

นิพนธ์ฉบับ

การตรวจหาเชื้อ Herpes Simplex Virus ในน้ำไขสันหลัง ของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมอง โดยวิธี Polymerase Chain Reaction*

ศิริรัตน์ ทานสัมฤทธิ์**

วาสนา ศิริรังษี**

บทคัดย่อ

การตรวจหา Herpes Simplex Virus (HSV) ดีเอ็นเอ ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมอง เพื่อวินิจฉัยโรค Herpes encephalitis โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เมื่อใช้ Thymidine kinase (TK) gene primers สามารถตรวจพบ HSV ดีเอ็นเอ ในปริมาณต่ำสุด 7.995 pg โดยใช้ น้ำไขสันหลังในการตรวจรายละ 10 μ L ยกเว้นกรณีที่พบสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR จะลดปริมาณน้ำไขสันหลังลงเหลือ 6 μ L จากผลการตรวจโดยวิธี PCR สามารถยืนยันได้ว่า Amplified product ที่เกิดขึ้นเป็น HSV ดีเอ็นเอ จริง เมื่อใช้เทคนิค Southern blotting และ Hybridization ด้วย HSV TK gene specific probe นอกจากนี้ยังพบว่าความไวของการตรวจโดยวิธี PCR แล้วอ่านผลด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis จะเท่ากับความไวในการตรวจด้วยวิธี PCR ร่วมกับ Southern blotting และ Hybridization แล้วอ่านผลด้วย colorimetric method ดังนั้นการตรวจโดยวิธี PCR โดยไม่ต้องทำ Hybridization ก็มีความไวและความจำเพาะเพียงพอที่จะนำไปตรวจหา HSV ดีเอ็นเอในน้ำไขสันหลังได้ จากการทดลองนำวิธีการดังกล่าวไปตรวจหา HSV ดีเอ็นเอในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมอง จำนวน 29 ราย พบว่าให้ผลบวก 1 ราย ดังนั้นวิธีการนี้จึงสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการประจำวัน เพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ HSV ในระบบประสาทได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ทำได้ง่าย และให้ผลรวดเร็ว

คำห้ส : Herpes simplex virus, Polymerase chain reaction, น้ำไขสันหลัง

* เป็นส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2538-2539

** ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Detection of Herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of AIDS patients by polymerase chain reaction***Hansumrit S,** Sirirungsi W****

Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA in cerebrospinal fluid (CSF) of AIDS patients attending Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital for diagnosis of herpes encephalitis was carried out by using PCR technique. The HSV-specific primers were selected from viral thymidine kinase gene (TK gene). The sensitivity of TK gene primers for detection of HSV-DNA was found to be 7.995 pg. The volume of CSF sample using in the PCR reaction was 10 μ L. If the PCR inhibitor was found, the maximum volume of CSF using in 50 μ L PCR reaction mixture should not exceed 8 μ L. Southern blotting and hybridization by HSV-TK gene specific probe were performed to identify and confirm the amplified product of HSV DNA from PCR reaction. The sensitivity of PCR technique with agarose gel electrophoresis and PCR technique with Southern blotting and hybridization was found to be indifferent. The detection of HSV-DNA in CSF of 29 AIDS patients revealed that 1 of 29 samples was positive. Therefore, the PCR technique following with the agarose gel electrophoresis was proved to be suitable for the routine diagnosis of Herpes encephalitis due to its sensitivity and could give an advantage of early diagnosis.

Key words : Herpes simplex virus, Polymerase chain reaction, Cerebrospinal fluid.

* Term paper in partial fulfillment of the requirements for the degree of Bachelor of Science in Medical Technology (1995-1996), Chiang Mai University.

** Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

บทนำ

โดยทั่วไปคนที่มียาระบบภูมิคุ้มกันปกติเมื่อเกิดการติดเชื้อเริม หรือ Herpes simplex virus (HSV) จะแสดงอาการแบบไม่รุนแรง แต่ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ ซึ่งมีภูมิคุ้มกันต่ำ การติดเชื้อ HSV มัก

แสดงอาการรุนแรง มีการติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด (viremia) และอาจทำให้เกิดสมองอักเสบ (Herpes encephalitis) ได้ ซึ่งการวินิจฉัยโรค Herpes encephalitis ทางห้องปฏิบัติการแต่เดิมนักไม่ประสบผลสำเร็จ ดังเช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อจากน้ำไขสันหลัง มักให้ผลลบ เนื่องจากใน

น้ำไขสันหลังของผู้ป่วยจะมี antibody ที่จับกับตัวเชื้อเกิดเป็น Immune complex ทำให้เชื้อไม่สามารถเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้ สำหรับการตรวจหา antigen ของตัวเชื้อ หรือ antibody ต่อตัวเชื้อโดยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา ก็พบว่ายังมีความไว (sensitivity) ในการตรวจต่ำอยู่ และยังตรวจพบได้ช้าอีกด้วย¹ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีผู้นำวิธีการตรวจหา Nucleic acid ของตัวเชื้อ โดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า Polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาใช้ในการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการหลายโรค เช่น โรคเอดส์ โรคติดเชื้อคลามิเดีย เป็นต้น สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค Herpes encephalitis โดยวิธีนี้พบว่าสามารถทำได้ตั้งแต่ผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการทางสมองในระยะต้น^{2,3,6} ซึ่งนับว่าเป็นผลดีต่อการดูแลรักษาผู้ป่วย

ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงได้นำเทคนิค PCR ที่ใช้ primers ที่สร้างขึ้นให้จำเพาะต่อ TK gene ของเชื้อ Herpes simplex virus มาทดลองตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมอง เพื่อศึกษาความไวตลอดจนความจำเพาะของการตรวจ และความเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างตรวจ

นำไขสันหลังจากผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมองจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จำนวน 29 ราย ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างตรวจตั้งแต่ 15 ธ.ค. 2538 - 10 ก.พ. 2539 แล้วเก็บตัวอย่างตรวจไว้ที่อุณหภูมิที่ -20 °ซ จนกว่าจะทำการทดลอง

2. วิธีการตรวจ

2.1 การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

ก่อนการตรวจ นำน้ำไขสันหลังไปต้มที่อุณหภูมิ 95-100 °ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำลงแช่ในน้ำแข็งทันที โดยวิธีนี้ดีเอ็นเอจะหลุดออกมาอยู่ในสารละลายเพื่อจะได้นำไปทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR ต่อไป

2.2 การตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เตรียมปฏิกิริยา PCR โดยให้มีส่วนประกอบคือ 25 pmole ของแต่ละ TK gene primer ซึ่งประกอบด้วย primer 2 สายคือ TK1 : 5'ACG GTG CTG CGG GTT TAT AT 3' (20 mers) และ TK2 : 5' TGC TGA TTG TTA TCT GGG CG 3' (20 mers), 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 mM MgCl₂, 1% glycerol, 10 pmole ของ dATP, dCTP, dGTP, dTTP และ 1.25 units ของ DNA polymerase นำส่วนผสมนี้รวมกับตัวอย่างตรวจโดยมีปริมาณสุดท้ายเป็น 50 µL ไปเข้าเครื่อง Thermal cycler (Coy Laboratory Product, Inc.) โดยตั้งโปรแกรมให้มีการควบคุมอุณหภูมิดังนี้ 94 °ซ 1 นาที, 50 °ซ 1 นาที และ 72 °ซ 2 นาที ทำลักษณะนี้ 40 รอบ สุดท้ายปรับอุณหภูมิให้เป็น 72 °ซ เป็นเวลา 7 นาที แล้วให้เครื่องคงอุณหภูมิที่ 4 °ซ จนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่อง

นำ PCR mixture ที่ได้ไปตรวจดู PCR product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide เมื่อตรวจดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะเห็น DNA band เรืองแสง มีขนาด 250 base pair

