NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/44 , 2021

Scan online to view this article

PCR Detection of *Herpes Simplex Virus 2* in Idiopathic Abortions

Sama Babajani ahmad saraei [1], Mohammad hassan Shahhosseiny [*2], Elahe Aliasgari[1]

1. Department of biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University,Tehran,Iran
2. Department of Microbiology-Shahr-e-Qods Branch-Islamic Azad University-Tehran,Iran.

Abstract

Aims and Background: *Herpes simplex virus type 2 (HSV-2)* is one of the most important human pathogenic viruses. The virus causes genital herpes and can cause miscarriage, pregnancy complications, and infertility in women. The aim of this study was to evaluate the role of *HSV-2* in idiopathic abortion by PCR.

Materials and Methods: Fifty blood serum samples of women with idiopathic miscarriages were collected and transferred to the laboratory. The PCR test was performed using standard *HSV-2* strain DNA and then the limit of detection (LOD) and specificity of the test was determined using a different strain of DNA. A standard test was performed using positive and negative controls on the samples and the results were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Results: The PCR technique est optimized and 231 bp amplicon were observed in agarose gel. In specificity test only with DNA *HSV-2* achieved positive results as well as a limit of detection 10 Copy / Reaction. Of the 50 samples studied, 9 (4.5%) were positive.

Conclusion: Idiopathic miscarriages are miscarriages that do not seem to have a definite cause. But clearly, several factors, including infectious agents that are difficult to identify, can cause miscarriage. One of these factors could be *HSV-2*. The results of this study showed that *HSV-2* is one of the most important factors in this type of miscarriage and that *HSV-2* can be quickly identified by tests such as PCR.

Keywords: *Herpes simplex virus 2*, polymerase chain reaction, diagnosis, idiopathic abortion, Iau Science .

Corresponding author:
Department of Microbiology-Shahr-e-Qods Branch-Islamic Azad University-Tehran,Iran
Email: shahhosseiny@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۴ - پاییز ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارزیابی مولکولی هرپس سیمپلکس ویروس ۲ در سقط های ایدیوپاتیک به روش PCR

سماء باباجانی احمدسرائی[۱]،محمدحسن شاه حسینی[۲*]، الهه علی عسگری[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرقدس، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: *ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲(HSV-2)* از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای انسانی است. این ویروس باعث تبخال تناسلی شده و در زنان ممکن است باعث سقط جنین، عوارض بارداری و کاهش باروری شود. هدف این مطالعه تشخیص سریع *HSV-2* در سقط‌های ایدیوپاتیک به‌روش مولکولی PCR است.

مواد و روش‌ها: ۵۰ نمونه سرم خون زنان با سقط‌های ایدیوپاتیک جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. آزمون PCR با استفاده از DNA سوش استاندارد *HSV-2* بهینه و سپس حد تشخیص (LOD) و ویژگی تست با استفاده از DNA عوامل مختلف بررسی گردید. آزمون استاندارد با استفاده از کنترل مثبت و منفی بر روی نمونه‌ها انجام و نتایج به‌روش آگاروز ژل الکتروفورز بررسی گردید.

یافته‌ها: تست PCR بهینه و محصول bp ۲۳۱ در ژل آگاروز مشاهده گردید. در آزمون ویژگی فقط با DNA ی *HSV-2* نتایج مثبت حاصل و همین‌طور حد تشخیص Copy/Reaction ۱۰به‌دست آمد. از ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۹ نمونه (۴/۵ ٪) مثبت گردید.

نتیجه‌گیری: سقط‌های ایدیوپاتیک، سقط‌هایی هستند که به‌ظاهر عامل مشخص ندارند. اما به‌طور مشخص عوامل متعددی از جمله عوامل عفونی که شناسایی آن‌ها مشکل است، می‌توانند موجب سقط جنین گردند. یکی از این عوامل می‌تواند *HSV-2* باشد. نتایج این مطالعه مشخص کرد که در این نوع سقط‌ها *HSV-2* یکی از عوامل مهم است و با آزمون‌هایی مانند PCR به سرعت می‌توان، *HSV-2* را شناسایی نمود.

