مروری بر روش‌های تشخیص کلاسیک و مولکولار هرپس سیمپلکس ویروس

عارف عاطفی[1*]، پریسا دهقان[2]، امیر حسین احمدیه یزدی[3]، آناهیتا خسروی[4]

[1] دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد سلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
[2] دانشجوی دکتری تخصصی شیمی معدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد، یزد، ایران
[3] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[4] کارشناس ارشد آموزش زبان انگلیسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۰۵/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۶

چکیده

هرپس ویروس‌های انسانی مشتمل بر ۸ عامل بیماری‌زا می‌باشند. ویروس هرپس سمپلکس از جمله ویروس‌هایی است که انتشار جهانی دارد و به سبب سادگی راه انتقال، هر ساله میزان قابل توجهی به تعداد افراد آلوده به این ویروس افزوده می‌شوند. این ویروس طیف وسیعی از بیماری شامل عفونت مخاطی تبخال دهان تا عفونت کشنده آنسفالیت هرپسی را ایجاد می‌نماید. امروزه برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های هرپس سیمپلکس ویروس از روش‌های کلاسیک نظیر روش‌های مورفولوژیک، ایمنومورفولوژیک، ویرولوژیک و سرولوژیک متعددی از جمله بررسی میکروسکوپی، کشت ویروس، وسترن بلات و الایزا استفاده می‌شود؛ اما سرعت، حساسیت و ویژگی تکنیک‌های تکثیر اسید نوکلئیک (مولکولار) نظیر تکنیک‌های ساده و اصلاح شده PCR و تکنیک نوین تکثیر همدما بواسطه حلقه (LAMP) سبب شده که این روش‌ها به عنوان ابزاری جذاب برای آزمایشگاه‌های تشخیصی و خصوصاً شناسایی سریع عوامل بیماری‌های ویروسی تبدیل گردند. در این مقاله مروری روش‌های مختلف تشخیص هرپس ویروس‌ها مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گیرند.

کلمات کلیدی: هرپس سیمپلکس ویروس، تشخیص، تکنیک‌های مولکولار

نویسنده مسئول:
دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد سلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۰۹۱۳۹۵۳۶۹۲۲
E-mail: aref.atefi@gmail.com

مقدمه

خانواده هرپس ویروس‌ها مشتمل بر ۸ عامل بیماری‌زای مهم انسانی می‌باشد؛[۱] هرپس ویروس‌های انسانی براساس تفاوت در خصوصیات ویروسی از جمله ساختمان ژنوم، گرایش بافتی، اثرات سیتوپاتولوژیک، پاتوژنز و تظاهرات بیماری به سه زیر خانواده آلفا، بتا و گاما تقسیم می‌شوند که سروتیپ *HSV-1* و *HSV-2* در رده آلفای این خانواده دسته‌بندی شده‌اند.[۲]

هرپس سیمپلکس ویروس، ویروسی بزرگ با DNA دو رشته‌ای خطی می‌باشد. ساختمان این ویروس شامل یک ساختمان بیست وجهی با تقارن مکعبی می‌باشد. ویروس هرپس سیمپلکس می‌تواند اکثر سلول‌های انسانی و حتی سلول‌های سایر گونه‌ها را آلوده نماید. این گروه ویروسی دارای رشد سریعی می‌باشد که سبب نابودی سلول میزبان می‌شوند و همچنین می‌توانند در گانگلیون‌های اعصاب حسی به صورت پایدار نهفته شوند. این ویروس معمولاً موجب بروز عفونت‌های لیتیک فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال و عفونت‌های نهفته نورون‌ها می‌گردد.[۲و۳]

ویروس هرپس سمپلکس از جمله ویروس‌هایی است که انتشار جهانی دارد و به سبب سادگی راه انتقال، هر ساله میزان قابل توجهی به تعداد افراد آلوده به این ویروس افزوده می‌شوند. این ویروس طیف وسیعی از بیماری‌ها را در تنها میزبان طبیعی خود که انسان است، ایجاد می‌کند.[۴] ویروس هرپس سیمپلکس نه تنها توانایی ایجاد عفونت اولیه را دارد، بلکه قادر است در گانگلیون‌های عصبی نهفته و تحت شرایط خاصی از قبیل استرس، تب، ضعف سیستم ایمنی، عوامل محیطی، اشعه UV و غیره دوباره فعال شده و ایجاد عفونت کند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که حتی یکبار آلودگی هم می‌تواند سبب نهفتگی ویروس شود.[۱و۴] انسان تنها میزبان طبیعی این ویروس است و این سروتیپ ویروسی می‌تواند طیف وسیعی از بیماری از عفونت مخاطی تبخال دهان تا عفونت کشنده آنسفالیت هرپسی را ایجاد نماید.[۲و۵]

HSV-1 غالباً با عفونت‌های غیرتناسلی و در نیمه فوقانی بدن مرتبط می‌باشد، در حالیکه *HSV-2* در ارتباط با بیماری‌های تناسلی یا نیمه تحتانی بدن می‌باشد. البته با توجه به شباهت‌های بسیار زیاد این دو سروتیپ ویروسی (حدود ۸۰٪ همولوژی)، نباید تصور شود که تیپ ۱ منحصراً هرپس دهانی و تیپ ۲ منحصراً هرپس ژنیتال را سبب می‌شوند، بلکه هر دو سروتیپ می‌توانند سایر نواحی را نیز آلوده نمایند.[۵] گرچه بیشترین تفاوت ظاهری که بین این دو تیپ وجود دارد، در زمینه الگوهای بالینی و اپیدمیولوژیک است؛ ولی این دو تیپ را می‌توان براساس خصوصیات بیوشیمیایی و بیولوژیکی نیز از هم جدا نمود. از جمله این خصوصیات می‌توان به اندازه پلاک‌های ایجاد شده در غشای کوریوآلانتوئیک جنین مرغ، قدرت ایجاد پلاک در کشت سلول جنین مرغ، توانایی ایجاد سلول‌های غول‌آسای سنسیشیال در کشت سلولی، گرایش به سلول‌های عصبی موش، حساسیت به هپارین و تغییر دما (تیپ ۲ به حرارت بالا حساس‌تر است) در محیط کشت سلولی و ترکیب بازهای DNA اشاره نمود.[۲و۶]

