

## Utilidad diagnóstica de la amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP) para la detección de ADN de citomegalovirus, Epstein Barr y herpes simple 1 y 2 en muestras biológicas: revisión sistemática

Diagnostic utility of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of cytomegalovirus DNA, Epstein Barr and herpes simplex 1 and 2 in biological samples: a systematic review

Olga L. Rincón-Caballero\*, Beatriz H. Aristizábal-Bernal†

### RESUMEN

#### INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales generan una importante morbimortalidad en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes. La realización de un diagnóstico etiológico precoz ofrece grandes ventajas en el tratamiento de los pacientes, teniendo en cuenta que el tratamiento antiviral apropiado y oportuno puede mejorar el pronóstico. Este artículo muestra la utilidad diagnóstica de la amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP, por su sigla del inglés) para la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) de citomegalovirus, Epstein Barr y herpes simple 1 y 2, a partir de muestras biológicas.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló una rigurosa revisión sistemática de la literatura científica publicada en el tema durante los años 2000 a 2009, en diferentes bases de datos. Dos investigadores, de manera independiente, aplicaron los criterios de inclusión y exclusión definidos para los artículos y, al final, se consideraron tres estudios para el análisis de los datos.

#### RESULTADOS

Los hallazgos demuestran las facilidades de implementación que tiene la prueba LAMP sobre su predecesor la PCR; además de su buen desempeño, con una sensibilidad del 80% al 86%, especificidad del 85,7% al 100%, valor predictivo positivo del 66,7% al 100% y valor predictivo negativo del 90% al 99,4%.

#### DISCUSIÓN

Según los estudios publicados donde se trabaja con la prueba LAMP, esta prueba se comporta como una herramienta molecular diagnóstica similar a la PCR en tiempo real, en términos de sensibilidad y especificidad, lo que fue demostrado también en los estudios seleccionados para esta revisión, al probar muestras similares por ambas metodologías. Hay aún muy pocos estudios originales acerca de la utilidad de la LAMP; no obstante, esta revisión representa una novedad en el tema y aporta claridad sobre las aplicaciones reales y válidas de la prueba LAMP.

#### PALABRAS CLAVES

Amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP). Citomegalovirus. Epstein Barr virus. Herpesvirus humano 1. Herpesvirus humano 2. Herpesvirus humano 4. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

\*Bacterióloga y Laboratorista clínica, Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe. Investigadora del Centro de Epidemiología y Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas, EDIMEI. †Coordinadora Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe. Investigadora Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Investigadora del Centro de Epidemiología y Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas, EDIMEI. Contacto: Olga Rincón, [olrincon@hptu.org.co](mailto:olrincon@hptu.org.co)  
Recepción: 09-03-2010. Aceptación: 8-04-2010.

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Viral infections cause significant morbidity and mortality in immunocompromised and non-immunocompromised individuals. The completion of an early etiologic diagnosis offers great advantages in the treatment of patients, as appropriate and timely antiviral treatment may improve prognosis. This article demonstrates the diagnostic utility of the Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of deoxyribonucleic acid (DNA) of cytomegalovirus, Epstein Barr and herpes simplex 1 and 2 from biological samples.

### MATERIALS AND METHODS

We developed a rigorous systematic review of scientific literature on the subject during the years 2000 to 2009, using different databases. The inclusion and exclusion criteria defined for the articles were applied independently by two investigators and, finally, three studies were considered for data analysis.

### RESULTS

The findings show a simple, rapid method for detecting microorganism by LAMP test when compared with its predecessor PCR assay. In addition, the test has a good performance with a sensitivity of 80% to 86%, specificity of 85.7% to 100%, positive predictive value of 66.7% to 100% and negative predictive value of 90% to 99.4%.

### DISCUSSION

According to published studies where the LAMP assay was used, this test is a molecular diagnostic tool similar to real-time PCR in terms of sensitivity and specificity, as demonstrated also in the studies selected for this review. The assay was evaluated using clinical samples and the results indicated the suitability and simplicity of the test as a rapid, field diagnostic tool. There are still very few original studies on the usefulness of the LAMP assay, however, this review presents a contribution to the field and provides clarity on the real and valid applications of the LAMP test.