2.3 การตรวจยืนยันผล PCR product

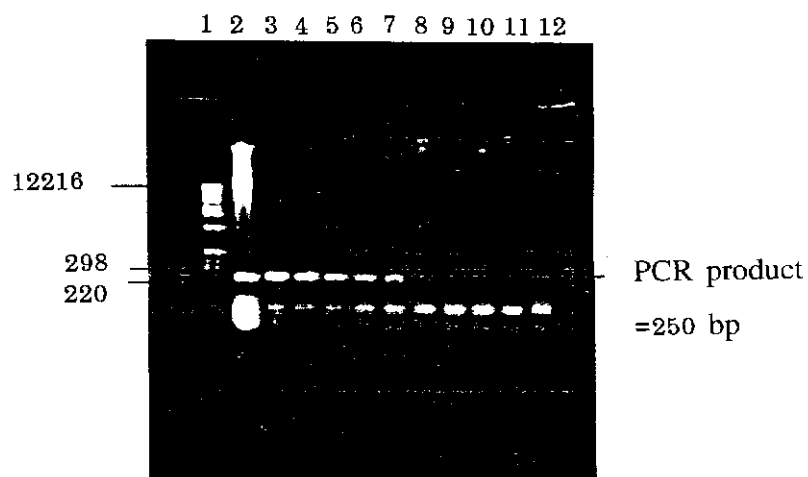
การตรวจพิสูจน์ PCR product ทำโดยวิธี Southern blotting และ Hybridization แล้วตรวจผลโดยวิธี Colorimetric method ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ นำแผ่น agarose gel ที่มี PCR product ไปทำ Alkaline denaturation ตามด้วย Neutralization แล้วเปลี่ยนถ่ายดีเอ็นเอ โดยทำ Southern blotting ลงบนแผ่น Nylon membrane 1 ก้อน หลังจากนั้นนำแผ่น Nylon membrane ไป fix ด้วย UV-crosslink ที่ 0.51 J/cm^2 ทั้ง 2 ด้าน เพื่อให้ดีเอ็นเอติดกับแผ่น membrane แน่นขึ้น ต่อจากนั้นนำ membrane ไปทำ Prehybridization ที่ 42°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงทำ Hybridization กับ Oligonucleotide HSV-TK gene probe ที่ติดฉลากด้วย Alkaline phosphatase ที่ 50°C เป็นเวลา 30 นาที หลังการทำ Hybridization ให้ล้าง membrane แล้วจึงนำไปตรวจโดยใช้ substrate คือ Nitroblue tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indo-lylphosphate (NBT/BCIP) ตรวจดูตะกอน

สีน้ำตาลบนแผ่น membrane

ผลการทดลอง

ความไวของการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR เมื่อใช้ TK gene primers

จากการทดลองเจือจาง Purified HSV ดีเอ็นเอที่มีปริมาณ $2.665 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ แบบ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9} แล้วนำไปทำการตรวจหา Amplified product ด้วยวิธี PCR (ในสภาวะที่กล่าวแล้วข้างต้น) โดยทำควบคู่กับ Negative control ซึ่งใช้น้ำแทน HSV ดีเอ็นเอ และ 1 Kb Ladder DNA marker ผลปรากฏว่าโดยวิธีนี้หลังจากนำ Amplified product ไปผ่านกระบวนการ electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วสามารถตรวจพบ HSV ดีเอ็นเอ ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ dilution 10^{-6} ซึ่งคำนวณปริมาณ HSV ดีเอ็นเอ ได้เท่ากับ $7.995 \text{ pg/reaction}$ ดังแสดงในรูปที่ 1