واژگان کلیدی: *هرپس سیمپلکس ویروس ۲*، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تشخیص، سقط ایدیوپاتیک، Iau Science.

مقدمه

سقط یکی از شایع‌ترین عوارض حاملگی است و به مواردی اطلاق می‌گردد که تا قبل از هفته ۲۰ حاملگی به دلایل مختلف مادری و جنینی، حاملگی خاتمه می‌یابد. سقط‌های ایدیوپاتیک (Idiopathic abortion) به معنای پایان یافتن بارداری در هر مرحله‌ای است که زندگی نوزاد در جریان است، اگرچه به‌طور غالب به‌لحاظ فنی و تخصصی، خاتمه یافتن بارداری به‌واسطه جراحی یا خارج کردن جنین یا رویان از رحم (پیش از آن‌که قادر به ادامه حیات باشد) که علت سقط در آن‌ها تشخیص داده نمی‌شود به آن سقط‌های ایدیوپاتیک می‌گویند. در این میان، عفونت‌های ویروسی سیستم تناسلی (منتقله جنسی) از جمله موارد زمینه‌ساز سقط جنین تلقی می‌گردد. یکی از انواع این ویروس‌ها، *ویروس هرپس سیمپلکس* است. هرپس تناسلی اغلب به-

نویسنده مسئول:
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرقدس، تهران، ایران
پست الکترونیکیshahhosseiny@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸

میزان بالایی ناشی از هرپس ویروس تیپ ۲ انسان یا (*HSV-II*) است و از طریق تماس جنسی انتشار می‌یابد. *HSV-II* از خانواده هرپس ویریده و زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه است. هرپس تناسلی با ضایعات وزیکولو اولسراتی بر روی بخش برونی آله تناسلی زن، واژن، سرویکس، میزنای یا پرینه در زنان و پنیس در مردان ایجاد می‌شود و یا ضایعات بسیار در رکتوم و منطقه اطراف آن در مردان هموسکشوال دیده می‌شود. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲ توانایی بالا رفتن و نفوذ به ریشه گانگلیای اعصاب پشتی را دارد و به حالت نخاعی در هر دو جنس زن و مرد مشاهده می‌شود. براساس گزارش مرکز پیشگیری و کنترل بیماری، سالانه ۳۷۱۰۰۰ مورد ابتلا به هرپس ژنیتالیا مراجعه کننده به درمانگاه‌ها گزارش شده است. اکثریت افراد مبتلا به عفونت فعال (۶۵٪) خانم هستند. آمار شیوع این بیماری در خانم‌های باردار در آمریکا ۴٪- ۰/۰۱٪ است و به‌طور احتمال حاملگی باعث افزایش ابتلا یا افزایش شدت تبخال تناسلی نمی‌شود. مطالعه‌های نشان می‌دهد که سروپوزیتیو بودن براساس نژاد و قومیت فرق می‌کند. به‌عنوان مثال در زنان سفیدپوست آمریکایی شیوع ۲۵٪، در زنان آمریکایی-مکزیکی ۲۵٪ و در زنان سیاه‌پوست آمریکایی ۵۵٪ بوده است. هم‌چنین سروپوزیتیویتی با افزایش سن نیز افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که در زنان سیاه‌پوست آمریکایی در سن زیر ۲۰ سال ۱۰٪ و ۳۰ سالگی ۵۵٪ و در ۶۰ سالگی ۸۰٪ سروپوزیتیو هستند (۱،۲،۳،۴). در این مطالعه سعی بر آن است که از تکنیک مولکولی PCR که روشی آسان، سریع و دارای حساسیت بالاتر و مطلوب‌تری نسبت‌به روش معمول کشت است، برای ارزیابی مولکولی ویروس هرپس *سیمپلکس نوع II* که از جمله عوامل عفونی در سقط‌های ایدیوپاتیک محسوب می‌شود، استفاده گردد. موضوع اصلی این تحقیق، ارزیابی مولکولی *ویروس هرپس سیمپلکس نوع II* درسقط‌های ایدیوپاتیک به‌روش PCR است.