### KEY WORDS

Cytomegalovirus. Human herpesvirus 1 and 2. Human herpesvirus 4. Epstein Barr virus. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Nucleic acid amplification techniques.

## INTRODUCCIÓN

Aunque existen grandes avances en las ciencias médicas y en la innovación de las pruebas diagnósticas, las enfermedades infecciosas continúan afectando a millones de personas alrededor del mundo, especialmente en países en vía de desarrollo.<sup>1</sup> Entre los agentes causales de dichas enfermedades se encuentran los virus, importantes patógenos humanos, con una considerable morbimortalidad. Las observaciones clínicas permiten una aproximación al diagnóstico de muchas de estas enfermedades virales y su diferenciación, pero se hace necesario el uso de herramientas moleculares para la detección de los genomas virales, las cuales son superiores a los métodos tradicionales de diagnóstico como el análisis serológico y el cultivo.<sup>2</sup>

El citomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV) y herpes simple 1 (HSV 1) y 2 (HSV 2), pertenecen a la familia herpesviridae, causantes de múltiples enfermedades en el humano. Son virus ADN de gran tamaño y ampliamente distribuidos en el mundo. Tras la infección primaria quedan en estado de latencia y pueden reactivarse por mecanismos no bien conocidos. La primoinfección es generalmente subclínica o leve, pero en sujetos inmunocomprometidos pueden causar enfermedad recidivante de evolución grave.<sup>3</sup> Se les reconoce como agentes etiológicos de infección en el sistema nervioso, debido a su tropismo neurológico.<sup>4</sup>

La infección congénita, causada por CMV, produce retraso psicomotor y sordera neurosensorial de origen infeccioso. Este virus tiene una alta incidencia de infección y esto hace que tenga gran importancia tanto en individuos inmunocomprometidos como en inmunocompetentes. El compromiso del sistema nervioso central (SNC) por CMV en adultos inmunocompetentes es excepcional, pero es un patógeno que afecta con frecuencia a pacientes inmunocomprometidos como los pacientes con sida, receptores de trasplantes, pacientes oncológicos o con tratamientos prolongados con esteroides.<sup>5,6</sup>

El EBV está implicado en infecciones postrasplante y está asociado a casos severos de malignidad.<sup>7</sup> Así mismo, está ampliamente distribuido en la población mundial, habitualmente se adquiere a temprana edad en países en desarrollo y durante la adolescencia en países desarrollados. Es causante de la mononucleosis infecciosa y también se asocia a cuadros de meningitis

y encefalitis. La mayor parte de los individuos infectados excretan el virus por la saliva durante semanas o meses, en forma continua o intermitente.<sup>8</sup>

Por otra parte, los virus HSV 1 y 2 son importantes patógenos humanos causantes de enfermedades en la piel como herpes labial y genital, e infecciones en SNC como encefalitis herpética y herpes neonatal.<sup>9</sup> Se caracterizan por un corto ciclo reproductivo, causan destrucción de las células del hospedero y tienen la capacidad de establecer latencia. Las infecciones del SNC, debidas a estos virus, se asocian a una significativa morbilidad y mortalidad a pesar de la terapia antiviral existente.<sup>10</sup>

La amplia variedad de enfermedades presentadas por estos virus y su impacto en la salud, hace necesario el diagnóstico rápido debido al beneficio directo en el tratamiento del paciente.<sup>11</sup> Las pruebas diagnósticas tradicionales como el rastreo de anticuerpos y el aislamiento del virus en cultivo celular resultan poco oportunas y con baja sensibilidad,<sup>12,13</sup> comparadas con las pruebas moleculares, entre ellas la amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP, por su sigla en inglés), que puede identificar de manera cualitativa o cuantitativa el ADN del agente viral causante de infección.<sup>14</sup>