به‌طور کلی هرپس ویروس‌ها به سه طریق ایجاد بیماری می‌کنند: ۱) انهدام مستقیم بافت‌ها ۲) تحریک پاسخ ایمنی که منجر به آسیب بافتی می‌شود. ۳) تسهیل ایجاد تغییراتی که منجر به سرطانی شدن سلول‌ها می‌گردد.[۲] عفونت مخاطی ویروس هرپس سیمپلکس نمونه‌ای از تخریب مستقیم بافتی است. همچنین آنسفالیت هرپس سیمپلکس، پنومونی، التهاب شبکیه و هپاتیت نیز مبین آسیب‌های سلولی ناشی از خود ویروس می‌باشد. از آنجایی که *HSV* باعث ایجاد عفونت‌های سیتولیتیک می‌شود، تغییرات پاتولوژیکی نتیجه نکروز سلول‌های آلوده و پاسخ التهابی میزبان است. ضایعاتی که توسط *HSV-1* و *HSV-2* در پوست و پرده‌های مخاطی ایجاد می‌شوند، مشابه یکدیگر هستند. تغییرات هیستوپاتولوژیک ویژه شامل بالونی شدن سلول‌های آلوده، تولید اجسام آنکلوزیونی داخل هسته‌ای، حرکت کروماتین به حاشیه هسته و تشکیل سلول‌های غول‌آسای چند هسته‌ای می‌باشد. ویروس *HSV* در گانگلیون آلوده شده به صورت نهفته و در حالت غیرتکثیری باقی می‌ماند و تنها تعداد بسیار محدودی از ژن‌ها بیان می‌گردند. محل نهفتگی این ویروس بیشتر در گانگلیون‌های عصب تری ژمینال (در مورد *HSV-1*)، گانگلیون ساکرال (در مورد *HSV-2*) و گانگلیون عقده‌ای عصب واگ می‌باشد. اختفای ویروس در گانگلیون آلوده می‌تواند برای تمام عمر در میزبان ادامه یابد.[۵]

روش‌های تشخیص آزمایشگاهی

روش‌های تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس به دو دسته ۱) روش‌های کلاسیک و ۲) روش‌های مولکولی و جدید قابل تقسیم‌بندی است. روش‌های کلاسیک شامل روش‌های مورفولوژیک، ایمنومورفولوژیک، ویرولوژیک و سرولوژیک می‌باشند.[۷] بعضی از ظواهر بالینی ویروس هرپس سیمپلکس مثل تبخال لبی عودکننده بقدری مشخص هستند که به تأیید آزمایشگاهی نیازی نیست ولی در مواردی که ظواهر بالینی غیر واضح باشند، نمونه‌های متنوعی از قبیل مایع وزیکول حاصله، مایع مغزی- نخاعی، سوآب‌هایی از مجاری تناسلی، گلو، چشم یا پوست تهیه می‌شوند که بسته به وضعیت بیماری استفاده از آنها متفاوت است.[۵] ارزش هر تست آزمایشگاهی برای تشخیص عفونت *HSV* بستگی به نوع تست، کیفیت نمونه به دست آمده، توانایی آزمایشگاه در انجام درست تست و تفسیر نتایج توسط متخصص بالینی دارد.[۸]

A. تکنیک‌های کلاسیک

i. میکروسکوپ الکترونی (Electron Microscope)

آزمایش مستقیم مواد سیال وزیکولی یا دیگر مواد بالینی توسط میکروسکوپ الکترونی برای تشخیص *HSV* محدود شده است، به این علت که با استفاده از مورفولوژی و ریخت‌شناسی ویروس نمی‌توان *HSV* را از دیگر هرپس ویروس‌ها مثل واریسلا زوستر تشخیص داد.[۹]

ii. روش‌های سیتولوژی (Cytology Methods)

روش تهیه نمونه از قاعده ضایعات پوستی (Tzank smear) ساده‌ترین روش در بین روش‌های تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس می‌باشد. به کمک این روش ویروس از نظر وجود سلول‌های غول‌آسای چند هسته‌ای و اجسام انکلوزیونی مورد بررسی قرار می‌گیرد. اما از ویروس واریسلا زوستر افتراق داده نمی‌شود.[۸]

iii. کشت ویروس (Viral Culture)

کشت ویروس، استاندارد طلایی برای تشخیص *HSV* است و در مقایسه با دیگر تست‌های تشخیصی روش مرجع می‌باشد. این تست دارای ویژگی ۱۰۰ درصد برای هر دو تیپ *HSV-1* و *HSV-2* است. حساسیت این روش به مرحله بیماری و زمانی‌که جمع‌آوری نمونه از آن صورت گرفته بستگی دارد. حساسیت این تست از ۷۵ درصد برای اولین رویداد تا ۵۰ درصد برای رویدادهای عودکننده متغیر است.[۱۰] معمولاً نمونه‌ها از ضایعات وزیکولی که ۳ روز از نمایان شدن آنها می‌گذرد، تهیه می‌شوند. در صورتی‌که تا حد زیادی مشکوک به عفونت *HSV* باشیم نمونه‌برداری از زخم‌ها و ضایعات کهنه هم صورت می‌گیرد. جهت نمونه‌گیری بایستی سرپوش وزیکول توسط سرنگ استریل یا اسکالپل سوراخ و برداشته شود و سپس پارچه استریل یا سوآب ریون در پایه ضایعه وزیکولی چرخانده شود تا به این ترتیب سلول‌های اپی‌تلیال بر روی سوآب جمع‌آوری شوند (ایده‌آل به این صورت است که از بیش از یک ضایعه نمونه‌برداری صورت گیرد). سوآب‌ها باید فوراً درون محیط کشت ویروسی مناسب مثل محیط انتقال M5، RPMI و DMEM قرار گیرند. نمونه جمع‌آوری شده باید در دمای ٤ĉ نگهداری و در طی ٤٨ ساعت اول بعد از نمونه‌گیری به آزمایشگاه منتقل شود. نمونه ممکن است بطور مستقیم درون محیط کشت تلقیح شود و یا اینکه اول بر روی سلول‌های تک لایه‌ای جذب شده و سپس به محیط کشت منتقل شود.[۸و۱۰]

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ به طور رایج بر روی طیف وسیعی از سطوح سلولی شامل فیبروبلاست‌های قسمت ختنه‌گاه انسان، MRC-5، A_{549}، ریه موش (مینک)، کلیه خرگوش، سلول‌های Vero و Hep-2 رشد می‌کند. کشت بایستی برای ۷ تا ۱۰ روز نگهداری شود که این موضوع به سطوح سلولی مورد استفاده بستگی دارد. پیدایش اثرات سیتوپاتوژنیک بعد از تلقیح مواد به محیط کشت و حضور ویروس *HSV* فعال، بین ۱۸ تا ۹٦ ساعت زمان می‌خواهد. شروع اثرات سیتوپاتوژنیک به صورت مرکزگرا است ولی به سرعت دیگر قسمت‌های تک لایه‌ای تحت تاثیر قرار می‌گیرند و ممکن است گاهی اوقات سلول‌های غول‌پیکر چند هسته‌ای به وجود آیند. روش کشت سلول دارای معایبی نظیر زمان‌بر بودن، حساسیت پایین، احتمال زیاد آلودگی و ... می‌باشد.[۸و۱۰]

