumdan geçen antikorların ayırt edilebilmesi amacıyla serum ve BOS örneklerindeki albumin oranının da değerlendirilmesi gereklidir. Bu nedenle, intratekal antikor sentezinin tespit edilmesinde hastadan eş zamanlı olarak alınmış serum ve BOS örnek çiftlerinin birlikte analizi gereklidir¹⁰⁻¹².

Santral sinir sisteminin viral ve kronik enfeksiyonlarının tanısında, PCR tekniği ile birlikte özgül intratekal immün yanıtın saptanması kombinasyonunun, en güvenilir uygulama olduğu kabul edilmektedir^{6,7}. Çalışmamızda viral meningoensefalit şüpheli hastalarda bu yaklaşımın HSV tiplerinin araştırılması amacıyla kullanımının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi (RSHM) Viroloji Laboratuvarı'na gönderilen BOS örneklerinden bakteriyolojik kültürlerinde üreme tespit edilmemiş; baş ağrısı, ateş, bilinç bulanıklığı, nöbetler ve motor defisit gibi semptom ve bulguları ile viral meningoensefalit ön tanısı konulmuş 17 hastaya (10 erkek, 7 kız; yaş ortalaması 5.2 ± 4.1 yıl) ait eş zamanlı alınmış serum ve BOS örnekleri dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların BOS örnekleri makroskopik olarak berraktı. BOS örneklerinin mikroskopik incelemesinde lenfosit ağırlıklı minimal lökosit artışı ($5-300/\text{mm}^3$) ve biyokimyasal incelemesinde artmış protein düzeyi ($> 50 \text{ mg/dL}$) ile normal glikoz düzeyi bulundu.

Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

Çalışma için Vero hücrelerinin EMEM vasatı kullanılarak iki-üç günlük ve tek tabaka hücre kültür tüpleri hazırlandı. Her bir tüp için 200 µL örnek ekimi yapılarak, hücre kültürleri %5 CO₂ içeren inkübatörde 36°C'de agregasyon, genişlemiş, refraktil hücre odakları ile karakterize sitopatik etki (SPE) yönünden yedi gün boyunca izlendi². Vero hücreleri dondurulup çözöldükten sonra 2000 devirde beş dakika santrifüj edildi ve üst sıvılarında PCR yöntemi ile HSV-1 ve HSV-2 nükleik asitleri arandı. HSV nükleik asitleri saptananlar hücre kültürü için pozitif olarak kabul edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Üst sıvıları ayrılan BOS örneklerinden 100'er µL alınarak alkali-fenol-kloroform yöntemi ile DNA ekstraksiyon işlemi yapıldı¹³. Ekstraksiyon sonrası elde edilen ürün 50 µL steril distile su ile sulandırıldı. HSV-1 için US7 bölgesine özgül 5'-GCGACCGACAGCACT-CAC-3' ve 5'-ACGTACACCCCGGCATAG-3' primer çifti; HSV-2 için US2 bölgesine özgül 5'-GTGGAATTCATGGGCGTTGTTGTTGTAAGT-3' ve 5'-CGACACCGCTCGAGCGTGTA-ATG-3' primer çifti kullanıldı. Her örnek için 40 µL "master miks" solüsyonu (1.5 U Taq DNA polimeraz, 200 µM deoks nükleozid trifosfat-dNTP - karışımı, 1.5 mM MgCl₂ ve her bir HSV primerinden 0.5 µM) hazırlandı. Ekstraksiyon ürününün 10 µL'si "master miks"

solüsyonu ile karıştırıldı. PCR işlemi ısı döngü cihazında (Perkin Elmer 9700, ABD) 40 döngü (95°C - 40 saniye denatürasyon, 58°C- 40 saniye annealing, 72°C- 50 saniye uzama) uygulanarak yapıldı. Pozitif kontrol olarak referans HSV-1 ve HSV-2 virusları (RIVM Institute, Hollanda) kullanıldı. Elde edilen PCR ürünleri elektroforez ile etidyum bromür (0.5 µg/mL) içeren %2'lik agaroz jelde görüntülendi. Elektroforezde elde edilen bant büyüklükleri, HSV-1 için 110 baz çifti (bp), HSV-2 için 185 bp idi.

