

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ۴: از ۵۷-۶۳
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

راهاندازی آزمایش الایزا برای تعیین عیار آنتی‌بادی ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک و مقایسه نتایج با روش خنثی‌سازی ویروس

کبرا رضوی پاشاییگ^۱، حوریه سلیمان جاهی^{۲*}، یاشار محمدزاده صدیق^۱، محمدحسن روستایی^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۲۰

چکیده

هدف: ویروس‌های هرپس سیمپلکس، عامل عفونت‌های انسانی مسئول تولید عفونت‌های ماندگار و نهفته، در سراسر جهان محسوب می‌شوند. عفونت‌های ویروس هرپس سیمپلکس اغلب به‌صورت مستمر در جمعیت نرمال عود مکرر دارند اما در افراد با نقص سیستم ایمنی مشکلاتی را ایجاد می‌کند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا ویروس‌های هرپس سیمپلکس در سلول‌های BK تکثیر یافت و عیار آنتی‌بادی‌ها علیه ویروس هرپس سیمپلکس در ۵۰۲ نمونه جمع‌آوری شده با آزمون خنثی‌سازی ویروس به‌عنوان استاندارد طلایی و الایزای طراحی شده تعیین شد.

نتایج: براساس نتایج به‌دست آمده به‌ترتیب ۸۰/۴۸ و ۸۱/۶۷ درصد عیار بیش از ۱/۸ در آزمون خنثی‌سازی ویروس و الایزا داشتند ضریب پیرسون بین متغیرهای مورد بررسی ۰/۹۶ محاسبه شد که نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار و نزدیک بین متغیرهای مورد بررسی فوق می‌باشد (ضریب پیرسون=۰/۹۶).

نتیجه‌گیری: اطلاعات به‌دست آمده نشان داد که آزمون الایزای طراحی شده می‌تواند برای غربالگری و بررسی شیوع آنتی‌بادی‌های ضد هرپس سیمپلکس نوع ۱ استفاده شود که به‌نوبه خود در سازماندهی بیماران خاص برای درمان با به‌کارگیری روش‌های آزمایشگاهی کم‌هزینه و مناسب مؤثر است.

کلیدواژگان: ویروس‌های هرپس سیمپلکس، خنثی‌سازی ویروس، آزمون الایزا

۱- مقدمه

ارگان‌های تناسلی و همچنین شایع‌ترین علت آنسفالیت تک‌گیر در ایالات متحده است [۱، ۳]. آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) پاسخ‌های وابسته به کمپلمان، ۲ تا ۶ هفته پس از عفونت ظاهر می‌شوند و مادام‌العمر باقی می‌مانند [۴]. این ویروس گسترش وسیعی در طبیعت و جوامع مختلف انسانی دارد [۲، ۳] در اثر

ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک (Herpes Simplex Virus type-1: HSV-1) از خانواده هرپس ویریده در جنس سیمپلکس ویروس دارای ژنوم DNA دو رشته‌ای است [۱، ۲]. این ویروس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی شامل عفونت‌های سیستمیک در نوزادان و افراد دارای نقص ایمنی، عفونت‌های موضعی غشاهای مخاطی، پوست، قرنیه،

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

الایزا برای هرپس سیمپلکس و مقایسه با روش خنثی سازی

کبرا رضوی پاشابینگ و همکاران

تکثیر ویروس در کشت یاخته آثار تخریب ناشی از آن شامل بالونی شدن یاخته‌های آلوده، تولید انکلوژن بادی‌های (Inclusion bodies) داخل هسته‌ای، تشکیل یاخته‌های غول پیکر چندهسته‌ای، حاشیه‌نشینی کروماتین دیده می‌شود. با وجود این که عفونت‌های ویروس هرپس در تمام نقاط جهان گسترده‌گی دارند اما در کشورهای در حال توسعه به دلیل سطح پایین بهداشت، دارای شیوع بسیار بالایی هستند [۵]. با توجه به افزایش روزافزون عفونت‌های هرپسی در دستگاه تناسلی و به دنبال آن عفونت‌های هرپسی نوزادان و این که این ویروس در نوزادان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی معمولاً بیماری‌کننده ایجاد می‌کند و تشخیص به موقع و درمان می‌تواند از تعداد مرگ و میر بکاهد [۱، ۵]، بنابراین طراحی روشی سریع و حساس و مقرون به صرفه برای تشخیص عفونت و نیز به عنوان آزمون مناسب برای غربالگری در جامعه در معرض خطر "نوزادان، سالمندان و افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف شده" به منظور سازماندهی درمان، مورد نیاز است. بدین منظور از بین روش‌های تشخیص سرولوژیکی این ویروس، آزمایش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و آزمایش خنثی‌سازی ویروس (Virus Neutralization Test: VNT) راه‌اندازی و با هم مقایسه شدند.