بسیاری از آزمایشگاه‌ها از روش Shell vial برای ایزوله ویروس استفاده می‌کنند که در این صورت زمان ایزوله به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. روش کشت Shell vial زمان ایزوله ویروس را از ۱-۷ روز به ٤٨-١٦ ساعت کاهش می‌دهد. این روش نسبت به

روش سنتی سریع‌تر و اختصاصی‌تر است ولی از حساسیت کمتری برخوردار بوده و گران‌تر می‌باشد. اگرچه طیف متنوعی از سطوح سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما سلول‌های MCR-5 نسبت به دیگر سلول‌ها استفاده بیشتری دارند.[۸]

iv. روش‌های تشخیصی سرولوژی (Serological Diagnosis (Methods

a. تشخیص آنتی‌ژن ویروسی (Viral Antibodys Detection)

تشخیص آنتی‌ژن ویروسی نسبت به کشت ویروسی برای آزمایشگاه‌های کوچک مناسب‌تر است. این تست در آزمایشگاه‌های مناطق دور افتاده نیز قابل انجام است. حساسیت این تست نسبت به کشت در مواقعی بیشتر و یا کمتر می‌شود. این تست ویژگی بالایی در تشخیص ویروس *HSV* دارد، به طوریکه توانایی تمایز بین *HSV-1* و *HSV-2* و *VZV* را دارا می‌باشد. این تست بوسیله رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس و یا استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال انجام می‌شود.[۱۱]

b. تشخیص آنتی‌ژن بوسیله DFA (Direct Fluorescent Antibody)

تشخیص آنتی‌ژن *HSV* با استفاده از رنگ‌آمیزی DFA (روش آنتی‌بادی مستقیم) اسمیرهایی که به سرعت به کشت سلولی افزوده می‌شوند، را تأیید و اثبات می‌کند. بیان این نکته ضروری است که بایستی نمونه‌های با کیفیت بالا برای این تست به دست آیند، که در این صورت حساسیت تست به ویژه در عفونت‌های اولیه ممکن است بیش از ۹۰ درصد باشد. رنگ‌آمیزی اسلایدها بوسیله آنتی‌بادی نشاندار شده فلورسین انجام می‌شود.[۸و۱۱]

c. تست نوترالیزاسیون (Neutralization Test)

اصول تست به این صورت است که به وسیله آنتی‌بادی از رشد ویروس در کشت بافت جلوگیری می‌شود. مهم‌ترین مزیت این تست حفاظت ویروسی می‌باشد. از محدودیت‌های این روش این است که فقط در آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌شود و برای تفسیر نتایج مثبت بایستی آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در تیتر معین وجود داشته باشند.[۸]

d. تست ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence)

اصول این تست به این صورت است که آنتی‌بادی‌های IgG یا IgM که متصل به نقاطی از سلول‌های آلوده شده با ویروس هستند، به وسیله آنتی‌بادی‌های ثانویه نشاندار شده روی اسلاید، تشخیص داده می‌شوند. مزیت تست این است که توانایی بازدهی تیتر بالای آنتی‌بادی را دارد و همچنین زمان انجام تست کوتاه است. از مضرات تست این است که به صورت دستی انجام شده و دریافت نتایج تست به صورت ذهنی انجام می‌شود.[۱۲]

e. وسترن بلات (Western Blot)

وسترن بلات یک روش استاندارد طلایی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های *HSV* می‌باشد. این تست یک روش سرولوژیکی بسیار حساس و ویژه است، به طوریکه امکان تشخیص قطعی ویروس را فراهم می‌کند. با استفاده از این تکنیک آنتی‌بادی‌های ضدپروتئین‌های اختصاصی ویروس قابل مشاهده می‌شوند که این امر بوسیله الکتروفورز امکان‌پذیر می‌باشد. اگرچه این تکنیک یک روش بسیار دقیق است اما نیاز به تکنیسین فنی و متخصص دارد.[۱۳]

f. الایزا (ELISA)

الایزا نیز یکی دیگر از تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص ویروس *HSV* می‌باشد. اصول تست به این صورت است که آنتی‌بادی‌های ویژه ویروس متصل به فاز جامد به وسیله علامت‌گذاری آنتی‌بادی‌های آنتی IgM و آنتی IgG ثانویه تشخیص داده می‌شوند. این تست سریع، حساس، اتوماتیک و به صورت تجاری شده است. از محدودیت‌های این تست نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب می‌باشند. نتایج مثبت با حضور آنتی‌بادی‌های IgG و IgM تایید می‌شود.[۱۴]

تمام روش‌های فوق‌الذکر، زمان‌بر و غیرقابل استفاده در جهت تشخیص سریع و دقیق هرپس ویروس‌ها است، همچنین حساسیت پایین این روش‌ها گاهی سبب تأخیر در شروع درمان و مرگ بیماران می‌گردد.

جدول ۱: مقایسه بین روش‌های کلاسیک و مولکولی

	Culture	Immuno Fluorescence	ELISA	Gene Amplification Methods
Speed to produce result	+	+++	+++	++/+++
Sensitivity	+++	++	++	++++
Specificity	+++	++	++	++++
Quantifiability	++	++	++	+++
Easy to use	+	+	+++	++/+++

جدول ۲: سیستم‌های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاهی

روش تکثیر	ابداع کننده	آنزیم مورد استفاده
Target		
-PCR	Mullis et al.	Thermophilic DNA Polymerase
-TAS	Kwoh et al.	Reverse transcriptase, RNA Polymerase
-3SR	Guatelli et al.	Reverse transcriptase, RNA Polymerase
-SDA	Walker et al.	Restriction endonuclease, DNA Polymerase
-LAMP	Notomi et al.	*BST* Large fragment DNA Polymerase
Probe		
-LAR & LCR	Wu/Wallace	DNA Ligase (Thermophilic DNA Ligase)
-QB Replicase based Amplification	Lomeli et al.	QB replicase
Signal		
-Compound Probes	Fahrlander	None
-BDNA Probes	Sanchez et al.	None

B. روش‌های تشخیص مولکولی

گام‌های سریع توسعه در تکنیک‌های بیولوژی مولکولی در طی ۲۰-۲۵ سال گذشته، موجب تأثیری عمیق در تست‌های جمعی و کاربردهای تشخیصی، خصوصاً در تشخیص عوامل عفونی و سایر کاربردها گردیده است. ابداع تکنیک‌های اسیدنوکلئیک موجب هر چه کاربردی‌تر شدن این روش‌ها در آزمایشگاه‌های مختلف خصوصاً لابراتورهای کلینیکی شده است.