روش کار

نمونه‌گیری

۵۰ نمونه سرم خون زنان با سقط‌های ایدیوپاتیک و ۵۰ نمونه کنترل سالم در شرایط استریل، جمع‌آوری شد. این زنان در سنین ۲۱-۴۳ سال بوده و علت مشخصی برای سقط نداشتند.

استخراج DNA

ابتدا سرم با تیتر مشخص *HSV-2* را از آزمایشگاه ویروس شناسی انستیتو پاستور تهیه کرده، سپس با استفاده از کیت استخراج DNA سیناکلون (cat:DN8117C) DNA ویروس استخراج گردید.

آزمون PCR

توالی پرایمری (آغازگرها) مورد استفاده جهت تشخیص هرپس *سیمپلکس* ۲ که جهت تکثیر ناحیه bp ۲۳۱ ژن هدف Glycoprotein B این ویروس مورد استفاده قرار گرفت در جدول شماره ۱ آورده شده است (۵).

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی و پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص *هرپس سیمپلکس*

ژن هدف	توالی پرایمر	طول محصول
GlycoproteinB	F5'-TGGTATCGCATGGGAGACAAT - 3' R5'- CTCCGTCCAGTCGTTTATCTT- 3'	231bp

مراحل بهینه کردن تست PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر به شرح زیر به انجام رسید:

جهت انجام تست PCR، DDW در حجم ۱۵ میکرولیتر، X ۱۰ PCP Buffer در غلظت x ۱ و در حجم ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ در غلظت Mm ۱/۵ و در حجم ۰/۷۵ میکرولیتر، dNTP در غلظت mM ۰/۲ و در حجم ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرها در غلظت ۰/۲ میکرولیتر و در حجم ۰/۵ میکرولیتر، Taq DNA pol در غلظت U/µl ۱/۵ و در حجم ۰/۳ میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفتند.

سپس نمونه در دستگاه ترموسایکلر براساس برنامه دمایی و زمانی مشخص شده قرار گرفته، تا تکثیر ژن مورد نظر به انجام برسد. برنامه دمایی PCR جهت تکثیر ژن مورد نظر به‌شرح زیر است:

مرحله واسرشت ابتدایی در دمای C ۹۵° در مدت زمان ۳ دقیقه به تعداد ۱ سیکل، مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴°C در مدت زمان ۳۰ ثانیه، مرحله هیبریداسیون در دمای ۵۴°C در مدت زمان ۳۰ ثانیه به‌تعداد ۴۰ سیکل، مرحله طویل‌سازی در دمای ۷۲°C در مدت زمان ۳۰ ثانیه،

مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲°C در مدت زمان ۷ دقیقه به تعداد ۱ سیکل انجام گرفت.

تعیین اختصاصیت تست PCR جهت تشخیص هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۲

تشخیص اختصاصیت پرایمرهای هرپس *سیمپلکس ویروس* ۲ به روش‌های offline و online است.

روش آفلاین: به‌منظور تعیین اختصاصیت (آزمون ویژگی) تکنیک PCR بهینه شده، DNA انسان، DNA موش، *سیتومگالوویروس*، *آدنوویروس*، *ویروس هپاتیت بی*، *ساکارومایسس سرویزیه*، *ویروس واریسلا زوستز* بررسی شدند.

روش آنلاین: در این روش سکانس پرایمرها را در سایت NCBI در قسمت Nblast وارد کرده و پرایمرها از لحاظ همولوژی مورد ارزیابی قرار داده شدند.