در این پژوهش، ELISA با کیت طراحی شده در آزمایشگاه که می‌تواند به عنوان آزمون بومی برای غربالگری محسوب شود انجام شد و آزمایش VNT به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد.

۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا ویروس HSV-1 در سلول‌های BK (R_Kh_BK) (تیره یاخته‌ای رازی- خدمتی) با محیط (Dulbecco's Modified Eagles Medium) DMEM تکثیر شد و به روش اسپرمن- کاربر (Spearman-Karber) تیتراژ آن $10^{-7.5}$ (TCID₅₀) در میلی‌لیتر تعیین شد. آزمایش VNT به روش رقت ثابت ویروس- رقت متغیر سرم (Constant Virus-Varying Serum Dilutions) برای تعیین عیار آنتی‌بادی‌ها علیه HSV-1 در ۵۰۲ نمونه پلاسمای

انسانی تهیه شده از سازمان انتقال خون، از بین اهداکنندگان نوبت اول که همگی دارای سن بالاتر از ۱۸ سال و به‌طور تصادفی جمع‌آوری شده بود، انجام شد.

برای انجام این آزمون ابتدا تک لایه‌ای از سلول‌های BK در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (NUNC) با محیط کشت DMEM آماده شد، نمونه‌های سرمی تحت مطالعه به مدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به منظور حذف عوامل کمپلمان حرارت داده شدند، سپس رقت‌های متوالی سرم (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶، ۱/۵۱۲) در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای محتوی محیط کشت فاقد سرم تهیه شد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی با رقت $10^{-0.75}$ (معادل TCID₅₀ ۱۰۰ ذره ویروسی) بود، به حجم مساوی از رقت‌های تهیه شده نمونه‌های سرمی اضافه و میکروپلیت به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا واکنش بین آنتی‌بادی‌های احتمالی موجود در سرم و ذرات ویروسی رخ دهد؛ سپس از هر چاهک محتوی سرم و ویروس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک همتای خود در میکروپلیت دیگری که حاوی تک لایه سلولی BK بود، اضافه شد. میکروپلیت واجد نمونه یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اگر ویروس خنثی نشده‌ای موجود باشد جذب سلول‌ها شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و دوباره به گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. نتایج آثار تخریب سلولی ناشی از تکثیر ویروس (Cytopathic effect: CPE) بعد از ۲۴ ساعت بررسی و ثبت شد. عیار آنتی‌بادی موجود در نمونه‌های سرمی برابر با بالاترین رقت سرمی است که بتواند مانع از فعالیت ویروس در کشت سلول و بروز CPE شود محاسبه شد [۳].

سپس آزمون VNT به عنوان استاندارد طلایی برای طراحی ELISA مورد استفاده قرار گرفت که به روش غیررقابتی و غیرمستقیم با ویروس کامل راه‌اندازی شد. برای استاندارد کردن این آزمون از روش چکر بورد (Cheker Bord) به ترتیب زیر استفاده شد:

۱- در ابتدا رقت‌های حاوی ۱ و ۵ و ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن [سوسپانسیون ویروس HSV-1

آنتی ژن باشند و برای هر رقت ۲ چاهک برای پرهیز از خطای احتمالی در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که برای کنترل نمودن نمونه‌های سرم مثبت و منفی ۲ میکروپلیت جداگانه حاوی آنتی ژن ویروسی تهیه و به‌طور جداگانه ارزیابی شد و پلیت‌ها به‌مدت یک و نیم ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛

۶- مرحله شستشو ۴ بار تکرار شد؛

۷- آنتی‌بادی کونژوگه با پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase: HRP) با رقت ۱/۱۵۰۰، ۱/۳۰۰۰، ۱/۴۰۰۰ طوری به چاهک‌ها افزوده شد که هر رقتی از آنتی ژن و سرم در مقابل با هر سه رقت از رقت‌های آنتی‌بادی ثانویه قرار گیرد و به‌مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛

۸- مرحله شستشو ۶ بار انجام گرفت تا آنتی‌بادی کونژوگه اضافی کاملاً شستشو شود؛

۹- به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا- کروموزن (Chromoden)، تترا متیل بنزیدین (Tetramethylbenzidine: TMB) اضافه شد و به‌مدت ۱۰- ۱۲ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور نگهداری شد؛

۱۰- در این مرحله با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار واکنش رنگزایی متوقف شد؛

۱۱- نتایج توسط دستگاه قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت شد؛

در تمامی آزمایش‌های فوق و در هر سری آزمایش ELISA، کنترل‌های مثبت و منفی آنتی ژن، کنترل‌های مثبت و منفی سرم بیمار و همچنین کنترل آنتی‌بادی کونژوگه وجود داشت.

بالاترین رقت آنتی ژن که بیشترین اختلاف را در جذب نمونه‌های پلاسما مثبت و منفی در مقایسه با کنترل منفی آنتی ژن داشتند به‌عنوان مناسب‌ترین رقت ویروس و آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه محسوب شد. برای تعیین رقت آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه و نیز غلظت آنتی ژن آزمایش با سرم‌های استاندارد تعیین عیار شده انجام گرفت و بنابراین رقت ۱/۵۰۰ از آنتی‌بادی اولیه (سرم افراد تحت آزمایش) و رقت ۱/۴۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti human IgG conjugated with HRP) و

تعیین غلظت شده با برادفورد (Bradford)؛ با بافر ELISA (بافر ۱۰ میلی‌مولار فسفات سالیین با pH= ۷-۶/۸) تهیه شد. به همین ترتیب رقت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۵۰۰ از پلاسما افراد نیز در بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی (برای تهیه این بافر به بافر ELISA ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاوی BSA (Bovine Serum Albumin) اضافه شد. این بافر برای رقیق کردن آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به‌کار می‌رود) تهیه شد. سپس از هر رقت آنتی ژن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در ۲ چاهک میکروپلیت مخصوص ELISA (NUNC) ریخته شد و میکروپلیت به‌مدت ۱۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این عمل برای اتصال (Coating) آنتی ژن به کف چاهک میکروپلیت صورت گرفت. در این مرحله به ازای هر چاهک واجد آنتی ژن ویروسی یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی آنتی ژن در نظر گرفته شد که در آن محیط کشت جمع‌آوری شده از روی سلول‌های BK غیرآلوده به ویروس ریخته شد؛

۲- پس از گرماگذاری ذکر شده میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج شده و تمامی چاهک‌ها در شرایط یکسان توسط بافر شستشو (بافر ELISA فاقد NaCl که دارای توئین ۲۰ به مقدار ۱۲۵ میکرولیتر در هر لیتر است) ۴ بار مورد شستشو قرار گرفتند؛

۳- در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر از محلول مسدود کننده (به میزان ۱ گرم BSA در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر ELISA حل شد) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به‌مدت یک ساعت میکروپلیت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این مرحله بدین منظور انجام شد که نقاطی از کف چاهک‌ها، که هیچ‌گونه آنتی ژن ندارند، توسط ماده موجود در محلول مسدود کننده (BSA) پوشیده شوند تا در مراحل بعد بروز واکنش‌های غیراختصاصی به حداقل میزان خود برسد؛

۴- میکروپلیت از گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد خارج و ۴ بار شستشو داده شد؛

۵- رقت‌های پلاسما مثبت و منفی تهیه شده به نحوی به چاهک‌ها اضافه شدند که تمام رقت‌های تهیه شده از سرم مثبت یا منفی در معرض تماس با تمام رقت‌های تهیه شده از

دور از نور نگهداری شد؛

۱۰- برای متوقف کردن واکنش رنگ زایی، ۵۰ میکرولیتر

اسیدسولفوریک ۲ مولار به چاهکها افزوده شد؛

۱۱- نتایج توسط دستگاه قرائت گر ELISA در طول موج

۴۹۲ نانومتر قرائت شد.