روش های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه را اصولاً می‌توان در سه گروه اصلی ۱) روش‌های تکثیر هدف ۲) روش‌های تکثیر کاوشگر یا پروب و ۳) روش های تکثیر سیگنال طبقه بندی نمود. مهمترین و کاربردی‌ترین گروه تکنیک‌های تکثیر هدف می‌باشد.[۱۵]

I. سیستم‌های تکثیر هدف

در این گروه تکنیک‌های مهمی همچون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، سیستم تکثیر براساس نسخه‌برداری (TAS)، نسخه پیشرفته TAS به نام 3SR، تکثیر براساس رشته جابجا سازی شونده (SDA)، تکثیر بر مبنای توالی نوکلئیک اسید (NASBA)، تکثیر به واسطه رونویسی (TMA)، تکثیر چرخه غلتان (RCA) و تکثیر همدما بر پایه حلقه (LAMP) وجود دارد. در سیستم‌های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، مولکول هدف (DNA یا RNA) با استفاده از آنزیم به تعداد زیادی همانندسازی می‌گردد تا میزانی که بتوان محصول را با روش‌هایی مثل الکتروفورز در ژل آشکار نمود.[۱۶]

اولین و شاید بتوان گفت مهمترین و بهترین سیستمی که در آن مولکول هدف افزایش تعداد می‌یابد، تکنیک PCR می‌باشد. از نظر اصول علمی، این تکنیک شباهت زیادی به همانندسازی DNA داشته و در واقع برگرفته از آن است. تکنیک PCR تمامی مشکلات پیشین در بیولوژی مولکولی را که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد DNA یکسان بود، برطرف کرده است.[۱۵]

a. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction)

تکنیک PCR، مهمترین و بهترین سیستمی است که در آن مولکول هدف تکثیر می‌یابد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز امکان تکثیر رشته DNA را می‌دهد و می‌تواند به عنوان روش کاربردی در شناسایی ژن‌ها و کمی‌سازی آنها مورد استفاده قرار گیرد. پس از اختراع روش PCR توسط کری مولیس در سال ۱۹۸۵، این روش به سرعت در تمامی آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و تشخیصی مولکولی در تمام نقاط جهان به کار گرفته شد و انقلاب عظیمی در زیست‌شناسی مولکولی ایجاد کرد. امروزه تکنیک PCR به عنوان یکی از متداول‌ترین و پرکاربردترین روش‌ها در زیست‌شناسی مولکولی به شمار می‌رود. شناسایی توالی‌های نوکلئوتیدی میکروارگانیسم، ابزاری حساس و اختصاصی برای تعیین عوامل بیماریزا در نمونه‌های بالینی است. آزمون تشخیص مولکولی، به گونه‌ای اصلاح و استانداردسازی شده‌اند که به نحو قابل اعتمادی میزان کمی توالی‌های ژنومی را در نمونه‌های بالینی تعیین می‌کنند.[۱۵و۱۷]

برای کاربرد بیشتر و دقیق‌تر تکنیک PCR در تشخیص، روش‌های تغییر یافته‌ای از آن به وجود آمده است.[۱۵و۱۸]

Multiplex PCR .b

یکی از روش‌های تغییر یافته PCR معمولی، روش Multiplex PCR است. در این روش از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت هدف‌های مختلف در یک واکنش تکثیری استفاده می‌شود. چندین منظور یا هدف از این تکثیر همراه هدف‌های مختلف وجود دارد مانند: ۱. بخش‌های بزرگی از یک DNA، جهت جستجوی تغییرات می‌تواند بررسی شود. ۲. بخش‌های غیرمربوط به هم در ژنوم هدف می‌تواند مورد آزمایش واقع شود. ۳. می‌توان از طریق این روش، کنترل‌های داخلی برای تکثیر شدن نمونه در نظر گرفت. ٤. بر روی یک نمونه می‌توان با پرایمرهای مختلف به جستجوی عوامل مختلف عفونی پرداخت.[۱۵]

RT-PCR .c

برخی از موجودات مانند برخی از ویروس‌هایRNAدار، ژنومشان تنها از RNA تشکیل شده است؛ الگوی RNA نیز می‌تواند بعنوان هدف، در تکنیک RT-PCR به کار گرفته شود، به این شرط کهRNA استخراج شده ابتدا با استفاده از آنزیم RT تبدیل به cDNA شود. این آنزیم ابتدا از Avian Myeloblastosis Virus (AMV) و Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) به دست آمد. کاربرد آنزیم RT این دو ویروس دارای اشکالاتی است از جمله این که این آنزیم به حرارت حساس است؛ لذا شرایط به کار رفته به شکل سختی پایین می‌باشد. ولی بعدها از باکتری حرارت دوستی بنام ترموس‌ترموفیلوس که از یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت (به نام T_{th}) جدا گردید که در حضور یون Mn^{2+} دارای فعالیت نسخه‌برداری معکوس است. این آنزیم می‌تواند در دمای ۷۲ͦC در حضور Mn^{2+}، از روی RNA، DNA بسازد؛ سپس این Mn^{2+} اضافه شده را از طریق اضافه کردن EDTA که یک عامل مهارکننده است حذف شده و سپس این آنزیم از cDNA که خود ساخته است، استفاده کرده و آن را تکثیر می‌نماید. بنابراین همانگونه که مشاهده می‌شود یک آنزیم می‌تواند به تنهایی از روی RNA، cDNA بسازد و سپس cDNA ساخته شده در اثر یک تغییر ساده در شرایط بافری (اضافه کردن EDTA) توسط تکنیک PCR تکثیر می‌شود.[۱۵و۱۹]

ARMS-PCR .d

آرمز یا سیستم تکثیر منعکس‌کننده جهش، تکنیکی قدرتمند برای مشخص کردن جهش‌های نقطه‌ای است. در این تکنیک از پرایمرهای نوع جهش یافته و نرمال در دو لوله جداگانه استفاده می‌شود. اساس این تکنیک بر این پایه است که DNA پلیمراز عمل پلیمریزاسیون را از انتهای پرایمر در جهت '۳→'۵، زمانی آغاز می‌کند که باز انتهای'۳ پرایمر، ناجور نباشد یعنی به ترادف مکمل خود بچسبد. اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر نرمال انجام شود، نشان‌دهنده عدم وجود جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود، نشان دهنده حضور جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر می‌باشد.[۱۵]

Nested-PCR .e

یک روش دیگر PCR که در آن از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود و جفت دوم در دل جفت اول جای می‌گیرد، روش Nested-PCR است. در این روش ابتدا بوسیله جفت پرایمر بیرونی در طول ۱۵–۳۰ سیکل ترادف هدف ازدیاد می‌یابد. سپس محصول PCR حاصل، به لوله دیگر منتقل می‌شود و بعنوان الگو و با استفاده از جفت پرایمرهای داخلی، مرحله دوم PCR انجام شده و ترادف کوچکتر که در دل محصول PCR اولی است، تکثیر می‌گردد (۱۵–٤۰ سیکل). این روند اغلب موفق است حتی اگر فرآورده صحیح در دور اول کمتر از مقداری باشد که بوسیله اتیدیوم بروماید و ژل آگاروز قابل آشکارسازی باشد.[۱۵]

مزایای این روش تغییر یافته PCR عبارتند از:

۱. حساسیت در این روش به میزان زیادی بالاتر است.

