

Detection of Human Herpes Virus Type 6 and Varicella Zoster Virus in the Urine of Patients with Multiple Sclerosis in Kerman Province, Iran

Kimia Esmaili, Kumarss Amini*

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Article Info:

Received: 6 Jan 2017

Revised: 13 Jan 2017

Accepted: 3 Jul 2017

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the CNS in which autoimmunity to myelin plays a role in pathogenesis. Infection with common viruses, particularly varicella zoster virus (VZV) and Human herpesvirus 6 (HHV-6) are postulated to contribute to the pathobiology of MS. The aim of this study was to detect of HHV-6 and VZV in the urine samples of patients with MS in the Kerman province, Iran.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, a total of 60 non-repetitive urine samples from patients with MS and 60 urine samples from healthy people without any neurological disease and urinary tract infection were collected. The infection with HHV- 6 and VZV were investigated using multiplex PCR method. **Results:** Of the 60 urine samples obtained from MS patients, 23 (13.8%) and 7 (4.2%) were positive for HHV-6 and VZV, respectively. VZV and HHV-6 were not detected simultaneously in any of obtained samples. HHV-6 and VZV were not found in any samples obtained from healthy people. **Conclusion:** The prevalence of HHV-6 and VZV viruses in MS patients is high, which may suggest an association between MS and the presence of these viruses in this region.

Key words:

1. Multiple Sclerosis
2. Herpesvirus 6, Human
3. Multiplex Polymerase Chain Reaction
4. Autoimmunity

*Corresponding Author: Kumarss Amini

E-mail: dr_kumarss_amini@yahoo.com

شناسایی هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ویروس واریسلا-زوستر در ادرار بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروز در استان کرمان، ایران

کیمیا اسماعیلی، کیومرث امینی*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۲ تیر ۱۳۹۶

اصلاحیه: ۲۳ خرداد ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۷ دی ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: مالتیپل اسکلروز بیماری دمیلینه کننده سیستم عصبی مرکزی است که خودایمنی عليه میلین در بیماریزایی آن نقش دارد. عفونت با ویروس‌های شایع خصوصاً ویروس واریسلا-زوستر و ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ در پاتوبیولوژی مالتیپل اسکلروز تأیید شده است. هدف از این مطالعه شناسایی ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ویروس واریسلا-زوستر در نمونه ادرار بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروز در استان کرمان، ایران بود. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-مقطعي تعداد ۶۰ نمونه ادرار غیرتکراری از بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروز و ۶۰ نمونه ادرار از افراد سالم فاقد هرگونه بیماری نورولوژیک و عفونت دستگاه ادراری جمع‌آوری گردید. آلدگی به ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ویروس واریسلا-زوستر با روش PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** از تعداد ۶۰ نمونه ادرار به دست آمده از بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروز، تعداد ۲۳ (۱۳/۸ درصد) و ۷ (۴/۲ درصد) به ترتیب برای ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ویروس واریسلا-زوستر مشتبث بودند. ویروس واریسلا-زوستر و ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ به طور همزمان در هیچ یک از نمونه‌های به دست آمده شناسایی نشدند. ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ویروس واریسلا-زوستر در هیچ یک از نمونه‌های به دست آمده از افراد سالم یافت نشدند. **نتیجه‌گیری:** فراوانی ویروس هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ویروس واریسلا-زوستر در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروز بالا است که ممکن است ارتباط بین مالتیپل اسکلروز و حضور این ویروس‌ها در این ناحیه را نشان دهد.