La LAMP es una prueba molecular reportada por primera vez por Notomi et al., en el año 2000, su rapidez, sensibilidad, exactitud y su fácil implementación en laboratorios no especializados, permite que se convierta en una prueba molecular costoefectiva ideal para el diagnóstico de las infecciones virales en los países en desarrollo.<sup>11</sup>

El desarrollo de la metodología LAMP está dado por la amplificación de la secuencia específica del ADN con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas. La LAMP emplea una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la cadena, junto con dos iniciadores internos (FIP, BIP) y dos externos (F3, B3), los cuales reconocen seis regiones separadas dentro del ADN objetivo. La prueba de LAMP es altamente específica porque la reacción de amplificación ocurre sólo cuando las seis regiones dentro del ADN objetivo son correctamente reconocidas por los iniciadores.<sup>1</sup>

Como un primer paso, en la reacción de LAMP, se genera una estructura en forma de asa o bucle inicial, construida como material de partida. Subsecuentemente, un iniciador interno se hibrida con el asa y se

inicia la síntesis con el desplazamiento de la cadena de ADN. El producto final de la amplificación por LAMP corresponde al asa o bucle inicial con varias repeticiones invertidas del ADN objetivo, formando estructuras similares a coliflores con múltiples asas. Al final de la reacción, la presencia o ausencia del ADN objetivo se puede juzgar visualmente por la aparición de un precipitado blanco de pirofosfato de magnesio o de un color verde de la solución de tinte por SYBR Green I.<sup>15</sup>

La ventaja más significativa de la LAMP es la capacidad que tiene para amplificar secuencias específicas de ADN a una temperatura constante entre 63°C y 65°C, por lo que no se necesita de un termociclador. Así, esta técnica solo requiere un equipo simple y costoefectivo que pueden adquirirlo los laboratorios de primer nivel.<sup>16</sup>

La incorporación de iniciadores adicionales que aceleran y mejoran la sensibilidad de la reacción optimizó esta herramienta diagnóstica. Se puede realizar cuantificación del producto de reacción en tiempo real con el uso de un medidor de turbidez e incluso se puede lograr una mejor visualización con la utilización de calceína.<sup>1</sup>

El propósito de esta revisión sistemática es obtener la mejor evidencia disponible que permita conocer la utilidad diagnóstica de la amplificación isotérmica con la formación de asas para la detección de CMV, EBV y HSV 1 y 2 en muestras biológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener mayor información de la utilidad diagnóstica de la LAMP en la detección de CMV, EBV, HSV 1 y HSV 2 a partir de muestras biológicas, se realizó una revisión sistemática de la literatura en las siguientes bases de datos: *Dare* (base de datos para revisiones sistemáticas), *PubMed*, *Gateway*, *SpringerLink*, *ScienceDirect*, *Lilacs* (base de datos de literatura médica en America Latina y el Caribe) y *Scielo*.

Se establecieron como criterios de inclusión: trabajos originales que incluyeran la evaluación de la metodología LAMP frente a la PCR para la detección de ADN de CMV, EBV y HSV 1 y 2, a partir de muestras biológicas humanas y que se enfocaran en evaluar la utilidad diagnóstica de la LAMP en las infecciones virales. Como criterios de exclusión se definieron: artí-

culos de revisión, trabajos originales donde se identificaron virus diferentes a los del interés de esta revisión y estudios realizados en animales.

Adicionalmente, la búsqueda se limitó a artículos publicados entre los años 2000 y 2009, y solo los que estuviesen en idioma inglés o español.

Se emplearon los términos de búsqueda *Loop mediated isothermal amplification, human, virus, herpesvirus 1 y 2, citomegalovirus, epstein barr, sensitivity, specificity* y los operadores booleanos AND y OR.

Se consideraron elegibles los artículos que contenían al menos uno de los términos de búsqueda en su título.

Los artículos elegibles para su revisión completa, debían cumplir con los criterios de inclusión.

Después de la revisión completa de los artículos elegibles, se seleccionaron los que cumplían con los criterios de inclusión anteriores y los que consideraron la comparación en términos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, obtenidos con la LAMP frente al estándar de oro: la PCR en tiempo real.