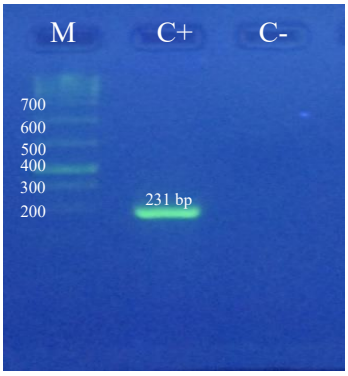
تعیین حد تشخیص (LOD) آزمون PCR بهینه شده

به جهت تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، ابتدا غلظت یا (OD) کنترل مثبت با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد و سپس با توجه به ژنوم *HSV-2* و فرمول GCN(Genome copy number)، تعداد DNA در هر میکرولیتر از سوسپانسیون DNA اولیه محاسبه شد. رقت های مختلف از سوسپانسیون *هرپس سیمپلکس ویروس* ۲ به روش کخ (Serial dilution) تهیه و بر روی رقت ها همراه با کنترل مثبت و منفی تست PCR بهینه انجام گردید.

نتایج

نتایج آزمون PCR بهینه شده

شکل ۱ تصویر محصول PCR با اندازه ۲۳۱ bp و با استفاده از DNA سوش استاندارد تکثیر شده و در ژل آگارز ۱/۵ را نشان می‌دهد.



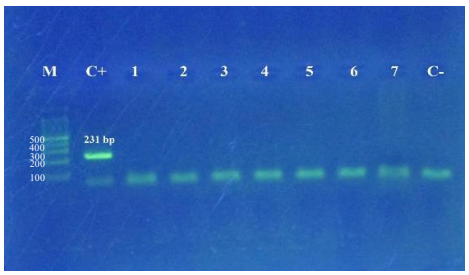
شکل۱. آزمون PCR بهینه شده
M: سایزمارکر1kb DNA ladder (bioflux)
C+:کنترل مثبت ۲۳۱ bp
C-: کنترل منفی

نتایج تعیین اختصاصیت تست PCR تشخیص هرپس سیمپلکس ویروس ۲

نتایج حاصل از اختصاصیت در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. مطابق شکل زیر، پرایمرها فقط با DNA هرپس *سیمپلکس ویروس* ۲ واکنش داده و با DNA سایر میکروارگانیسم‌ها هیچ باند یا محصول ناخواسته‌ای ایجاد نشده که نشان دهنده اختصاصیت بسیار بالای پرایمرها است.

نتایج تست حد تشخیص(LOD) آزمون PCR بهینه شده

نتایج حاصل از این ارزیابی در شکل ۳ نشان داده شده است که حساسیت این تست ۱۰ copy/Reaction به‌دست آمد.



شکل۲. تست PCR اختصاصیت هرپس سیمپلکس ویروس ۲

M: سایزمارکر 1kb DNA ladder (bioflux)

C+:کنترل مثبت (ویروس هرپس سیمپلکس ۲ bp ۲۳۱)

C-: کنترل منفی

۱. *DNA انسان*

۲. *DNA موش*

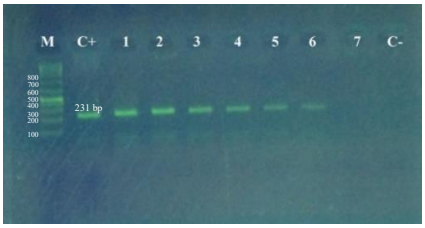
۳. *سیتومگالوویروس*

۴. *آدنوویروس*

۵. *ویروس هپاتیت بی*

۶. *ساکارومایسس سرویزیه*

۷. *ویروس واریسلا زوستر*



شکل ۳. تست PCR حد تشخیص هرپس سیمپلکس ویروس ۲

M: سایزمارکر 1kb DNA ladder (bioflux)

C+:کنترل مثبت (ویروس هرپس سیمپلکس ۲ bp ۲۳۱)