۲. نیاز به بروز و تأییدهای بعدی کمتر است.

۳. ویژگی این روش بخاطر حضور پرایمرهای درونی بالاتر است.

٤. به دلیل انتقال محصول PCR دور اول به لوله جدید، ممانعت کننده‌ها رقیق می‌شوند.[۱۵]

حد تشخیص روش‌های PCR معمولی، کمتر از ۵۰ تا ۱۰۰ نسخه در هر میلی‌لیتر نمونه است. برای افزایش حساسیت PCR معمولی، روش Nested PCR نیز توسعه پیدا کرده است. روش یاد شده به دلیل استفاده از پرایمرهای بیشتر، ویژگی بسیار بالایی برای تکثیر ژن فراهم می‌کند، اما به دلیل انجام این روش در دو مرحله، احتمال آلودگی محصولات در هنگام انتقال از مرحله اول PCR به مرحله دوم، پاسخ مثبت کاذب را به دنبال دارد. از این رو برای جلوگیری از ایجاد هرگونه آلودگی احتمالی نیاز پرسنل ماهر دارد.

اخیراً نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی در این روش، بین ٤ تـا ۳۱ درصد گزارش شده است.[۱۵]

Inverse-PCR .f

در تکنیک Inverse-PCR، DNAی الگو ابتدا با یک اندونوکلئاز محدودکننده هضم می‌گردد و سپس قطعه مورد نظـر کـه بخشـی از ترادفش مشخص و بقیـه نامشـخص اسـت در حجـم بـالا لایگیـت می‌گردد. پرایمرها برای بخش مشخصـی (بـرخلاف جهـت هـم یـا پشت به هم) از لحاظ ترادف طراحی شده، عمل تکثیر حلقـه انجـام و محصول قسمت درونی ایجاد می‌شود.[۱۵]

Anchored-PCR .g

در ایـن روش قطعـه DNA یـا RNA ای داریـم کـه بخشـی از ترادف آن مشخص و باقی نامشخص است. ابتدا این قطعه DNA را از طریق هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده، تک رشته می‌کنیم. برای یک رشته آن، یک پرایمر از قبل طراحی شده است. این قطعـه تک رشته را بوسیله تک پرایمر، با روش PCR می‌سازیم. به انتهـای تک رشته حاصل و ساخته شـده، دم پلـی G بـا اسـتفاده از ترمینـال داکسی‌نوکلئوتیدیل ترانسفراز اضافه می‌شود. سپس عمل PCR بدین صورت انجام می‌شود که یک پرایمر اختصاصی داخلی‌تر نسبت بـه پرایمر اول و دو پرایمر غیراختصاصی استفاده مـی‌شـود. از ایـن دو پرایمر غیراختصاصی، یکی حاوی بخش Poly (dc) و یـک تـرادف قلاب حاوی محل برش آنزیم محدودکننده مورد نظر و دیگری فقط دارای تـرادف قـلاب مـی‌باشـد. پرایمـر بزرگتـر غیراختصاصـی و حاوی Poly (dc)، در مراحل اولیه همانندسازی شـرکت مـی‌کنـد و منجر به ساخت مولکول هدف حاوی ترادف قلاب ضروری، بـرای پرایمر غیراختصاصی کوچکتر (که غلظت ۱۰ برابر بیشـتر از پرایمـر غیراختصاصی بلندتر است) می‌شود.[۱۵]

Ligation-PCR .h

در این روش، یک الگوی تک رشته وجـود دارد کـه بخشـی از تردادف آن مشخص و بیشتر ترادف آن نامشخص است. ابتدا بوسـیله یک پرایمـر اختصاصـی بـه نـام (Extension primer) بـرای محـل مشخصی از لحاظ ترادف رشته مکمل سـاخته و محصـول بـا یـک لینکر دو رشته‌ای لایگیت می‌شود (لینکر فقط با DNA دو رشته‌ای و با انتهاهای صاف لایگیت می‌گردد). سـپس بوسـیله دو پرایمـر کـه یکی مخصوص لینکر و دیگری مخصوص ترادف از قبـل مشـخص است، عمل PCR انجام می‌گردد.[۱۵]

Race-PCR .i

می‌دانـیم در انتهـای mRNAهـا، Poly-A وجـود دارد. در ایـن روش، ابتدا یک پرایمر حاوی دم یا قـلاب بـه تـک رشـته mRNA اضافه و آنزیم نسخه‌بـردار معکـوس (RT) اضـافه مـی‌شـود. بـدین ترتیب cDNA Hybrid (DNA/RNA) ساخته و سپس با اسـتفاده از یک جفت پرایمر عمل PCR انجـام مـی‌شـود. بـدین ترتیـب در دو رشته حاصل یا محصول نهایی PCR، قلاب‌هـا (حـاوی محـل‌هـای آنزیم محدود کننده) وجود دارند.[۱۵].

Immuno- PCR .j

روش Immuno PCR، در حقیقـت ترکیبـی از روش الایـزا و PCR است. تاریخچه تکامل تکنیک IPCR تقریباً مربوط به ۱۵ سال اخیر می‌باشد. ایده اولیه ترکیب اتصال آنتی‌بادی به یـک آنتـی‌ژن بـا قدرت تقویت سیگنال‌دهی PCR به شکل اولیه خـودش مربـوط بـه سال ۱۹۹۲ است و Sano/Smith پروتکل اولیه IPCR را ارائه دادنـد که این پروتکل برعکس پروتکل الایزا بـود؛ بـدین صـورت کـه در الایزا از ترکیب Ab-Ag اسـتفاده مـی‌شـود و سوبسـترای آنـزیم بـه صـورت آزاد و پراکنـده اضـافه مـی‌شـود ولـی در تکنیـک IPCR سوبسترای آنزیم با همان الگوی DNA به آنتی‌بادی متصل می‌شود و آنزیم بعداً به آن اضافه می‌شود که با تقویت قدرت LOD (محـدوده تشخیص) بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌یابد.[۲۰]