Intratekal Antikor Sentezinin Tespiti

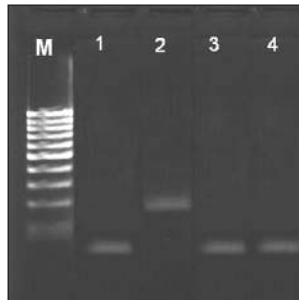
Serum total IgG, serum albumin, BOS'da total IgG ve albumin değerleri nefelometre (BN ProSpec, Dade-Behring, Almanya) ile ölçüldü. Q IgG (IgG BOS/IgG serum) ve Q Alb (Albumin BOS/albumin serum) oranları hesaplandı, Reibergram Tutorial (versiyon 0.1) programı (www.wormek.de) kullanılarak Reibergramları oluşturuldu. Reibergramda sınır çizgisinin üstünde yer alan örneklerde intratekal IgG sentezlendiği kabul edildi¹¹. Bu örneklerde HSV tiplerine özgül antikorlar ELISA ile araştırıldı.

BOS ve serumdaki HSV 1+2 IgG düzeyleri, üretici firmanın BOS'da Al hesaplanması amacıyla standardize ettiği ticari ELISA kiti (Herpes simplex virus, HSV-1/2 Pool; Anti-body Determination in CSF, Euroimmun, Almanya) ile çalışıldı. ELISA okuyucusunda optik dansite değerleri en yüksek kalibratörünkünden daha yüksek okunan örnekler, BOS için 1:12, serum için 1:1000 olmak üzere ileri dilüsyonlarının kullanılmasıyla tekrar çalışıldı ve kantitasyon bu dilüsyonlar göz önüne alınarak yapıldı. Elde edilen antikor değerleri kullanılarak Q IgG HSV (IgG BOS HSV/IgG serum HSV) oranı şu formüle göre hesaplandı: $Q_{lim} \text{ IgG} = 0.93 \times [(Q_{Alb})^2 + 6 \times 10^{-6}]^{1/2} - 1.7 \times 10^{-3}$; (Qlim: IgG için limit oran).

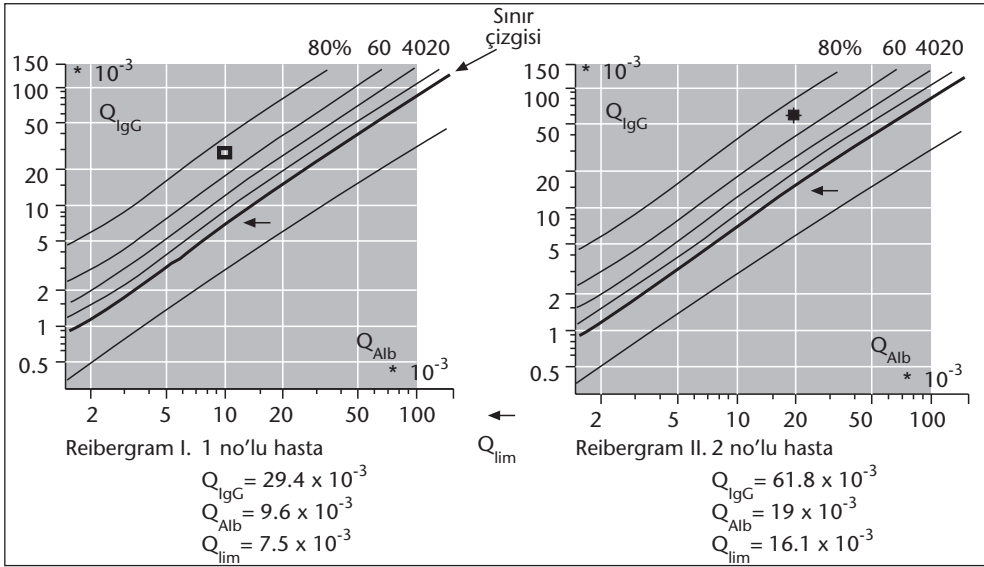
Q IgG değeri Qlim IgG değerinden büyük olan örneklerde, HSV Al= Q IgG HSV/Qlim IgG formülü kullanılarak; diğer örneklerde ise HSV Al= Q IgG HSV/Q IgG oranı kullanılarak hesaplandı. HSV Al > 1.5 olanlar özgül intratekal antikor üretimi için anlamlı kabul edildi^{10,11}.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 17 hastaya ait BOS örneklerinden birisinde PCR yöntemi ile HSV-2 DNA'sı saptanmıştır (Resim 1). Aynı örnekten hücre kültüründe de HSV-2 izole edilmiş, ancak bu hastada intratekal antikor sentezi saptanamamıştır. İki hastada ise Reibergram-