کلید واژه‌ها:

۱. مالتیپل اسکلروز
۲. ویروس هرپس انسانی تیپ ۶
۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه
۴. خودایمنی

* نویسنده مسئول: کیومرث امینی

آدرس الکترونیکی: dr_kumarss_amini@yahoo.com

مقدمه

این ویروس در سرم افراد مبتلا به MS^۱ و ۳-ایجاد عفونت نهفته و پایدار در سیستم اعصاب مرکزی که حالت نهفتگی آن‌ها بر اثر عواملی همچون استرس و دیگر عوامل عفونی به صورت باز را در می‌آید (۱۱). واریسلا-زوستر ویروس (VZV)^۲ به عنوان یک عضو از خانواده آلفا هرپس ویروس‌ها می‌باشد که بیماری‌های متفاوتی را ایجاد می‌کند. این ویروس توانایی ایجاد عفونت‌های نهفته^۳ همراه با رشد سریع و دوباره فعال شدن^۴ در سلول‌های عصبی را دارد می‌باشد (۱۲). این ویروس عامل ایجاد آبله مرغان مسری در میان کودکان است و فعال شدن مجدد آن در بزرگسالان زونا نام دارد. همچنین این ویروس عامل عفونت‌های تنفسی و عصبی در میان افراد با نقص سیستم ایمنی نیز می‌شود (۱۳). Khaki و همکاران نشان دادند که افزایش بروز این گونه بیماری‌های تنفسی و همچنین بالا رفتن تیتر آنتی‌بادی در این جمعیت خاص می‌تواند دلیلی بر دخالت ویروس‌های ذکر شده در پیدایش MS باشد (۹). لذا هدف از مطالعه پیش رو شناسایی-۶ VZV در نمونه ادرار بیماران مبتلا به MS با استفاده از روش Multiplex PCR^۵ در استان کرمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی^{۱۱} که در یک بازه زمانی ۱۰ ماهه (ابتدا فور دین لغایت انتهای اردیبهشت سال ۱۳۹۵) در استان کرمان انجام گردید، تعداد ۶۰ نمونه ادرار غیرتکراری به صورت تصادفی ساده^{۱۲} از بیماران مبتلا به MS جمع‌آوری شد و ۶۰ نمونه ادرار از افراد سالم جمع‌آوری شد. تمامی افراد سالم وارد شده به این مطالعه فاقد هرگونه عفونت ادراری و یا بیماری‌های نورولوژیک بوده و در یک ماه اخیر هیچ نوع آنتی‌بیوتیکی کسب نکرده بودند. بنابراین پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از تمامی افراد (بیمار و غیر بیمار)، نمونه‌ها در ظروف استریل درب پیچ دار مخصوص جمع‌آوری ادرار جمع‌آوری گردیدند. لازم به ذکر است که تشخیص بیماری MS با کمک پرژک متخصص مغز و اعصاب و تائید تست MRI انجام شد و تمام بیماران در این مطالعه در مرحله عود بیماری مالتیپل اسکلروز (MSRR)^{۱۳} بودند. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در ۲۰°C- به مدت حداقل ۲۴ ساعت نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه

به منظور تکثیر ژن‌های هدف، ابتدا DNA ژنومی QIAamp MinElute Virus سویه‌ها با استفاده از کیت

بیماری اسکلروز چندگانه (MS)^۱ یک بیماری خود ایمن است که با دمیلینه شدن و التهاب سیستم مرکزی همراه است. این بیماری سبب ایجاد اختلالات حسی، ضعف، گرفتگی عضلانی، اختلال بینایی، اختلال شناختی، خستگی، لرزش اندام‌ها، تاری دید، اختلال گفتاری در فرد بروز می‌کند (۱). بر اساس آمار، روند این بیماری تزايدی بوده و لذا پایش آن از نظر اتیولوژی می‌تواند نقطه عطفی در کنترل بیماری باشد. اتیولوژی بیماری مشخص نیست ولی فاكتورهای زنگینی و محیطی در مستعد کردن افراد به بیماری نقش دارند (۲). عامل ویروسی و باکتریایی زیادی به عنوان عامل مسبب MS پیشنهاد شده‌اند، اما تاکنون هیچ عامل قطعی برای این بیماری مشخص نشده است. بیماری MS بر اساس سیر بیماری و بروز علایم به انواع عودکننده-بهبود یابنده (RRMS)^۲، پیشرونده اولیه (PPMS)^۳، پیشرونده ثانیویه (SP)^۴ و پیشرونده-عودکننده (PRMS)^۵ تقسیم می‌گردد (۳). با توجه به اینکه در مراحل اولیه بیماری MS دوره‌های عود و بهبودی دیده می‌شود، از سویی عفونت شدن دوره بیماری یک ویژگی برجسته هرپس ویروس‌ها است (۴). این موضوع می‌تواند توجیه کننده نقش احتمالی این ویروس‌ها در بیماری‌زایی MS باشد. با این وجود ویروس‌هایی که بتوانند عفونت پایدار یا نهفته در سیستم عصبی مرکزی یا سیستم ایمنی ایجاد کنند، می‌توانند به عنوان عامل احتمالی در ایجاد یک اختلال عصبی مزمن مانند بیماری MS مطرح شوند (۲، ۴).