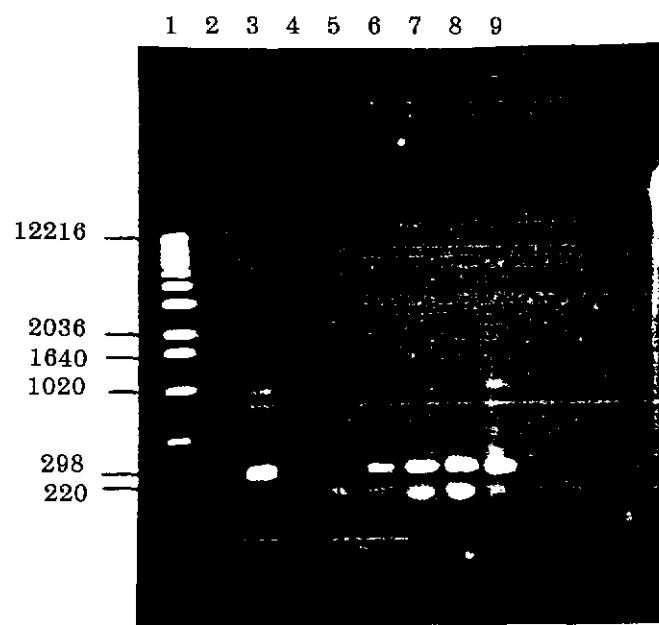


รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบหาความไวของ TK gene primers ในการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR. Lane 1: DNA marker, Lane 2: Undiluted HSV-DNA, Lane 3-11 : 10^{-1} - 10^{-9} HSV-DNA, Lane 12 : negative control.

การหาปริมาณที่เหมาะสมของน้ำไขสันหลังที่ใช้ในการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ

จากการทดลองนำเอาน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่มีอาการทางสมองจำนวน 10 ราย มาผสมรวมกันในปริมาณที่เท่าๆ กัน แล้วนำส่วนผสมในปริมาณ 10, 8, 6, 4, 3 และ 2 μ L ไปทำ PCR โดยเติม Purified HSV-DNA ปริมาณ

7.995 pg ลงไปในทุกหลอด ผลปรากฏว่าเมื่อใช้น้ำไขสันหลังที่มีปริมาณสูงตั้งแต่ 8 μ L ขึ้นไป จะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา PCR ไม่สามารถตรวจพบ PCR product ได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนั้นเมื่อพบว่าในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยใดมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR จึงไม่ควรใช้ปริมาณน้ำไขสันหลังเกิน 8 μ L ในการตรวจ

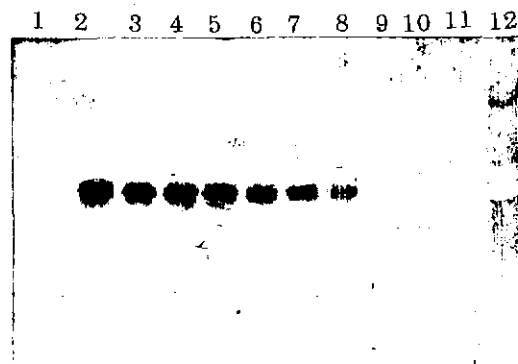


รูปที่ 2 แสดงการหาปริมาณน้ำไขสันหลังที่เหมาะสมในการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR. Lane 1: DNA marker, Lane 2: negative control, Lane 3 : positive control (no CSF), Lane 4-9 : HSV ดีเอ็นเอ ที่มี CSF ปริมาณ 10, 8, 6, 4, 3 และ 2 μ L ตามลำดับ

การตรวจยืนยันผล PCR Amplified product และเปรียบเทียบความไวของการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR กับวิธี PCR ร่วมกับเทคนิค Hybridization

ผลการนำ Amplified product จากการทำ PCR ของ purified HSV ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในรูปที่ 1 มาผ่านกระบวนการ Southern blotting และ Hybridization กับ

TK gene probe แล้วตรวจโดยวิธี Colorimetric method พบว่า Amplified product ที่ได้นั้นเป็น HSV TK gene จริง เพราะสามารถ hybridize กับ HSV TK gene probe ได้โดยวิธี Hybridization สามารถตรวจพบ HSV ดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดเท่ากับ 7.995 pg ซึ่งเท่ากับการตรวจโดยวิธี PCR เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการตรวจพิสูจน์ว่าเป็น HSV-PCR product จริงและการตรวจโดยวิธี PCR ร่วมกับ Hybridization ให้ความไวในการตรวจหา HSV DNA เท่ากับในวิธี PCR เพียงอย่างเดียว Lane 1 : DNA marker, Lane 2: Undiluted HSV DNA, Lane 3-11 : 10^{-1} - 10^{-9} HSV DNA, Lane 12 : negative control.