El proceso de búsqueda en las distintas bases de datos lo realizaron dos investigadores de forma independiente. La exclusión de los artículos que no cumplían con los criterios de inclusión y calidad se hizo según análisis conjunto de los dos revisores.

## RESULTADOS

En la búsqueda inicial se hallaron 537 referencias, que contenían por lo menos uno de los términos de búsqueda.

**Tabla 1.** Número de artículos seleccionados por base de datos.

Base de datos	Número de artículos hallados	Artículos seleccionados
PubMed (Medline).	150	10
ScienceDirect.	279	5
NLM Gateway.	82	15
Scielo.	8	0
SpringerLink.	0	0
DARE.	0	0
LILACS.	18	3
TOTAL	537	33

da. Posteriormente, se hizo una selección con base en los títulos de los artículos y se eliminaron 504 referencias porque en el título aparecía algún criterio de exclusión o porque el mismo artículo aparecía en las diferentes bases de datos, resultando un total de 33 artículos elegibles para revisión del resumen de la publicación (tabla 1).

Una vez realizada esta revisión, se seleccionaron cuatro artículos para revisión total de la publicación de los cuales sólo tres cumplieron con todos los criterios de selección.<sup>17-19</sup> La razón para excluir uno de los artículos fue la ausencia de datos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos negativos y positivos.<sup>20</sup>

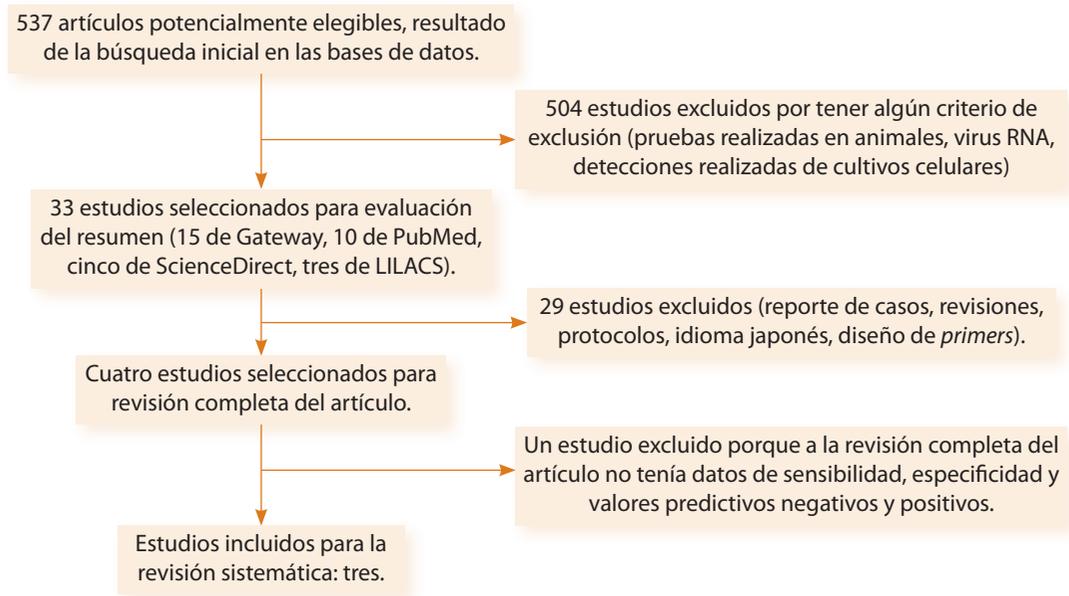
Esta revisión se llevó a cabo por dos investigadores independientes con miras a disminuir los sesgos por selección, tal metodología está descrita en diversas publicaciones científicas que dictan los lineamientos básicos para usuarios del área biomédica en la realización de revisiones (figura 1).