۱. ۱۰۰۰۰۰۰ DNA/reaction

۲. ۱۰۰۰۰۰copy/reaction

۳. ۱۰۰۰۰copy /reaction

۴. ۱۰۰۰copy /reaction

۵. ۱۰۰copy /reaction

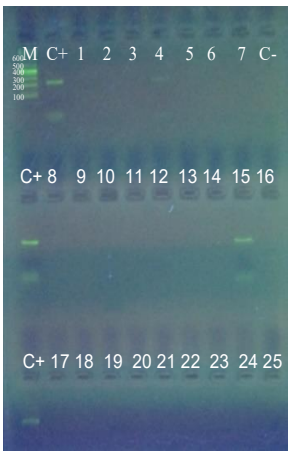
۶. ۱۰copy /reaction

۷. ۱copy /reaction

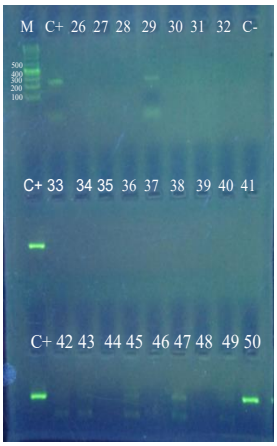
C-: کنترل منفی

نتایج تست PCR بر روی نمونه‌ها

از میان ۵۰ نمونه سرم خونی، ۹ نمونه آلوده به *HSV-2* بود (۴/۵ ٪). شکل‌های ۴ و ۵ نتایج تست PCR بر روی نمونه-هاست.



شکل ۴. تست تشخیص PCR *هرپس سیمپلکس ویروس ۲* در نمونه
M: سایزمارکر 1kb DNA ladder (bioflux)
+C:کنترل مثبت (۲۳۱ bp)
-C: کنترل منفی
نمونه‌های منفی: ۲۵-۱۶، ۱۴-۵، ۳، ۲
نمونه‌های مثبت: ۱۵، ۴



شکل ۵. تست تشخیص PCR *هرپس سیمپلکس ویروس ۲* در نمونه
M: سایزمارکر 1kb DNA ladder (bioflux)
+C:کنترل مثبت (۲۳۱ bp)
-C: کنترل منفی
نمونه‌های منفی: ۴۸ ، ۴۶، ۴۴ ، ۴۱-۳۰، ۲۸-۲۶
نمونه‌های مثبت: ۵۰، ۴۹، ۴۷، ۴۵، ۴۳، ۴۲، ۲۹

بحث

۵ درصد از عوامل منجربه سقط، مربوط به موردهای عفونتی است، البته این عوامل عفونتی منجر به سقط، متفاوت هستند (۶). شواهد نشان می‌دهد که *هرپس سیمپلکس* می‌تواند موجب بروز سقط گردد.

در مطالعه حاضر به ارزیابی مولکولی *هرپس سیمپلکس ویروس ۲* در سقط‌های ایدیوپاتیک به روش PCR پرداخته شد و این نتیجه حاصل شد که *ویروس هرپس سیمپلکس ۲* در سقط‌های ایدیوپاتیک یکی از عوامل مهم است که با آزمون‌هایی مانند آزمون PCR به‌سرعت می‌توان، *HSV-2* را شناسایی کرد و با توجه‌به مطالعه‌های قبلی نیز می‌توان این موضوع را اثبات کرد.

روش‌های گوناگونی برای شناسایی ویروس هرپس *سیمپلکس* در پژوهش‌های متعدد مطرح شده است که شامل روش‌هایی هم‌چون کشت، الایزا، antibody assay و روش‌های مولکولی هستند. با این حال، در مطالعه‌های گسترده‌ای ثابت شده است که روش‌های مولکولی از دقت و

سرعت بهتری برخوردارند. در نتیجه نسبت‌به سایر تکنیک‌ها ارجعیت دارند. در پژوهش حاضر نیز برای شناسایی DNA *ویروس HSV-II* از تست PCR استفاده شد و مشخص شد که تست PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است، به‌طوری‌که فقط با DNA *ویروس هرپس سیمپلکس* واکنش نشان داد و با سایر DNA میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه هیچ واکنشی صورت نگرفت. مانند مطالعه Sarquiz-Martínez در سال ۲۰۱۷ بر روی ۸۷ نمونه مایع مغزی -نخاعی به جهت مقایسه تکنیک Real time PCR و End-point nested PCR انجام شد که در نهایت ۱۴ نمونه با Real time PCR و ۸ نمونه با End-point nested PCR مثبت شدند که نشان دهنده اختصاصیت و حساسیت بالاترReal time PCR است (۷). هم‌چنین در مطالعه‌هایی که Mitchel، Koenig و Schutzhard با استفاده از روش Nested PCR به‌جهت شناسایی ویروس *هرپس سیمپلکس* انجام دادند با وجود حساسیت بیش‌تر، این روش به‌علت صرف زمان طولانی‌تر و در عین حال مصرف مواد بیش‌تر و دارای درصد ریسک بالاتر به جهت آلودگی در اولویت قرار نمی‌گیرد (۸).