Hon و Fujinami و همکاران (۵)، Taherkhani و همکاران (۶) و Hon و همکاران (۷) در مطالعات خود نشان دادند که عفونت اولیه EBV با تخریب میلین عصب همراه است، بنابراین ویروس EBV که عضوی از خانواده هرپس ویریده می‌باشد می‌تواند به عنوان عامل سببی MS پیشنهاد شود. برخی گزارشات نشان می‌دهد که بین سایر اعضای خانواده هرپس ویریده و ایجاد MS ارتباط وجود دارد (۸). Khaki و همکاران ارتباط بین عفونت حاد هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ و ایجاد مالتیپل اسکلروز را نشان دادند (۹). هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ (HHV-6)^۶ برای اولین بار در سال ۱۹۱۶ از بیمارانی که به ایدز و شبه لنفوکوما مبتلا بودند و داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی دریافت می‌کردند جداسازی شد (۱۰). دلایل اصلی ارتباط ویروس HHV-6 با MS عبارتند از: ۱- MS می‌تواند انواع مختلفی از سلول‌ها در سیستم اعصاب مرکزی اعم از لنفوسيت‌ها و سلول‌های گلیال را آلوده سازد ۲- حضور بالای تیتر

⁸ Latent infection⁹ Reactivation¹⁰ Multiplex-polymerase chain reaction¹¹ Cross-sectional study¹² Simple random sampling¹³ Relapsing/remitting MS¹ Multiple sclerosis² Relapsing remitting MS³ Primary progressive MS⁴ Secondary progressive MS⁵ Progressive relapsing MS⁶ Human herpesvirus 6⁷ Varicella zoster virus

تحقیق

در هیچکدام از نمونه‌ها هر دو ویروس به طور همزمان شناسایی نشدند. تمامی نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده از افراد سالم فاقد ویروس‌های VZV و HHV-6 بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

دانشمندان معتقدند که برای بروز بیماری MS حداقل یک یا چند عامل محیطی لازم می‌باشد. شواهد موجود نشان می‌دهد که یکی از این عوامل محیطی، بعضی از انواع ویروس‌ها می‌باشد. ویروس‌هایی که بتوانند عفونت پایدار یا نهفته در سیستم عصبی مرکزی یا سیستم ایمنی ایجاد کنند، می‌توانند به عنوان عامل احتمالی در ایجاد یک اختلال عصبی مزمن مانند بیماری MS مطرح شوند (۴). برخی مطالعات نشان داده‌اند که ویروس‌های بسیاری از جمله EBV عامل بیماری مونونوکلوز، VZV، HHV-6 و واکسن هپاتیت ممکن است علت بروز MS باشند (۶). در مطالعه‌پیش رو، از مجموع ۶۰ نمونه ادرار جمع‌آوری شده از افراد مبتلا به MS مورد بررسی تعداد ۲۳ نمونه برای حضور ژنوم ویروس HHV-6 مثبت بود. همچنین تمامی نمونه‌های کسب شده از افراد سالم فاقد هر دو نوع ویروس HHV-6 و VZV بودند. این نتایج با مطالعه Khaki و VZV همکاران (۹) مغایرت دارد و علت آن می‌تواند در نوع روش به کار برده شده (PCR) در مقایسه با روش الیزا و ایمونوفلورسانس باشد. Khaki و همکاران نشان دادند که از ۳۱ بیمار مورد مطالعه تعداد ۷۴/۲ درصد دارای آنتی‌بادی M ضد ویروس هرپس انسانی تیپ-۶ بودند (۹). Soldan و همکاران اظهار داشته‌اند که حضور علیه این ویروس، با خطر عود عوارض M آنتی‌بادی مالتیپل اسکلروز همراه است (۱۵). به صورت قابل توجهی نتایج مطالعه حاضر با نتایج مولکولی Soldan و همکاران (۱۵) همخوانی دارد. این محققین اظهار کردند که در ۳۰ درصد