Resim 1. HSV-2 PCR jel görüntüsü. M: Moleküler standart; Hat 1,3,4: Negatif örnek; Hat 2: Pozitif örnek.



Şekil 1. İntratekal antikor sentezi saptanan hastaların Reibergramları.

larda intratekal IgG antikor sentezi saptanmıştır (Şekil 1). Bu hastalarda HSV-1/2 Al'leri sırasıyla 27.9 (1 no'lu hasta) ve 7.9 (2 no'lu hasta) olarak hesaplanmıştır. Bu iki hastanın BOS örneğinde PCR ve hücre kültürü ile HSV saptanamamıştır.

Çalışmamızdaki diğer 14 hastanın BOS örneğinde ise PCR ve hücre kültürü ile HSV saptanamamıştır. Ayrıca, bu olgularda HSV için intratekal antikor sentezi de tespit edilmemiştir.

TARTIŞMA

HSV özellikle yenidoğanlar, çocuklar ve erişkinlerde ensefalit ve viral menenjit etkenidir. HSV'ye bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonlarında antiviral tedavi uygulanmadığında değişik yaş gruplarında farklı olmak üzere mortalite %50 ile %85 arasında değişmektedir¹⁴. Mortalite oranı yüksek olduğundan laboratuvar tanısının hızlı bir şekilde konulması ve acilen tedaviye başlanması gerekmektedir. Mikrobiyolojik tanıda invazif bir yöntem olan beyin biyopsisi örneklerinin incelenmesi, artık yerini BOS örneklerinde PCR ile HSV-DNA araştırılmasına bırakmıştır. Bunun yanında intratekal antikor sentezinin araştırılması da tanıyı destekleyici bir yöntemdir. Uzun süre gerektirdiğinden ve özellikle çocuk yaş grubunda izolasyon şansı düşük olduğundan hücre kültüründe virus izolasyonu yöntemi pek tercih edilmemektedir^{7,15}. PCR metodu 24 saatten daha kısa sürede sonuçlandırılabilir kadar hızlı ve nispeten çok pahalı olmayan bir metoddur. Bunun yanında kültür ile viral etkenin saptanması 28 güne kadar uzayabilmektedir. Klasik kültür yöntemleri, hastanın çok düşük dozda dahi antiviral tedavi alması durumunda negatif sonuç verebilir. Buna karşılık PCR ile kısa süreli antiviral tedavi sonrasında da etkenin nükleik asitlerini saptamak olasıdır¹⁶.

Günümüzde HSV ensefaliti tanısında, BOS örneklerinde PCR çalışılması altın standart olarak kabul edilmekte ve duyarlılığın yaklaşık %96, özgüllüğün ise %99 olduğu bildirilmektedir^{7,15}. Ancak PCR yönteminde, yanlış negatif sonuçlara veya düşük duyarlılığa yol açan bazı faktörler (BOS örneğinin çok erken dönemde alınmış olması, düşük viral yük, örnek kaynaklı PCR inhibitörleri, antiviral tedavinin başlanmış olması vb.) sonuçları etkileyebilir^{15,16}. Çalışmamızdaki 16 hastada PCR ile HSV-DNA saptanamamasında bu faktörler rol oynamış olabilir. Intratekal antikor üretimi saptanan iki olgu, Ankara dışından asiklovir başlanarak sevk edilmiş hastalardır ve çalışmamızda kullanılan örnekleri, klinik bulguların üçüncü haftasında alınmıştır. Bu olgularda PCR ile HSV-DNA'sı saptanamamasının sebebi, büyük olasılıkla hastalığın ileri döneminde BOS örneğinin alınmış olmasıdır. Bununla birlikte antiviral tedavi başlanmış olması da etkileyici faktörler arasında düşünülebilir.