Schmutzhard و همکارانش در سال ۲۰۰۴ از ۱۱۰ نمونه متوالی از ضایعات پوستی و زخم‌های تناسلی از بیماران مشکوک به عفونت‌های *HSV* و ۱۱۰ نمونه دیگر از بیماران مشکوک‌به عفونت‌های *واریسلا زوستر* با , Real time PCR Nested PCR و جداسازی ویروس مورد آزمایش قرار گرفتند. ۲۴ نمونه (٪۲۲) در بررسی *HSV-I* با استفاده از روش جداسازی ویروس و Nested PCR مثبت بودند، در حالی‌که در بررسی با استفاده از Real time PCR، ۲۶ نمونه (٪۲۴) مثبت بودند. *HSV-II* در ۲۸ نمونه (٪۲۵) با استفاده از روش جداسازی ویروس، در ۴۱ نمونه (٪۳۷) با روش Nested PCR و در ۴۰ نمونه (٪۳۶) با روش Real time PCR شناسایی شدند. *ویروس واریسلا زوستر* در ۱۵ نمونه (٪۱۴) جداسازی شد و DNA *ویروس واریسلا زوستر* در ۵۱ نمونه (٪۴۶) با روش Nested PCR مانند روش Real time PCR شناسایی شدند.گسترش اسید نوکلئیک، میزان تشخیص *HSV-II*، DNA *ویروس واریسلا زوستر* در مقایسه با روش جداسازی ویروس افزایش می‌دهد. تفاوت محسوسی بین Real time PCR و Nested PCR مشاهده نشده است (۹). در حالی‌که در مطالعه حاضر نیز تست PCR، بهینه و آمپلیکون ۲۳۱bp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ویروس هرپس سیمپلکس* تکثیر شدند. حد تشخیص (LOD)10 copy/reaction محاسبه شد و در بررسی تست ویژگی، پرایمرها با DNA سایر میکروارگانیسم‌ها ایجاد باند نکردند و تنها با DNA *ویروس هرپس سیمپلکس* ایجاد باند کردند، که این امر نشان دهنده دقت PCR است.

مطالعه‌های دیگری هم وجود دارند که اثبات می‌کنند که با آزمون‌هایی مانند آزمون PCR به‌سرعت می‌توان، *HSV-2* را شناسایی کرد مانند مطالعه Dehkordi و همکارانش در سال ۱۳۸۸،که به‌منظور تعیین شیوع عفونت ناشی از *ویروس هرپس سیمپلکس ۲* به‌روش PCR صورت گرفت که ۱۰۰ نمونه سرم با میزان IgG و IgM بالا از بیماران مشکوک جمع‌آوری شد. DNA ویروس استخراج و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت ردیابی ژن gD *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* انجام شد و این نتیجه حاصل شد که فراوانی *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* مشابه دیگر نقاط جهان است. آزمایش PCR برای تشخیص DNA ویروس در نمونه‌های سرمی مفید و می‌تواند برای تشخیص *ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲* در بیماران استفاده شود (۱۰). هم‌چنین در مطالعه Shaha و همکارانش در سال ۲۰۲۱ یک روش تشخیص بسیار سریع خاص برای *HSV2* با استفاده از Real Time PCR گزارش شد که آغازگرهای اختصاصی *HSV2* با استفاده از ابزار Primer-BLAST طراحی و ۱۲۰ جفت پایه از ژن پلیمراز با استفاده از Real Time PCR با رنگ SYBR Green تکثیر شد. جفت آغازگر طراحی شده در تشخیص فقط DNA *HSV2* ، اما نه *HSV1* بسیار کارآمد بود. مقدار چرخه آستانه (Ct) برای واکنش‌های *HSV2* توسط آغازگرهای طراحی شده به‌طور متوسط ۲۲/۵۵ برای تعداد نسخه استاندارد DNA ویروسی است که ممکن است کارایی آغازگرها را نشان دهد. دمای ذوب (Tm) آمپلیکون با استفاده از آغازگرهای طراحی شده (C ° ۸۲/۶) نیز بیش‌تر از آن با استفاده از آغازگرهای مرجع (حدود C ° ۷۸) بود، که نشان دهنده میزان GC بالای الگوی تقویت شده است. جفت آغازگر طراحی شده به پزشکان در تشخیص DNA *HSV2* و تشخیص سریع بیماری مرتبط کمک می‌کند (۱۱).