ایـن روش در حقیقـت ترکیبـی از روش الایـزا و PCR اسـت، بدین صورت که قدرت تشخیص آنتی‌ژنهای پروتئینی را با توجه به روش الایزا داشته و از طرفی بـا اسـتفاده از روش Real Time PCR این توانایی را دارد که بطور اختصاصی فقط توالی مربوط به آنتی‌ژن هدف را شناسایی نموده و طی سیکل‌های متعدد PCR این تـوالی را برای تشخیص دقیق‌تر افزایش دهد، در نتیجه بـدلیل قـدرت بسـیار بالایی که در تشخیص آنتی‌ژن‌های پروتئینی و آنتـی‌بـادی پروتئینـی دارا است، این روش بیشتر بـرای اجـرای آنتـی‌ژنهـای باکتریـایی و ویروسی بکار می‌رود.[۲۰]

Real Time PCR .k

از زمان معرفی روش PCR، این متد تحولات بسیاری را پیـدا نموده به گونه‌ای کـه هـم اکنـون بـه عنـوان یکـی از دقیـق‌تـرین و سریع‌ترین روش‌های تشخیصی در بسیاری از عرصه‌هـای علـوم بـه کار گرفته می‌شود. در راستای کاربردی‌تر شدن این روش، مکانیسـم انجام و تشخیص نتایج حاصل از آن نیـز دچـار تحـولات متعـددی

گردیده که بررسی نتایج حاصل از آمپلی‌فیکاسیون با استفاده از مواد نشان‌دار یکی از آن موارد است. تکنیک Real Time PCR در واقع نقطه برخورد ابداعات جدید در زمینه ترموسایکلر، انواع تغییرات در پرایمرها و مخلوط کردن روش‌های هیبریدیزاسیون با تکنیک‌های آمپلی‌فیکاسیون می‌باشد. در واقع نسل جدیدی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری، این اواخر وارد بازار شده که اجازه مانیتور کردن پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را می‌دهد. در این سیستم‌ها از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریدیزاسیون مارک‌دار شده با رنگ فلوئورسانس در انتهای '۵ یا '۳ استفاده می‌شود که امکان مانیتورینگ پیوسته محصول PCR را بدون جداسازی آنها در روش‌هایی همچون الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل‌آمید، می‌دهد. هیگوشی اولین کسی است که با ساخت یک سیستم ساده در سال ۱۹۹۲، اقدام به شناسایی همزمان محصول PCR در طی تکثیر نمود و بدین ترتیب مرحله شناسایی محصول را بعد از تکثیر، حذف نمود.[۱۵]

در روش‌های Real-Time PCR نیازی به دستکاری‌های بعد از مرحله تکثیر آمپلیکون نمی‌باشد؛ بنابراین، این روش‌های سنجش به روش‌های بسته یا سیستم‌های هوموژن مشهور گردیده‌اند. از مزایای سیستم‌های هوموژن به حداقل رسیدن آلودگی بعنوان آفت اصلی روش‌های تکثیری و توانایی انجام دقیق سنجش می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR در سال‌های اخیر بعنوان یک استاندارد طلایی جدید، جهت شناسایی طیف وسیعی از الگوها مورد استفاده واقع شده است. در روش‌های سنتی PCR، ردیابی محصول در نقطه انتهایی انجام می‌شود، در صورتی که روش‌های Real time عمل ردیابی محصول در حین انجام واکنش و به موازات پیشرفت آن، سیکل به سیکل انجام می‌گردد. از آنجایی که اسیدنوکلئیک تکثیر یافته و مراحل تشخیص در یک محیط بسته انجام می‌شود، ریسک آلودگی به محیط و واکنش‌های بعدی را به طور قابل ملاحظه نسبت به روش کلاسیک و معمولی PCR کاهش می‌دهد. سرعت در انجام آزمایش، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR، مشاهده لحظه به لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا و انجام واکنش کمی و به دست آوردن میزان دقیق ژنوم و الگوی اولیه در روش Real Time PCR باعث تحول عظیم در تشخیص مولکولی میکروارگانیسم‌ها و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است.[۱۵]

در بین روش‌های تشخیصی مولکولی، انواع روش‌های مختلف PCR مانند رونوشت‌برداری معکوس (RT-PCR)، آشیانه‌ای (Nested PCR)، چندگانه (Multiplex PCR) و زمان واقعی (Real-Time-PCR) بیشترین موارد استفاده را دارند. روش Real-Time-PCR از لحاظ کاهش احتمال آلودگی، سرعت، ویژگی، اندازه‌گیری کمی و استاندارد سازی آسان، نسبت به PCR معمولی برتری دارد. اما به دلیل اینکه برای تکثیر توالی هدف نیازمند کیت و تجهیزات گران قیمت از قبیل نور سنج‌هایی برای ساطع کردن و جمع‌آوری نور، کامپیوتر و نرم‌افزار برای آنالیز داده‌ها است، به عنوان یک ابزار تشخیصی متداول در آزمایشگاه‌های خصوصی و کلینیکی از آن استفاده نمی‌شود. به طور کلی با وجود سرعت، ویژگی و حساسیت بالای روش‌های PCR، به دلیل نیاز به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر برای تکثیر و الکتروفورز در ژل برای تشخیص محصولات، در بسیاری از مراکز تشخیصی قابل استفاده نخواهد بود.[۱۵و۲۳-۲۸]

جدول ۳: ویژگی‌ها و ایرادات تکنیک‌های مولکولی

Advantages	Disadvantages
Speed –Results available in a few hours	Commercial assays expensive (but becoming relatively less so)
High sensitivity- gold standard for many viruses	High set up costs (equipment) for in house assays
Wide range of applications/ versatility increasing availability of automation	Susceptible to contamination rigorous quality-control systems required for in-house molecular diagnostics
Increasing availability of commercial assay kits with built-in quality control	Some assays lack clinical validation
Increasing availability of external quality assurance programmers	Lack of availability and expertise outside specialist centers
Amplicon can be used for sequencing/ genotyping	No isolate available for phenotyping
Can be highly specific to viral subtype	Target sequence must be known and highly conserved

l. تکثیر بر مبنای توالی نوکلئیک اسید

تکثیر بر مبنای توالی نوکلئیک اسید (NASBA)، یکی از روش های تکثیر همدما است که در این روش نیازی به استفاده از ترموسایکلر نیست و از مجموعه واکنش‌های آنزیمی مختلف تشکیل شده که در آن RNA با سکانس مشخص به عنوان الگوی واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنزیم RNA پلیمراز T_7 باعث سنتز DNA از روی RNA و دنبال آن هیدرولیز RNA متصل به DNA می شود. به دنبال ایجاد cDNA از RNA هدف و هضم رشته متصل به DNA، پرایمر دوم به رشته cDNA تازه سنتز شده متصل و با عملکرد آنزیم پلیمراز، DNA دو رشته‌ایی تشکیل می‌شود. روش‌های NASBA و 3SR حساسیت بسیار بالایی دارند و قادرند کمتر از ۱۰ نسخه در میلی لیتر اسید نوکلئیک هدف را در کمتر از یک ساعت تکثیر کنند؛ اما به دلیل کم بودن ویژگی شان در انتخاب توالی هدف، نیازمند ابزار دقیق برای تکثیر و روش‌های پیچیده برای تشخیص محصولات می‌باشند.[۱۵]

m. تکثیر همدما بواسطه حلقه (Loop Mediated Isothermal Amplification)