İnsanlarda HSV ile beraber 100'ün üzerinde virusun akut viral ensefalite yol açtığı bilinmektedir. Bunlar arasında enteroviruslar, diğer herpesviruslar (sitomegalovirus, Epstein-Barr virus, HHV-6, varisella zoster virus), JC virus, arboviruslar (başta Batı Nil virusu olmak üzere), kızamık virusu, kabakulak virusu ve adenoviruslar en önemlileri olarak sayılabilir¹⁶. Bu etkenlerle oluşan klinik tablolar ajana özgü olarak pek farklılık göstermediğinden, hastanın kliniği ile etkeni belirlemek çoğunlukla mümkün değildir^{7,15,16}. Bizim çalışmamızda, HSV-DNA'sının gösterilemediği olgularda, diğer viral etkenlerin rolü olabileceği olasıdır. Bu nedenle, viral meningoensefalit düşünülen hastalarda etyolojinin açıklanabilmesi amacıyla, ülke epidemiyolojisi düşünülerek bir panelin oluşturulması ve hasta örneklerinde bu etkenlerin araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Santral sinir sisteminde HSV'nin araştırılması için yapılan çalışmalarda, olguların büyük çoğunluğunda hastalığın erken döneminde BOS örneğinde HSV-DNA'sı saptanamamasının mümkün olduğu, geç evrede intratekal antikor sentezinin saptandığı bildirilmiştir^{5,17-19}. Monteyne ve arkadaşlarının¹⁷ inceledikleri 13 hastanın 11'inde, semptomların başlangıcından en geç 12. güne kadar BOS'da HSV-DNA saptanırken, intratekal HSV antikor sentezi bir hasta dışında en erken sekizinci günde saptanmıştır. Yedi hastada ise PCR pozitifken intratekal antikor sentezi tespit edilmiştir¹⁷. Sauerbrei ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasında ise, 631 hastadan 15'inin BOS örneğinde nörolojik semptomların başlangıcından sonraki 3-12. günde (ortanca 7.3 gün) HSV-DNA'sı saptanırken, bu hastaların hiçbirinde intratekal HSV antikor sentezi saptanmamıştır. Buna karşın hastaların %2.1 (13/624)'inde nörolojik semptomların başlangıcından sonraki 14 gün-3 ay sonra (ortanca 34 gün) intratekal HSV antikor sentezi saptanmış; bu hastaların hiçbirinin BOS örneğinde HSV-DNA'sı belirlenmemiştir. Sindic ve arkadaşlarının⁵ çalışmasında, 27 hastanın BOS örneğinde dokuzuncu güne kadar HSV-DNA'sı saptanmış, 9 ile 12. günlerde PCR pozitifliği yanında intratekal antikor sentezi de tespit edilmiştir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ise HSV-DNA'sı negatifleşirken, intratekal antikor sentezinin devam ettiği bildirilmiştir⁵. Denne ve arkadaşlarının¹⁹ retrospektif çalışmasında, 25 hastanın dokuzunda HSV A1 pozitif bulunmuş ve bu hastalardan sadece ikisinde eş zamanlı olarak PCR ile HSV saptanabilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 17 hastanın sadece birinde HSV-2-DNA'sı tespit edilmiştir. Bu hastanın örnekleri semptomların başlangıcından sonraki yedinci günde