در مطالعه حاضر برای شناسایی DNA *ویروس HSV-II* از تکنیک PCR استفاده شد و مشابه آن در سال ۲۰۱۰

Arita به بررسی *ویروس HSV-1* در ساقه مغز کودکان مبتلا به عفونت سیستم عصبی مرکزی پرداخت و با استفاده از تکنیک PCR موفق‌به تشخیص DNA این ویروس در مایع مغزی نخاعی این کودکان گردید. در این مطالعه، نتایج به‌دست آمده از تصویربرداری MRI این کودکان با نتایج به دست آمده از تست PCR موافقت کامل داشت (۱۲).

در سال ۲۰۰۴، Asano و همکارانش با استفاده از روش Real Time PCR توانستند DNA *ویروس HSV-2* و *واریسلا زوستر* را در نمونه‌های بیماران مبتلا به نکروز شدید شبکیه‌ای، تشخیص دهند. در این مطالعه بیان شد که مقدار *ویروس HSV-2* در زجاجیه این بیماران بیش‌تر از زلالیه چشم آن‌ها است (۱۳).

در مطالعه Khodamoradi و همکاران در سال ۲۰۲۱، که به‌منظور بررسی نقش ویروس‌های *هرپس سیمپلکس نوع ۱* و ۲ و *سیتومگالوویروس* در بیماری آلزایمر صورت گرفت که نمونه‌های پلاسما از ۱۰۰ بیمار AD (۴۷ زن و ۵۳ مرد) گرفته شد. پس از جداسازی DNA ویروس، PCR با استفاده از پرایمرهای خاص برای تشخیص ویروس‌ها انجام شد و این نتیجه حاصل شد که شیوع *سیتومگالوویروس*، *HSV1* و *HSV2* به‌ترتیب ۲۷ ، ۸ و ۴ درصد بود. اگرچه *سیتومگالوویروس* بیش‌تر در بیماران AD شایع بود، *HSV1* و *HSV2* در بیماران مبتلا به AD پیشرفته یافت شد. شیوع *HSV1* و *HSV2* به‌طور قابل توجهی با دیسفوری، توهم، بی‌خوابی و افسردگی (P<۰/۰۵)، در حالی‌که *CMV* به‌طور قابل‌توجهی با توهم و دیسفوری (P=۰/۰۰۱) ارتباط داشت. علائم AD در بیماران مبتلا به *HSV1* و *HSV2* بیش‌تر بود و به‌نظر می‌رسد عفونت‌های *ویروس هرپس سیمپلکس* و *سیتومگالوویروس* ممکن است با شدت AD مرتبط باشد (۱۴). در مطالعه‌ای که Mariam Kareem و همکاران به منظور تشخیص *ویروس هرپس سیمپلکس* و *سیتومگالوویروس* در زنان باردار و سقط جنین با روش ELISA و روش Real Time PCR صورت گرفت این نتیجه حاصل شد که روش‌های غربالگری ELISA برای تشخیص *ویروس هرپس سیمپلکس* (*HSV*) و *سیتومگالوویروس انسانی* (*HCMV*) کند و غیرحساس هستند و Real Time PCR در تشخیص عفونت‌های *سیتومگالوویروس* و *HSV* در زنان باردار حساس‌تر و قابل اطمینان‌تر است (۱۵).