En los estudios incluidos, la detección viral se hizo en diferentes muestras biológicas. Un estudio procesó el líquido cefalorraquídeo de pacientes con sospecha de infección en SNC,<sup>17</sup> otro estudio utilizó sueros de pacientes con sospecha de infección primaria por EBV y frotis faríngeos que se obtuvieron en la fase aguda de la infección con EBV,<sup>18</sup> y en el otro estudio se trabajó a partir de muestras de sangre total proveniente de receptores pediátricos de transplante de medula ósea.<sup>19</sup> (tabla 2).

La detección del ADN viral por la LAMP, directamente de la muestra sin realizar previa extracción de ADN, se hizo solamente a partir de los frotis faríngeos, en los que se utilizó el agua donde se depositó el hisopo de la muestra. Las demás detecciones por la LAMP se realizaron con ADN obtenido previamente de cada una de las muestras, utilizando QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) como método de extracción.

Para la reacción de la LAMP en todos los estudios se utilizó *Loopamp DNA amplification kit* (Eiken Chemical, Tochigi, Japan) y los iniciadores específicos para cada virus. El tiempo empleado para la amplificación por LAMP fue de 40 minutos para la detección del ADN de CMV<sup>19</sup> y de 45 minutos para el de HSV 1, HSV 2 y EBV.<sup>17,18</sup>

Todos se compararon frente a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y se registraron los datos obtenidos de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de LAMP en cada uno de los estudios (tabla 2).



**Figura 1.** Selección de los estudios para la revisión: utilidad diagnóstica de la LAMP para la detección de ADN de CMV, EBV, HSV 1 y HSV 2 en muestras biológicas.

**Tabla 2.** Muestras y resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de LAMP en los diferentes estudios.

Estudio	Tipo de muestra	Número de muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
Kimura et al. <sup>[17]</sup>	LCR.	69	81	100	100	90
Iwata et al. <sup>[18]</sup>	Suero.	108	86	100	100	91,4
	Frotis faríngeos.	51	81,3	85,7	72,2	90,9
Suzuki et al. <sup>[19]</sup>	Sangre total.	180	80	98,9	66,7	99,4

**VPP:** valor predictivo positivo. **VPN:** valor predictivo negativo.

La determinación del límite de detección de LAMP, comprendido como el número mínimo de copias detectadas para cada uno de los virus, se realizó por medio de diluciones de plásmidos control detectados por ensayo de turbidez y electroforesis. Para EBV, el número mínimo de copias detectadas fue 100, pero al precalentar el ADN a 96°C por 30 segundos, antes de adicionar la polimerasa, se pudo detectar un mínimo de cinco copias. En CMV y HSV 1, el número mínimo de copias detectadas por tubo de reacción fue 500, y para HSV 2 fue 1.000.

## DISCUSIÓN

La dificultad para la identificación de los virus como agentes causales de enfermedad, deja, en varias ocasiones, un gran vacío diagnóstico. Tunkel et al., y Solbrig et al., describen cómo algunos casos de meningitis y encefalitis virales se diagnostican como meningitis aséptica, lo cual hace que el personal de salud las trate, principalmente, con medidas de soporte;<sup>21,22</sup> adicionalmente, Shankar et al., Ohta et al., y Persing et al., sugieren alertar sobre la importancia de un diag-

nóstico acertado, sobre todo, en los pacientes inmunocomprometidos, ya que esta población está en aumento y es más susceptible a infección meníngea<sup>23</sup> o en otros órganos.<sup>24,25</sup>

Con las ventajas mostradas por la LAMP se generan expectativas para el desarrollo de dicha metodología en Colombia. Esta revisión se elaboró con búsqueda sistemática para sustentar mejor las afirmaciones acerca de la verdadera utilidad de la LAMP, ya que la búsqueda rigurosa y metódica de la información disminuye considerablemente el riesgo de publicar información sesgada.

Aunque se han realizado un buen número de publicaciones con metodología sistemática, estos estudios no se han enfocado a uno solo o a unos pocos microorganismos, sino que la LAMP se prueba para múltiples patógenos, tanto en el humano como en los animales, y esto no permite hacer una buena homogenización de los datos para sacar conclusiones definitivas al respecto, lo cual representa una limitante para el análisis.