نتایج ELISA با تعیین سطح حداقل (Cut off) محاسبه

شد. برای این منظور ۲۰ نمونه پلاسماهایی که با VNT و کیت

ELISA تجاری نتایج منفی داشتند توسط ELISA طراحی

شده آزمایش شدند و میانگین جذب نوری آنها برابر با ۰/۴

شد که به عنوان سطح حداقل در نظر گرفته شد [۶-۸].

۳- نتایج

در آزمایش VNT نمونه‌هایی که عیار آنتی‌بادی کمتر از

۱/۸ شد به عنوان منفی در نظر گرفته شدند در نتیجه ۹۸ نمونه

غیرایمن (منفی) و ۴۰۴ نمونه ایمن (مثبت) تشخیص داده شد

(جدول ۱).

جدول ۱ فراوانی عیار آنتی‌بادی در نمونه‌های پلاسما تحت آزمایش VNT

عیار VNT	فراوانی	درصد فراوانی
< ۱/۸	۹۸	۱۹/۵۲
۱/۸	۴۸	۹/۵۶
۱/۱۶	۵۸	۱۱/۵۵
۱/۳۲	۱۰۴	۲۰/۷۲
۱/۶۴	۱۰۵	۲۰/۹۲
۱/۱۲۸	۶۶	۱۳/۱۵
۱/۲۵۶	۱۸	۳/۵۸
۱/۵۱۲	۵	۰/۹۹
مجموع	۵۰۲	۱۰۰ درصد

آزمون ELISA طراحی شده نیز روی تمام نمونه‌ها انجام شد

و نتایج به این ترتیب به دست آمد که: ۹۲ نمونه (۱۸/۳۳) درصد از

کل نمونه‌ها) غیرایمن و ۴۱۰ نمونه (۸۱/۶۷) درصد از کل نمونه‌ها)

ایمن تشخیص داده شدند. تمام نمونه‌های غیرایمن با ELISA با

VNT هم غیرایمن تشخیص داده شدند (جدول ۲).

۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن (سوسپانسیون ویروس که

با روش برادفورد تعیین غلظت شده بود) به منظور انجام

آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. در این روش، ابتدا آنتی‌ژن مورد

نظر به فاز جامد (پلیت ۹۶ خانه‌ای NUNC) متصل شد و پس

از افزودن آنتی‌بادی اولیه و انجام مراحل شستشو، آنتی‌بادی

ثانویه اضافه و در نهایت با افزودن سوبسترای کروموژن TMB،

میزان تغییر رنگ که در نتیجه فعالیت آنزیم متصل به آنتی‌بادی

ثانویه است، توسط دستگاه قرائت گر ELISA در طول موج

۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد که در واقع میزان فعالیت آنزیم

به‌طور غیرمستقیم میزان آنتی‌بادی را معین می‌کند.

سپس آزمون ELISA به ترتیب زیر انجام شد:

۱- به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ELISA، ۱۰۰

میکرولیتر از رقت آنتی‌ژن که حاوی ۱۰ میکروگرم از آنتی‌ژن

ویروسی است، اضافه شد و در مقابل هر چاهک از آنتی‌ژن یک

چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل منفی آنتی‌ژن با همان

غلظت پروتئینی افزوده شد و به مدت ۱۴ ساعت در گرمخانه

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛

۲- مرحله شستشو ۴ بار انجام گرفت؛

۳- ۱۵۰ میکرولیتر از محلول مسدود کننده به تمامی

چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷

درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛

۴- مرحله شستشو تکرار شد؛

۵- رقت ۱/۵۰۰ از نمونه‌های پلاسما با بافر رقیق‌کننده

آنتی‌بادی تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌های

حاوی آنتی‌ژن و کنترل منفی آنتی‌ژن، افزوده شد.