نتیجه‌گیری

روش PCR از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است. در این مطالعه ابتلا زنان به *هرپس سیمپلکس ویروس ۲* در سقط‌های ایدیوپاتیک با استفاده از روش مولکولی PCR، (۴/۵ ٪) است که نشان می‌دهد در این نوع سقط‌ها *هرپس سیمپلکس ویروس ۲* یکی از عوامل مهم است و با آزمون-هایی مانند PCR به‌سرعت می‌توان، *هرپس سیمپلکس ویروس ۲* را شناسایی نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر ساده، و سرکار خانم مهسا ملک محمدی کلهرودی کمال تشکر بابت راهنمایی و مشاوره‌ها می‌شود.

منابع

1. Centers for Disease Control and Prevention: Sexually transmitted diseases treatment guidelines, **2006**. MMWR 55:1, 2006b.

2. Centers for Disease Control and Prevention: STD surveillance **2006**. Trends in reportable sexually transmitted diseases in the United States 2009b.

3. Xu F, Stetnberg MR, Kottiri BJ, et al. Trends in *herpes simplex virus type I* and *type 2* seroprevalence in the United States. JAMA, **2006** Aug 23; 30:964.

4. Xu F, Markowitz LE, Gottlieb SL, et al. Seroprevalence of *herpes simplex virus types I* and *2* in pregnant women in the United States. Am J Obstet Gynecol,**2007**; 196:43.

5. Shin CH, Park GS, Hing KM, Paik MK. Detection and typing of *HSV-1*, *HSV-2*, *CMV* and *EBV* by quadruplex PCR. Yonsei Med J, **2003**;44(6):1001-7.

6. Meybodi MAK & Taheripanah R. Infections in Recurrent Miscarriage. Journal of Reproduction &Infertility. **2000**;1(2).

7. Sarquiz-Martínez B, González-Bonilla CR, Santacruz-Tinoco CE, Muñoz-Medina JE, Pardavé-Alejandre HD, Barbosa-Cabrera E, Ramírez-González JE, Díaz-Quiñonez JA. Differential detection of enterovirus and herpes simplex virus in cerebrospinal fluid by real-time RT-PCR. Intervirology. **2017**;60(3):118-24.

8. Mohsenipour I; Gabl M; Schutzhard E; Twerdy K. Suboccipital decompressive surgery in cerebellar infarction. Zentralblatt fur Neurochirurgie**. 1999**;60(2):68-73.

9. Schmutzhard J; Riedel HM; Wirgart BZ; Grillner L. Detection of *herpes simplex virus type 1*, *herpes simplex virus type 2* and *varicella-zoster virus* in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. Journal of clinical virology. **2004**;29(2):120-6.

10. Doosti A; Ghasemi-Dehkordi P; Javadi G; Sardari S; Shokrgozar M. DNA vaccine encoding the Omp31 gene of Brucella melitensis induces protective immunity in BALB/c mice. Research journal of biological sciences. **2009**;4(1):126-31.

11. Shaha, M., Roy, B., & Islam, M. A. (**2021**). Rapid detection of herpes simplex virus 2: a SYBR-Green-based real-time PCR assay. *F1000Research*, *10*(655), 655.

12- Arita JH, Lin J, Peruchi MM, Rodrigues MM, Vilanova LC. Herpes simplex type 1 encephalitis restricted to the brainstem in a pediatric patient. Case reports in medicine. 2010 Jan 1;**2010**.

13. Asano S; Yoshikawa T; Kimura H; Enomoto Y; Ohashi M; Terasaki H; et al. Monitoring *herpesviruses* DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. Journal of clinical virology. **2004**;29(3):207-10.

14. Khodamoradi S, Shahhosseiny MH, Mohammadian T, Ferdousi A. Evaluation of Role of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 and Cytomegalovirus in Alzheimer's Disease. Medical Laboratory Journal. **2021** Jul 10;15(4):39-44.

15. Ali MK, Shia JS, Al-marsome HD. Detection of HSV and CMV in Pregnant and Miscarriage women by ELISA and real time PCR Assay. Research Journal of Pharmacy and Technology. **2019**;12(9):4090-4.