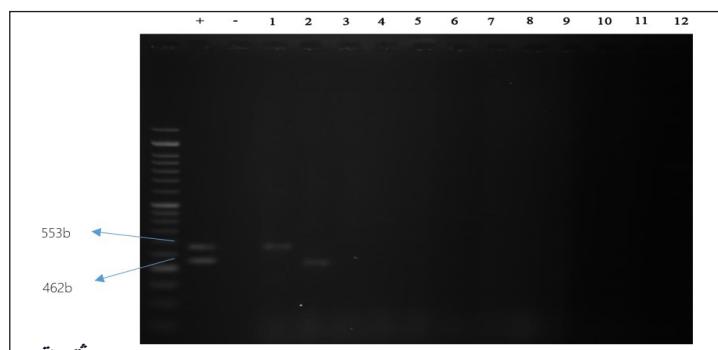
Spin Kit (کیاژن، ایران) استخراج گردید. جهت تأیید درجهٔ خلوص شده از دستگاه بیوفوتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده شد. توالی الیگونوکلئوتیدی از پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۴). پس از BLAST (۱۴)، میکروولیتر از مولکول PCR شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix ۵X (سیناکلون، ایران) حاوی (۰/۰۵ U/µl)، (۰/۴ mM) MgCl₂ (۳mM)، Taq DNA polymerase dNTPs ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گریدیانت ترموسایکلر (پندرورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول و اسرشت ثانویه ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۶ درجهٔ برای ۳۰ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) الکتروفسورز گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۶۰ نمونه ادرار از ۳۷ بیمار زن و ۲۳ بیمار مرد مبتلا به مالتیپل اسکلروز که بیماری آن‌ها توسط پزشک متخصص مغز و اعصاب تأیید شده بود، جمع‌آوری گردید. میانگین سنی کل بیماران $49 \pm 1/34$ سال بود. میانگین سنی بیماران مرد $44 \pm 1/23$ و زن $41 \pm 1/93$ سال بود. دامنهٔ رنج سنی بیماران $14-62$ سال بود. از این تعداد ۲۳ نمونه (۳/۸ درصد) برای HHH-6 و ۷ نمونه (۴/۲ درصد) برای VZV مثبت بودند.

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی استفاده شده در این تحقیق.

منبع	اندازه	پرایمرها	میکروارگانیسم
(۱۴)	۴۶۲	Forward: 5'-AAGCTTGCACAATGCCAAAAACAG-3' Reverse: 5'-CTCGAGTATGCCGAGACCCCTAAC-3'	Human herpesvirus type 6
(۱۴)	۵۵۳	Forward: 5'-ACGGTCTGCCGGAGCTGGT-3' Reverse: 5'-AATGCCGTGACCACCAAGTATAAT-3'	VZV



تصویر ۱- تصویر ژل الکتروفسورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی؛ کنترل منفی؛ نمونه ادرار اخذ شده از افراد سالم، کنترل مثبت؛ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروز. M: Marker 100bp