میکروپلیت به مدت یک و نیم ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه

سانتی‌گراد قرار گرفت؛

۶- مرحله شستشو تکرار شد؛

۷- رقت ۱/۴۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر

از آن به تمامی چاهک‌ها افزوده شد؛

۸- شستشو ۶ بار انجام گرفت؛

۹- در این مرحله به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از

سوبسترا- کروموژن (TMB) اضافه و به مدت ۱۰-۱۲ دقیقه

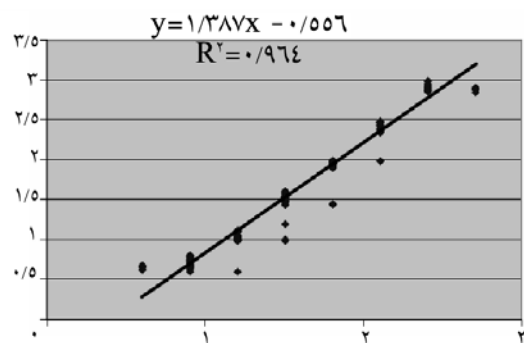
جدول ۲ اعتبار آزمون ELISA

	VNT منفی	VNT مثبت	نتایج VNT
نتایج ELISA مثبت	۲۷	۳۸۳	۴۱۰
نتایج ELISA منفی	۷۱	۲۱	۹۲
کل	۹۸	۴۰۴	۵۰۲

بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه این دو آزمون، حساسیت آزمون ELISA برابر ۰/۹۴ و ویژگی آن برابر ۰/۷۲ محاسبه شد.

با به کارگیری نرم افزار آماری Excel و با توجه به اطلاعات به دست آمده از نمونه های پلاسمای مربوط، توسط ELISA طراحی شده و آزمایش VNT معادله خط رگرسیون (Regression) پس از رسم Scatter Plot (شکل ۱) به دست آمد که عبارت است از:

$y = 1/3873x - 0/556$ (لگاریتم ارزش خشتی سازی) $(ELISA) = 1/3873$ جذب نوری همچنین میزان ضریب پیرسون (Pearson) برای متغیرهای فوق ۰/۹۶ تعیین شد که نشان دهنده ارتباط معنی دار و بسیار نزدیک بین متغیرهای مورد بررسی است.



شکل ۱ Scatter Plot مربوط به ELISA طراحی شده و VNT

۴- بحث

HSV از جمله شایع ترین و مسری ترین ویروس های بیماری زا در انسان است. بسیاری از عفونت های ایجاد شده بدون علامت بوده و از راه دهان، دستگاه تنفس، تماس مستقیم شخص به شخص، بزاق، تماس جنسی و در زمان عبور نوزاد از کانال زایمان در زنانی که به نوع یک و دو ویروس در

دستگاه تناسلی مبتلا هستند، انتقال می یابد [۲]. عفونت اولیه معمولاً به صورت تاول های مجتمع و دسته ای روی پوست یا غشاهای مخاطی ظاهر می شود که به شکل التهاب دهان، التهاب لثه ها و التهاب حلق نیز مشاهده می شود. این ویروس ها در نوزادان و افراد دارای نقص در سیستم ایمنی می تواند باعث آلودگی کبد، غدد آدرنال، چشم ها و به دنبال آن کوری شود. همچنین با هجوم به سیستم اعصاب مرکزی و مغز باعث بروز آسفالیت، مننژیت و مرگ می شود [۳، ۱، ۹].

در کشور ما هم با توجه به اطلاعات کتابخانه ای و مراجعه به منابع، مطالعات مشابه کم و اغلب در جمعیت های محدود یا برای راه اندازی آزمون انجام گرفته است [۱۰، ۸]. در مطالعه ای که در سال های اخیر در ژاپن انجام شده است نشان داده شده که شیوع HSV-1 و HSV-2 در مراجعه کنندگان به کلینیک در سنین ۱۶- ۴۰ سال ۶۳ درصد بوده است [۱۱].

در مطالعه دیگر با دو روش ELISA و VNT در کودکان عیار آنتی بادی به ترتیب ۶۲/۶ درصد و ۵۷/۳ درصد با ELISA و VNT نشان داده شده است [۱۲]. در مطالعه ای در سال ۲۰۰۵ میلادی در هند، شیوع HSV-1 و HSV-2 در مراجعه کنندگان به کلینیک در سنین ۱- ۱۴ سال به ترتیب ۸۵/۲ و ۷۷/۳ درصد گزارش شده است [۱۱].

با توجه به اهمیت عفونت های هرپس تشخیص به موقع در افراد حساس و اقدام برای درمان و سازماندهی بیماران بسیار ضروری است. در این مطالعه با طراحی آزمون ELISA خانگی ضمن تعیین عیار ویروس حساسیت و ویژگی آزمون محاسبه شد.