alınmış olup, hastada intratekal antikor sentezi saptanamamıştır. Çalışmamızda semptomların başlangıcından üç hafta sonra BOS örneği alınmış iki hastada intratekal antikor sentezi tespit edilmiş olup, bu hastalara ait BOS örneklerinde HSV-DNA'sı saptanamamıştır. Bizim çalışmamızda da literatürde bildirildiği gibi, erken dönemde PCR pozitifliğinin saptanabildiği, özellikle ilerleyen dönemde ise intratekal antikor tespitinin mümkün olabildiği görülmektedir. Ayrıca Reibergramların intratekal antikor sentezinin tespitinde kullanışlı olduğunu da belirtmek gereklidir. Eş zamanlı alınmış serum ve BOS örnek çiftlerinde sadece albumin ve total IgG değerlerinin ölçümüyle oluşturulan grafiklerde sınır çizgisini geçen örneklerde intratekal antikor sentezi varlığının görülmesi pratik uygulamada çok kullanışlı olacaktır.

Santral sinir sistemi HSV enfeksiyonu şüpheli olgularda, BOS örneğinde eğer mümkünse PCR ile hemen HSV-DNA'sı araştırılmalıdır. Intratekal antikor sentezi tespiti semptomların başlangıcından sonraki ilk haftada sıklıkla mümkün olmamaktadır. Ancak HSV-DNA'sı saptanamamış ve özellikle nörolojik semptomların başlangıcından uzun süre geçmiş olgularda, intratekal antikor sentezinin tespitine yönelik araştırmaların da yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, hastaların klinik özellikleri de göz önüne alınarak her iki yöntemin kombinasyonunun tanıda en doğru yaklaşım olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Whitley RJ. Herpes simplex virus, pp: 2461-510. In: Knipe DM, Howly PM (eds), Virology. 2001. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ustaçelebi S. Diagnosis of herpes simplex virus infections. J Clin Virol 2001; 21: 255-9.
- Linde A, Klapper PE, Monteyne P, 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.
- Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. J Clin Virol 2002; 25(Suppl 1): 45-51.
- Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffette S. Clinical relevance of polymerase chain reaction (PCR) assays and antigen-driven immunoblots for the diagnosis of neurological infectious diseases. Brain Res Bull 2003; 61: 299-308.
- Shultze D, Weder B, Cassinotti P, Vitel L, Krausse K, Fierz W. Diagnostic significance of intrathecally produced herpes simplex and varicella-zoster virus-specific antibodies in central nervous system infections. Swiss Med Wkly 2004; 134: 700-4.
- Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, et al. Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. Eur J Neurol 2005; 12: 331-43.
- Reiber H. The discrimination between different blood CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. J Neurol 1980; 224: 89-99.
- Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: Knowledge base and interpretation software. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 324-32.
- Reiber H, Lange P. Quantification of virus specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. Clin Chem 1991; 37: 1153-60.
- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J Neurol Sci 2001; 184: 101-22.
- Monteyne P, Albert F, Weissbrich B, et al. The detection of intrathecal synthesis of anti-herpes simplex IgG antibodies: comparison between an antigen-mediated immunoblotting technique and antibody index calculations. J Med Virol 1997; 53: 324-31.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Annal Biochem 1987; 162: 156-9.

14. Barnes DW, Whitley RJ. CNS diseases associated with varicella zoster virus and herpes simplex virus infection: pathogenesis and current therapy. *Neurol Clin* 1986; 4: 265-83.
15. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11(Suppl 2): 48A-56A.
16. DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17: 903-25.
17. Monteyne P, Laterre EC, Sindic CJ. Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2: determination by polymerase chain reaction and detection of intrathecal virus-specific oligoclonal antibodies. *Acta Neurol Belg* 1997; 97: 233-9.
18. Sauerbrei A, Eichhorn U, Hottenrott G, Wutzler P. Virological diagnosis of herpes simplex encephalitis. *J Clin Virol* 2000; 17: 31-6.
19. Denne C, Kleines M, Dieckhöfer A, et al. Intrathecal synthesis of anti-viral antibodies in pediatric patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11: 29-34.