نمونه‌گیری از خون ۸۳ بیماران مبتلا به MS و ۱۰۰ فرد سالم از مناطق شمالی ایران جمع‌آوری شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که ۲۱ نفر (۲۵/۳ درصد) از بیماران VZV مبتلا به MS و ۹ نفر (۹ درصد) از گروه شاهد به Sunds trom و همکاران در سوئد هیچ‌گونه ارتباطی بین HSV و سرخک با MS وجود نداشت اما در بین افراد VZV آلووده هستند. برخلاف نتایج پیش رو، در مطالعه HSV-6، EBV و HHV-6، MS ارتباط معنی‌داری مشاهد شد (۲۲). عدم مغایرت نتایج این مطالعه با مطالعه پیش رو می‌تواند تفاوت در نوع نمونه (ادرار در مقایسه با خون و در نتیجه ریزش^{۱۴} ویروس از بدن) و فاصله جغرافیایی (شمال کشور در مقایسه با کرمان و در نتیجه شیوع و فراوانی عفونت‌های ویروسی در منطقه) می‌باشد.

نتایج نشان داد که فراوانی ویروس‌های خانواده هرپس ویریده از جمله ۶- HHV و VZV در افراد مبتلا به MS بالا است که این می‌تواند نشان‌دهنده یک ارتباط مستقیم در بروز MS و حضور این ویروس‌ها باشد. همچنین مثبت بودن VZV و HSV می‌تواند یک عامل خطر برای بروز بیماری MS باشد، لذا توصیه می‌گردد که تمامی افراد در معرض خطر برای بروز بیماری MS از نظر حضور ویروس‌های خانواده هرپس ویریده بهویژه VZV و HHV-6 مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدين وسیله نویسندها مقاله از زحمات اعضاء محترم گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

از بیماران واکنش PCR برای ژنوم 6-HHV مثبت است. در مطالعه Berti و همکاران نشان داده شد که تشخیص علایم در بیماری MS، همخوانی قابل توجهی با حضور DNA ویروس مذکور در خون بیماران دارد (۱۶). این نتیجه‌گیری در مطالعه Akhyani و همکاران (۱۷) نیز اعلام شده است. Pawate و همکاران در هند نشان دادند که عفونت با EBV و HHV-6 در پیشرفت بیماری MS نقش دارد (۱۸). در مطالعه Ben Fredj و همکارانش در تونس مشخص شد HSV-1، CMV و گروه بیماران MS در هر دو گروه بیماران MS و HHV-6، VZV و گروه کنترل منفی بوده است (۱۹). اما EBV و HHV-7 در هر دو گروه مثبت بوده‌اند که میزان آن‌ها در گروه بیماران MS بالاتر بوده و از این میان EBV و HHV-7 درصد بالاتری را به خود اختصاص داده‌اند. این محققین نتیجه گرفتند که فراوانی ویروس‌های EBV، VZV و HHV-6 به ترتیب برابر ۳۱/۳ درصد، ۳۳/۳ درصد، ۵/۸ درصد و ۷/۸ درصد بود. برخی از محققین از قبیل Enbom و همکاران (۲۰) نقش ویروس 6-HHV را در بروز MS تأیید نکردند. در تضاد با داده‌های پژوهش فعلی، Enbom و همکاران اظهار داشتند که احتمالاً این عفونت‌ها می‌تواند یک عامل زیر ساختی و محرك در ایجاد بیماری MS باشد و بهره‌گیری از آزمون‌های مکمل نظیر PCR را جهت ارزیابی حضور عفونت توصیه نمودند (۲۰). علت مغایرت نتایج در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در شرایط جغرافیایی و نوع بیماران از نظر طول مدت بیماری باشد. در مطالعه فعلی ۱۱/۶ درصد نمونه‌ها برای حضور VZV مثبت بودند که با مطالعه Najafi و همکاران (۲۱) همخوانی دارد. Najafi و همکاران (۲۱) در سال ۲۰۱۵ به تشخیص VZV در بیماران MS و مقایسه آن با گروه کنترل توسط PCR پرداختند.