در سال ۲۰۰۰ نوتومی و همکاران نسلی جدید از تکنیک‌های تکثیر ژن به نام روش تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه یا LAMP را گزارش کردند و این روش به صورت گسترده در شناسایی و تشخیص عوامل بیماری‌زا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده می‌شود. در این روش اسیدنوکلئیک هدف توسط آنزیم DNA پلیمراز *Bst* و ٦ عدد پرایمر اختصاصی که ۸ ناحیه مجزا در توالی هدف را تشخیص می‌دهند، تکثیر می‌شود. آنزیم DNA پلیمراز *Bst* علاوه بر تکثیر، قادر است دو رشته DNA را از یکدیگر جدا کند. به عبارتی دیگر در این روش، DNA بدون نیاز به چرخه های دمایی به صورت خود چرخه‌ای تکثیر می‌شود. بنابراین روش LAMP نیاز به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر ندارد و به راحتی توسط حمام آب یا بلوک حرارتی فراهم کننده دمای یکنواخت ٦٢-٦٥ $\dot{C}$ (دمای بهینه برای فعالین آنزیم DNA پلیمراز *Bst*) انجام می گیرد. در واقع مهمترین مزیت روش LAMP از دیدگاه کشورهای در حال توسعه با منابع مالی محدود، کمتر بودن هزینه ابزارهای لازم برای تکثیر است. ساختار ویژه پرایمرهای LAMP و زیاد بودن تعداد آنها علاوه بر افزایش ویژگی واکنش، نقاط آغازین بیشتری را برای DNA پلیمراز فراهم می‌کند و منجر به افزایش راندمان و سرعت تکثیر می‌شود. به این ترتیب DNA هدف در مدت ۹۰-۱۵ دقیقه 10^{9}-10^{10} برابر ازدیاد می یابد و مقدار بسیار زیادی محصول تولید می‌شود. به منظور تشخیص محصولات LAMP می‌توان همانند PCR از روش الکتروفورز در ژل استفاده کرد. اما به دلیل تولید مقدار زیادتری محصول واکنش LAMP نسبت به PCR، می توان با استفاده از رنگ‌های فلورسنس متصل شونده به DNA و یا از طریق انباشته شدن محصولات جانبی، نتایج تکثیر را به ترتیب به صورت تغییر رنگ یا ایجاد کدورت در میکروتیوب حاوی محصولات به راحتی مشاهده کرد. بنابراین برای بررسی نتایج واکنش LAMP نیاز به روش پر زحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطان‌زای اتیدیوم بروماید وجود ندارد. علاوه بر این، با اندازه گیری تغییر در کدورت توسط اسپکتروفتومتر و رسم منحنی استاندارد می توان میزان محصولات و تعداد نسخه های ژن را به صورت کمی با روش Real-Time اندازه گیری کرد. یکی دیگر از مزایای مهم واکنش LAMP این است که کمتر از واکنش PCR تحت تاثیر مهارکننده‌های موجود در نمونه‌های کلینیکی قرار می‌گیرد. همچنین بر خلاف PCR لزوماً نیازی به استخراج اسید نوکلئیک هدف وجود ندارد و مستقیماً بر روی نمونه های کلینیکی (با حساسیت کمتر) قابل انجام است.[۲۱]

از دیگر ویژگی‌های مهم این روش، ادغام آن با روش رونوشت‌برداری معکوس است. بدین ترتیب، در صورتی که اسیدنوکلئیک هدف RNA باشد، با افزودن آنزیم رونوشت‌بردار معکوس به مخلوط واکنش، RNA به عنوان الگو تکثیر شده و با حذف مرحله اضافی cDNAسازی باعث صرفه جویی در هزینه و زمان می شود. روش LAMP تاکنون برای تشخیص انواع مختلفی از عفونت‌های میکروبی و ویروسی توسعه پیدا کرده است. به طور کلی، روش LAMP با در نظر گرفتن مزایایی مانند سادگی، سرعت تکثیر زیاد و تشخیص آسان، کاربردهای بالقوه ای را برای تشخیص کلینیکی و پایش بیماری های عفونی در کشورهای در حال توسعه می‌تواند داشته باشد.[۲۲]

آنزیم DNA پلیمراز *Bst* محصول ژن تغییر یافته آنزیم DNA

پلیمراز باکتری باسیلوس استئارو ترموفیلوس با وزن مولکولی ٦٧ کیلو دالتون می‌باشد. این آنزیم دارای فعالیت پلیمرازی '٥ به '٣ و اگزونوکلئازی '٣ به '٥ است. همچنین همزمان با پلیمریزاسیون، توانایی جداسازی دو رشته DNA و سنتز خود چرخه‌ای DNA را دارد. فعالیت بهینه آنزیم در دمای ثابت ٦٠-٦٥°C به ویژه ٦٣°C است؛ اما با توجه به غیر فعال شدن آن در دمای بالاتر از ٧٠°C، از آن نمی توان به منظور PCR و توالی یابی با چرخه‌های دمایی استفاده کرد، اما برای تکثیر همدمایی DNA به ویژه تکثیر نواحی دشوار مانند توالی های تکرار شونده، نواحی غنی از GC و ساختارهای ثانویه مناسب است. با استفاده از روش LAMP می توان تعداد نسخه‌های بسیار کم (کمتر از ١٠ نسخه در میلی‌لیتر) DNA یا RNA را در نمونه تشخیص داد. در اغلب پژوهش‌های انجام شده حساسیت روش LAMP مشابه Nested PCR و ١٠ تا ١٠٠ برابر PCR معمولی گزارش شده است.[١٨و١٩و٢١و٢٢و٢٩و٣٠و٣١]

جدول ٤: مقایسه ویژگی‌های تکنیک PCR و LAMP

Difference	PCR	LAMP
Definition	PCR is a rapid and simple technique of producing relatively large number of copies of DNA molecules from minute quantities of source DNA material	LAMP that amplifies DNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal conditions
Denaturation step	Denaturation step is compulsory: denature double stranded into a single stranded form	No need for a step to denature double stranded into a single stranded form
Specificity	Two primers are to amplify template DNA	Four specially designed primers that recognize a total of six distinct sequences on the target DNA
Sensitivity	The sensitivity and specificity are not 100%	The sensitivity and specificity are 100%
Time requirement	PCR take more time than LAMP	LAMP take less time than PCR
Cost	Costly method in comparison to LAMP	Cheapest method in comparison to PCR