Con estas limitaciones se puede decir que, según los estudios donde se trabaja con la prueba LAMP, como los trabajos publicados por Kaneko et al., e Ihira et al., esta prueba se comporta como una herramienta molecular diagnóstica similar a la PCR en tiempo real, en términos de sensibilidad y especificidad,<sup>20,26</sup> lo que se demostró también en los estudios seleccionados para esta revisión, al probar las diferentes muestras por ambas metodologías.

Un hallazgo importante de esta revisión, y que se puede traducir como una mayor facilidad para la implementación de la LAMP, es la descripción, en los estudios de Enomoto et al., Suzuki et al., y Kaneko et al., de la amplificación del agente viral directamente de la muestra, sea ésta: plasma, frotis faríngeos o vesículas, sin hacer una extracción previa del ADN y donde no se pierde sensibilidad.<sup>16,18,20</sup>

En esta revisión sistemática se encontraron pocas publicaciones originales sobre el tema específico (la utilización de las pruebas tipo LAMP para el diagnóstico de CMV, EBV, HSV 1 y HSV 2) lo cual indica que son necesarios nuevos estudios experimentales que ayuden a validar la implementación segura en diferentes muestras biológicas como en el caso del LCR para el diagnóstico de las meningitis virales y en muestras sanguíneas para identificación de la infección y determinación del pronóstico.

La versatilidad de la LAMP, para ser utilizada en diferentes muestras biológicas, facilita el diagnóstico de enfermedades como la meningitis y encefalitis, donde el LCR es una muestra menos invasiva que la biopsia cerebral y requiere cantidades mínimas para su elaboración, con la obtención de mejores resultados al trabajar con un volumen de muestra de 100 a 200 microlitros del sedimento del LCR. En condiciones ideales se deben procesar muestras frescas, pero si esto no es posible, se ha demostrado que las muestras pueden almacenarse en congelación a -70°C por períodos largos, lo cual no afecta la detección del virus.<sup>26</sup>

La implementación de la LAMP como método molecular para el diagnóstico de las infecciones virales tiene la ventaja de no necesitar una infraestructura costosa para su montaje (caso contrario con la PCR) y obtener resultados oportunos con una buena sensibilidad y especificidad como se demuestra en los trabajos de Higashimoto et al. y Hagiwara et al., donde se hace la identificación del ADN viral del virus de la varicela y de varios genotipos del papilomavirus a partir de muestras biológicas humanas.<sup>27,28</sup>

La LAMP es rápida y simple; en 40 a 45 minutos, con la utilización de un bloque térmico a una temperatura constante entre 63°C y 65°C, se obtiene la amplificación del ADN de interés. Además, por las características en su diseño, la realización de la prueba no exige un número mínimo de muestras para realizar su montaje. Esto permitiría que se utilice dicha metodología en condiciones de campo, lo que se traduciría en una gran oportunidad para los países en vía de desarrollo y áreas rurales.