برای به دست آوردن یک ارتباط منطقی ملین جواب های به دست آمده از کیت ELISA به کار رفته در پژوهش حاضر با نتایج حاصل از آزمایش VNT، با استفاده از علم آمار حیاتی و نرم افزاری آماری Excel معیارهایی نظیر میزان همبستگی بین کیت مذکور و آزمایش VNT ارزیابی و این طور تعیین شد که لگاریتم بر مبنای ۱۰ عیار به دست آمده برای هر نمونه پلاسمای می تواند رابطه منطقی تری با جذب نوری قرائت شده نمونه مذکور، توسط کیت ELISA داشته باشد. به همین منظور میزان (R-Square) ضریب پیرسون بین جذب های نوری قرائت شده توسط کیت ELISA و نتایج حاصل

نیاز به تهیه سرم و مواد در شرایط استریل، روش ELISA به عنوان روش جایگزین VNT برای نشان دادن آنتی بادی ضد HSV در نمونه های سرم به ویژه در مطالعات اپیدمیولوژیکی و میدانی باشد و می تواند برای غربالگری به کار رود.

از آزمایش VNT محاسبه شد. به طور کلی چنانچه میزان ضریب پیرسون محاسبه شده بین دو متغیر یک یا نزدیک به یک باشد نشان دهنده ارتباط کامل و معنی دار بین دو متغیر مورد بررسی است. چنانچه این میزان (۱-) باشد نشان دهنده ارتباط معکوس بین دو متغیر است و چنانچه این ضریب صفر محاسبه شود نشان دهنده عدم ارتباط بین متغیرهای مورد آزمایش است.

حال با توجه به این که ضریب پیرسون محاسبه شده در این پژوهش ۰/۹۶ است، بنابراین ارتباط بین متغیرهای مورد بررسی فوق، معنی دار و نزدیک است. با توجه به این نتایج و سادگی و سرعت انجام کار و عدم

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از انجام پژوهش و سازمان انتقال خون برای تأمین نمونه های پلاسمایی صمیمانه تشکر می نمایند.

۶- منابع

- [1] Nesburn AB, Ghiasi H, Wechsler SL. Ocular safety and efficacy of an HSV-1 gD vaccine during primary and latent infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(8): 1497-502.
- [2] Cleator G, Klapper P, Herpes simplex, In: *Principles and practice of clinical virology*. WILY 2000; p: 23-45.
- [3] Roizman B and Knipe G, *Herpes simplex viruses*. Vol. 2, Lippicott Williams & Wilkins: *Fields virology*, 2007; p: 2501-603.
- [4] Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. *Herpes simplex viruses*. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3): 541-53.
- [5] Osorio Y, Ghiasi H. Recombinant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) codelivering interleukin-12p35 as a molecular adjuvant enhances the protective immune response against ocular HSV-1 challenge. *J Virol* 2005; 79(6): 3297-308.
- [6] Arama V, Vladareanu R, Mihailescu R, Streinu Cercel A, Mihai C, Hristea A, Iosipenco M, Arama SS, Rabilloud M. Seroprevalence and risk factors associated with herpes simplex virus infection among pregnant women. *J Perinat Med* 2008; 36(3): 206-12.
- [7] Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. *J Clin Virol* 2002; 25(suppl 1): S45-51.
- [8] Zandi K, Roostae MH, Sadeghizadeh M, Rasae MJ, Sajedi RH, Soleimanjahi H. Production of recombinant gG-1 protein of herpes simplex virus type 1 in a prokaryotic system in order to develop a type-specific enzyme-linked immunosorbent assay kit. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(3): 319-23.
- [9] Naito K, Hashimoto T, Ikeda S. Herpes simplex virus type-1 meningoencephalitis showing disseminated cortical lesions. *Intern Med* 2007; 46(11): 761-3.
- [10] Ziyaeyan M, Japoni A, Roostae MH, Salehi S, Soleimanjahi H. A serological survey of Herpes Simplex Virus type 1 and 2 immunity in pregnant women at labor stage in Tehran, Iran. *Pak J Biol Sci* 2007; 10(1): 148-51.
- [11] Kaur R, Gupta N, Baveja UK. Seroprevalence

- of HSV1 and HSV2 infections in family planning clinic attenders. *J Commun Dis* 2005; 37(4): 307-9.
- [12] Artiran Igde F, Igde M, Yazici Z, Okur Gumusova S, Birinci A, Sancak R, Ozturk F. Distribution of HSV-1 IgG antibodies by two methods comparing in Turkish atopic children. *New Microbiol* 2007; 30(2): 109-12.