References

1. Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ. Herpes Simplex type-1 (*HSV-1*) infection of the nervous system: Is an immune response a good thing? J Neuroimmunol. 2010; 220(1-2): 1-9.
2. Whitley R, Roizman B. Herpes Simplex Virus infections. Lancet 2001; 357(9267): 1513-8.
3. Fauci Anthony S., Braunwald Eugene, Kasper Dennis L., Hauser Stephen L., Longo Dan L., Jameson J. Larry, Loscalzo Joseph. Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill Professional. 17th Edition, 2008.
4. Miller CS, Danaher RJ. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105(1): 43-50.
5. Fenner F.J, White D.O. Medical Virology. 1994. Fourth Edition, 202-205: 318-346.
6. Whitley R, Roizman B. Herpes Simplex Virus infections. Lancet 2001; 357: 1513-18.
7. Solomon AR. New diagnostic tests for herpes simplex and varicella zoster infections. J Am Acad Dermatol. 1988; 18: 218-21.
8. Singh A, FRCPC BM, Preiksaitis S, FRCPC MD, Ferenczy A, Romanowski B, FRCP MD. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. Can J Infect Dis. 2005; (2): 92-98.
9. Boddingius J, Dijkman H, Meijden WV, Schmitz P, Joost T, Stolz E. (1987) Replication characteristics and of intranuclear herpes simplex (HSV-1) in genital skin lesions: electronmicroscopy studies of a biopsy from a female patient. Med. Microbiol. 1987; 24: 93-103.
10. Fatahzadeh M, Schwartz Ra. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptonatology, diagnosis and management. Jam Acad Dermatol. November 2007; 4: 1101-1109.
11. Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, Tepperberg M, Grossman Z. Laboratory assessment and diagnosis of congemital viral infections: Rubella, Cytomegalovirus (CMV), Varicella – Zoster Virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovitus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). Reproductive Toxicology 2006; 21: 350-382.
12. Strick L, Wald A. Type – specific testing for herpes simplex virus. Expert Rev Mol Dign. 2004; 4(4): 443-53.
13. Brown Za, Wald A, Morrow RA, Selke S, Zeh J, Corey L. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. JAMA 2003; 289: 203-209.

14.Koskiniemi M. Viral Encephalitis through A changing panorama, a review. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology 2007; 23: 123-133.

15.Shahhosseiny MH, Tehrani M. Polymerase Chain Reaction (PCR). Islamic Azad University. 2005: 45-68.

16.Shahhosseiny MH, Rahimi AA. Molecular Genetics: concepts & applications. Islamic Azad University. 2007: 180-210.

17.Ghasemi Shahin, Arjmand MH, Haghnzarian Adith. The Basics of Sicilian Medicine in Infectious Diseases. Andréulie and Carpenter. Arjmand Publication. 2010.[In Persian].

18.Atefi Aref, Shahhosseiny MH, Ayatollahi Jamshid. Investigation of the diagnostic value of the LAMP technique for rapid and accurate diagnosis of Bacillus anthrasis in comparison with other molecular methods. 2015.

19.Atefi Aref, Shahhosseiny MH, Bidoki Kazem, Mansouri Reza. Diagnosis of herpes simplex virus in patients with multiple sclerosis through LAMP. Tesis for obtaining a Master's degree in microbial biotechnology. Payam Noor University of Tehran East. 2013.

20. Atabati Hadi, Journal of Laboratory News, 1394; 4 (139): 114-116.

21.Askari Kazem, Kargar Mohammad, Ghorbani Dalini Sadegh, Doosti Abbas. Repeated reproduction by a loop, rapid detection method for infectious agents. Journal of the World of Germs 1392; 5 (1): 7-22.

22.Aref Atefi. An overview of the molecular techniques for identification of Bacillus anthrasise. ABO Plus magazine. 2016; 1(1): 15-18

23.Wildy P, Russell WC, Horne RW. The morphology of herpes virus. Virology 1960; 12(2): 204-22.

24. Leinweber B, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of cutaneous herpes virus infections (herpes simplex, herpes varicella/zoster): a broad spectrum of presentations with common pseudolymphomatous aspects. The American journal of surgical pathology 2006; 30(1): 50-8.

25.Bayliss GJ, Marsden HS, Hay J. Herpes simplex virus proteins: DNA-binding proteins in infected cells and in the virus structure. Virology 197; 68(1): 124-34.

26.Rowley AH, Wolinsky SM, Whitley RJ, Lakeman FD. Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. Lancet 1990; 335(8687): 440-441.

27.Spivack JG, Fraser NW. Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. Journal of Virology 1987; 61(12): 3841-7.

28.Lee FK, Coleman RM, Pereira L, Bailey PD, Tatsuno M, Nahmias AJ. Detection of herpes simplex virus type 2-specific antibody with glycoprotein G. Journal of clinical microbiology 1985; 22(4): 641-4.

29.Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Suga S, Suzuki K, Kawana T, Nishiyama Y, Asano Y. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. Journal of clinical microbiology 2005; 43(2): 951-5.

30.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. Journal of clinical microbiology 2005; 43(7): 3290.

31.Atefi Aref, Shahhosseiny MH, Dehghan Hossien, Dehghan Parisa, Ayatollahi Jamshid, Shiekhpour Robab. Overview on Anthrax. Sokanvaran pub. 2018.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, July 2020, Vol. 9, No. 3: 323-334 *Review Article*

Aref Atefi[1*], Parisa Dehghan[2], Amir Hossien Ahmadieh Yazdi[3], Anahita Khosravi[4]

[1] *Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Tehran North branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry Sciences, Yazd branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran*
[3] *Department of Biotechnology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.*
[4] *M.Sc. of Teaching English, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

***Corresponding Author:**
Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Tehran North branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Tel: 0913 9536922
E-mail: aref.atefi@gmail.com

A Review of the Classical and Molecular Diagnostic Methods of Herpes Simplex Virus

Received: 14 Jul. 2018 ; Accepted: 28 Aug. 2019

Abstract

Human Herpes Viruses (*HSV*) contain eight pathogens. *HSV* is one of the most widespread viruses in the world and due to the simplicity of the way of transmission the number of people infected with the virus has increased in per year. The virus creates a wide range of diseases, including mucosal herpes infections and deadly herpes simplex encephalitis.

Today, for the diagnosis of *HSV* infection several classic methods such as Morphological, Immunomorphologic, Virological and Serological methods, including Microscopic examination, Virus Culture, Western Blot and ELISA are used. But the speed, sensitivity and specificity of nucleic acid techniques (Molecular Technique) such as simple and modified PCR technique and Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) have led them to become an attractive tool for diagnostic laboratories, and in particular the rapid identification of viral disease agents. In this review article, various methods for detecting herpes viruses were examined and compared.

Keywords: Herpes Simplex Virus, Diagnosis, Molecular Techniques