En una extensa búsqueda en varias bases de datos importantes, los autores no encontramos ninguna revisión sistemática acerca de la utilidad diagnóstica de la LAMP en el diagnóstico de las infecciones virales; por lo tanto, este artículo representa el primer paso para aportar claridad sobre las aplicaciones reales y válidas de esta prueba diagnóstica, demostradas en estudios primarios al respecto.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mori Y. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009 Apr; 15(2): 62-9.
2. Mandell G. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica.* Principios básicos en el diagnóstico y manejo de las enfermedades infecciosas. Sexta ed. Bennett J, Douglas, editors: ELSEVIER; 2006.
3. Fossum E. Friedel C. Rajagopala S. Titz B. Baiker A. Schmidt T. et al. Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog.* 2009 Sep; 5(9): e1000570.
4. Davis L. Tyler K. Molecular diagnosis of CNS viral infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Jan; 76(1): 10.
5. Weber B. Berger A. Rabenau H. Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant antigens for cytomegalovirus antibody detection. *J Virol Methods.* 2001 Aug; 96(2): 157-70.
6. Busse C. Strubel A. Schnitzler P. Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies. *J Clin Virol.* 2008 Oct; 43(2): 137-41.
7. Green M. Soltys K. Rowe D. Webber S. Mazareigos G. Chronic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2009 May; 13(3): 319-23.
8. Doja A. Bitnun A, Ford Jones E, Richardson S, Tellier R, Petric M, et al. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neurol.* 2006 May; 21(5): 384-91.
9. Watanabe D. Medical application of herpes simplex virus. *J Dermatol Sci.* 2010 Feb; 57(2): 75-82.
10. James S. Kimberlin D. Whitley R. Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections: neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* 2009 Sep; 83(3): 207-13.
11. Parida M. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *J Biosci.* 2008 Nov; 33(4): 617-28.
12. Soler CH. Detección de enterovirus mediante transcripción reversa y reacción de polimerasa en cadena en líquido cefalorraquídeo de niños con meningitis aséptica. *Revista Chilena de Infectología.* 2001; 18(3): 175-81.
13. Romero JR. Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Detection of the Enteroviruses. In: Medicine. AoPaL, editor.: Archives of Pathology and Laboratory Medicine; 1999. p. 1161-9.
14. Quereda C. Corral I. Laguna F. Valencia M. Tenorio A. Echeverría J. et al. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol.* 2000 Aug; 38(8): 3061-7.
15. Jin-Long Y. Rui Y. Anchun C. Mingshu W. Lizhi F. Songquan Y. et al. A simple and rapid method for detection of Goose Parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification. *Virol J.* 2010 Jan; 7: 14.
16. Enomoto Y. Yoshikawa T. Ihira M. Akimoto S. Miyake F. Usui C. et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol.* 2005 Feb; 43(2): 951-5.
17. Kimura H. Ihira M. Enomoto Y. Kawada J. Ito Y. Morishima T. et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. *Med Microbiol Immunol.* 2005 Aug; 194(4): 181-5.
18. Iwata S. Shibata Y. Kawada J. Hara S. Nishiyama Y. Morishima T. et al. Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol.* 2006 Oct; 37(2): 128-33.
19. Suzuki R. Yoshikawa T. Ihira M. Enomoto Y. Inagaki S. Matsumoto K. et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. *J Virol Methods.* 2006 Mar; 132(1-2): 216-21.
20. Kaneko H. Iida T. Aoki K. Ohno S. Suzutani T. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul; 43(7): 3290-6.
21. Tunkel A, Glaser C, Bloch K, Sejvar J, Marra C, Roos K, et al. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008 Aug; 47(3): 303-27.
22. Solbrig M. Hasso A. Jay C. CNS viruses-diagnostic approach. *Neuroimaging Clin N Am.* 2008 Feb; 18(1): 1-18; vii.
23. Shankar S. Mahadevan A. Kovoov J. Neuropathology of viral infections of the central nervous system. *Neuroimaging Clin N Am.* 2008 Feb; 18(1): 19-39; vii.
24. Ohta H. Fukushima N. Ozono K. Pediatric post-transplant lymphoproliferative disorder after cardiac transplantation. *Int J Hematol.* 2009 Sep; 90(2): 127-36.
25. Pershing S. Dunn J. Khan A. Liao Y. Cytomegalovirus infection with MRI signal abnormalities affecting the

- optic nerves, optic chiasm, and optic tracts. *J Neuroophthalmol*. 2009 Sep; 29(3): 223-6.
26. Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Fujita A, Sugata K, Suga S, et al. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol*. 2007 May; 39(1): 22-6.
27. Higashimoto Y, Ihira M, Ohta A, Inoue S, Usui C, Asano Y, et al. Discriminating between varicella-zoster virus vaccine and wild-type strains by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug; 46(8): 2665-70.
28. Hagiwara M, Sasaki H, Matsuo K, Honda M, Kawase M, Nakagawa H. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. *J Med Virol*. 2007 May; 79(5): 605-15.