การตรวจหา HSV ดีเอ็นเอในน้ำไขสันหลัง (CSF) ของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมอง โดยวิธี PCR

จากการนำ CSF ของผู้ป่วยรายละ 10 μ L ไปทำการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR โดยทำพร้อม control ดังนี้

Positive control มีเฉพาะ HSV ดีเอ็นเอ 7.995 pg (การตรวจพบดีเอ็นเอ)

Negative control ไม่มีทั้ง HSV ดีเอ็นเอ และ CSF (ควรให้ผลลบ)

Inhibition control มีทั้ง HSV ดีเอ็นเอ (7.995 pg) และ CSF (การตรวจพบดีเอ็นเอ)

เมื่อผลการตรวจพบว่า รายใดแสดงผลการยับยั้งปฏิกิริยา PCR โดย CSF จะทำการตรวจซ้ำโดยลดปริมาณ CSF ลงเหลือ 6 μ L ผลการทดลองพบว่า ในการตรวจ CSF ของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมองจำนวน 29 ราย พบ HSV ดีเอ็นเอ 1 ราย (เมื่อใช้ CSF 10 μ L) และมี CSF ของผู้ป่วยเอดส์จำนวน 10 ราย ที่มีการยับยั้งปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ CSF เท่ากับ 10 μ L

แต่จะให้ผล negative เมื่อลดปริมาณ CSF ลงเป็น 6 μ L ทั้งนี้ผลการตรวจพิสูจน์ Amplified product ของ HSV ดีเอ็นเอ ใน CSF ผู้ป่วยรายที่ให้ผลบวกก็ให้ผลยืนยันตรงกัน

วิจารณ์

การตรวจหา HSV DNA ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางสมองโดยวิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) สูง สามารถตรวจพบเชื้อเมื่อมีการติดเชื้อระยะเริ่มแรกได้และยังสามารถแก้ปัญหาในการตรวจวินิจฉัย Herpes simplex encephalitis (HSE) ซึ่งวิธีทั่วไปมักใช้ไม่ได้ผล

การเตรียมน้ำไขสันหลังเพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR มีผู้ศึกษาไว้หลายวิธีเช่น วิธีสกัด CSF ด้วย Phenol-Chloroform⁴, Ethanol^{3,4,5} หรือวิธี Heat and Cooling^{2,3,4,5,6} เป็นต้น สำหรับการทดลองนี้ใช้วิธี Heat and Cooling ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกและให้ผลดีพอสมควร ถึงแม้จะตรวจพบสารที่เป็น inhibi-

tor ต่อปฏิกิริยา PCR ก็ตาม ซึ่งเรื่องนี้สามารถแก้ไขได้โดยการหาปริมาณน้ำไขสันหลังที่เหมาะสมที่ไม่มีผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR

สำหรับการตรวจหา HSV DNA ใน CSF ได้มีผู้พัฒนาวิธีการต่างๆ มากมายโดยเลือกใช้ primers จากตำแหน่งของ HSV DNA ที่ต่างกันไปเช่น Thymidine kinase gene⁶, Glycoprotein B gene², DNA polymerase gene² เป็นต้น สำหรับการทดลองนี้ใช้ Thymidine kinase gene primers ซึ่งสามารถจับกับ HSV DNA ได้ทั้ง HSV-1 และ HSV-2 ซึ่ง Amplified product ที่ได้จะมีขนาดเท่ากัน ไม่สามารถแยกชนิดของ HSV ได้ อย่างไรก็ตามการแยกชนิดของ HSV อาจไม่จำเป็นสำหรับการรักษาเพราะ HSV ทั้งสองชนิด รักษาด้วยยาชนิดเดียวกันแต่ถ้าต้องการแยกชนิดของ HSV เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาด้านระบาดวิทยา ก็สามารถทำได้เนื่องจาก amplified product ที่ได้จาก HSV-1 มี restriction site สำหรับเอนไซม์ *BamH I* ในขณะที่ amplified product ของ HSV-2 ไม่มี สำหรับ sensitivity ของ TK gene primers ในการตรวจหา HSV DNA อยู่ในระดับที่น่าพอใจ คือสามารถตรวจหา HSV DNA ได้ในปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 7.995 pg และเมื่อเปรียบเทียบและยืนยันผล Amplified product โดยวิธี Southern blotting และ Hybridization กับ HSV TK gene Oligoprobe พบว่า Amplified product ที่ได้จากการทำ PCR เป็น Amplified product ของ HSV DNA จริง และ sensitivity ในการตรวจหา HSV DNA ทั้ง 2 วิธีไม่ต่างกัน คือสามารถตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ ได้ในปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 7.995 pg