منابع

- Paroni M, Maltese V, De Simone M, Ranzani V, Larghi P, Fenoglio C, et al. Recognition of viral and self-antigens by T H 1 and T H 1/T H 17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 140(3): 797-808.
 - Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur J Immunol*. 2016; 46(9): 2078-90.
 - Cheng Y, Sun L, Xie Z, Fan X, Cao Q, Han J, et al. Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. *J Neurosci Res*. 2017; 95(10): 1973-83.
 - Mentis A-FA, Dardiotis E, Grigoriadis N, Petinaki E, Hadjigeorgiou GM. Viruses and multiple sclerosis: from mechanisms and pathways to translational research
- opportunities. *Mol Neurobiol*. 2017; 5(54): 3911-23.
- Taherkhani R, Farshadpour F, Mirjalili A, Amirinejad R. Determination of the association between Epstein-Barr virus (EBV) infection and Multiple sclerosis (MS) disease. *Iranian South Medical Journal*. 2014; 17(4): 666-75.
 - Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1): 80-94.
 - Hon GM, Hassan MS, van Rensburg SJ, Erasmus RT, Matsha TE. Assessment of epstein-barr virus in blood from patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*. 2012; 27(3): 311-8.
 - Pormohammad A, Azimi T, Falah F, Faghiloo E. Relationship of human herpes virus 6 and multiple

^{۱۴} Sheding

sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol.* 2017. doi: 10.1002/jcp.26000.

9. Khaki M, Ghazaavi A, Ghasami K, Rafiei M, Payani M, Mosayebi G. Anti-human herpes virus-6 antibodies titer in patients with multiple sclerosis in Markazy Province. *Arak Medical University Journal.* 2009; 12(2): 45-50.

10. Levy JA. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet.* 1997; 349(9051): 558-63.

11. Ablashi D, Eastman H, Owen C, Roman M, Friedman J, Zabriskie J, et al. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J Clin Virol.* 2000; 16(3): 179-91.

12. Mehta SK, Nelman-Gonzalez M, Tyring SK, Tong Y, Beitman A, Crucian BE, et al. Localization of VZV in saliva of zoster patients. *J Med Virol.* 2017; 89(9): 1686-9.

13. Karampoor S, Zahednasab H, Ramagopalan S, Mehrpour M, Etemadifar M, Alsahebfosoul F, et al. Cytomegalovirus and varicella zoster virus seropositivity of Iranian patients with multiple sclerosis: a population-based study. *J Neuroimmunol.* 2017; 309: 4-6.

14. Gordon L, McQuaid S, Cosby S. Detection of herpes simplex virus (types 1 and 2) and human herpesvirus 6 DNA in human brain tissue by polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol.* 1996; 6(1): 33-40.

15. Soldan SS, Fogdell-Hahn A, Brennan MB, Mittelman BB, Ballerini C, Massacesi L, et al. Elevated serum and cerebrospinal fluid levels of soluble human herpesvirus type 6 cellular receptor, membrane cofactor protein in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001; 50(4): 486-93.

16. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during Multiple Sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol.* 2002; 8(3): 250-6.

17. Akhyani N, Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Eaton JM, McFarland HF, et al. Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis.* 2000; 182(5): 1321-5.

18. Pawate S, Sriram S. The role of infections in the pathogenesis and course of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol.* 2010; 13(2): 80-6.

19. Ben Fredj N, Rotola A, Nefzi F, Chebel S, Rizzo R, Caselli E, et al. Identification of human herpesviruses 1 to 8 in Tunisian multiple sclerosis patients and healthy blood donors. *J Neurovirol.* 2012; 18(1): 12-9.

20. Enbom M, Wang FZ, Fredrikson S, Martin C, Dahl H, Linde A. Similar humoral and cellular immunological reactivities to human herpesvirus 6 in patients with multiple sclerosis and controls. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(4): 545-9.

21. Najafi S, Ghane M, Yousefzadeh-Chabok S, Amiri M. The high prevalence of the varicella zoster virus in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a case-control study in the north of Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(3). doi: 10.5812/jjm. 34158.

22. Sundström P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenssonsson A, Nyström L, et al. An altered immune response to epstein-barr virus in multiple sclerosis a prospective study. *Neurology.* 2004; 62(12): 2277-82.