ฉะนั้นในการตรวจหา HSV ดีเอ็นเอ ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธี PCR เพียงอย่างเดียวซึ่งถือว่ามีความไวเพียงพอ โดยที่ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจตั้งแต่เตรียม CSF จนถึงอ่านผลโดยการตรวจดู DNA band ของ amplified product ที่ได้จากการทำ agarose gel electrophoresis ใช้เวลาประมาณ 7 ชั่วโมงซึ่งนับว่าให้ผลได้ภายในเวลา 1-2 วันเหมาะที่จะใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการประจำวันได้ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจโดยวิธี PCR มีข้อควรคำนึงถึงหลายประการคือ เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวสูง จึงควรระมัดระวังการเกิด Contamination อาจเป็น Cross contamination ระหว่างสิ่งส่งตรวจ หรือ เป็น Carry over contamination จาก amplified product ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งก่อนและห้องปฏิบัติการจะต้องมีทุนทรัพย์เพียงพอสำหรับการซื้อน้ำยา อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำ PCR เนื่องจากมีราคาแพง อีกทั้งบุคลากรที่ปฏิบัติงานต้องเป็นผู้มีความรู้เพื่อที่จะแปลผลการทดลองได้

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการศึกษาในผู้ป่วย 29 ราย โดยใช้ปริมาณ CSF เท่ากับ 10 μ L ในการตรวจพบว่าผู้ป่วยจำนวน 10 ราย มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR แต่เมื่อลดปริมาณ CSF ลงเหลือ 6 μ L พบว่าให้ผล Negative แสดงว่าใน CSF ของแต่ละคนจะมีการยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ไม่เท่ากัน ทั้งนี้สารที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR ยังไม่ทราบว่าเป็นสารประเภทใดแต่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังจะเห็นได้ว่าในผู้ป่วยที่มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR 10 ราย พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ใน CSF ดังนั้นในการเลือกใช้ปริมาณ CSF ในปฏิกิริยา PCR ควรเลือกใช้ปริมาณ ที่ไม่ทำให้เกิดการยับยั้ง

ปฏิกิริยา จากการศึกษากครั้งนี้จำนวนตัวอย่างตรวจยังไม่เพียงพอสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาอุบัติการณ์ของ Herpes encephalitis ในผู้ป่วยเอดส์ ฉะนั้นควรมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Whitey RJ. Herpes Simplex Virus. In : Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), Fields Virology. Vol 2, 3rd ed. Philadelphia : Lippincott - Reven Publishers, 1996: 2297-342.
2. Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of Herpes simplex encephalitis : Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain biopsied patients and correlation with disease. J Infect Dis 1995; 171: 857-63.
3. Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Forsgren M. Encephalitis in immunocompetent pateints due to Herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. J Med Virol 1993; 39: 179-86.
4. Kimura H, Futamura M, Kito H, *et al.* Detection of viral DNA in neonatal Herpes simplex virus infections : Frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. J Infect Dis 1991; 164: 289-93.
5. Mertens G, Ieven M, Ursi D, Pattyn SR, Martin JJ, Parizel PM. Detection of herpes simplex virus in the cerebrospinal fluid of patients with encephalitis using the polymerase chain reaction. J Neuro Sci 1993; 118: 213-6.
6. Boerman RH, Arnoldus EPJ, Peters ACB, Bloem BR, Raap AK, Ploeg MVD. Polymerase chain reaction for early detection of HSV DNA in cerebrospinal fluid : an experimental mouse encephalitis study. J Med Virol 1991; 33: 83-8.