

Serologic Evaluation of Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis

Maryam Abdollahi¹,
Mohammadreza Haghshenas²,
Alireza Rafiei³,
Mahmoud Abedini⁴

¹ MSc Student in Virology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Molecular & Cell-Biology Research Center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant professor, Department of Neurology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 24, 2015 ; Accepted August 1, 2016)

Abstract

Background and purpose: Multiple Sclerosis (MS) is a disease of the central nervous system that is an auto-immune disease, where the immune system gets confused and attacks the nerve cells, damaging this protective layer of myelin sheath. The prevalence of MS is 52 per 100000 worldwide. The relation between Epstein-Barr virus (EBV) and MS is well understood but studies reported different results. This study aimed at determining any association between IgG and IgG and EBV in patients with MS and healthy controls.

Materials and methods: A case-control study was performed in which serum samples were collected from 45 MS patients (attending Sari Boali-Sina Hospital, Iran, 2014-2015) and 45 control samples. The blood samples were centrifuged and plasma was separated. All samples were tested for anti EBV antibodies using Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA).

Results: In this study, 100% of samples from patients with MS were IgG positive and 85% of control samples were IgG positive. We found that 13.3% of MS positive samples were IgM positive but all control samples were IgM negative.

Conclusion: According to our results the rate of positive IgM against EBV-CA in patients with MS was higher than that in normal individuals.

Keywords: multiple sclerosis, Epsteine_Barr Virus, autoimmune disease

ارزیابی سرولوژیک و ویروس اپشتین بار در بیماران مالتیپل اسکلروزیس

مریم عبدالمی^۱
 محمدرضا حق شناس^۲
 علیرضا رفیعی^۳
 محمود عابدینی^۴

چکیده

سابقه و هدف: مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی پیچیده سیستم عصبی مرکزی است که خود ایمنی علیه میلین در ایجاد این بیماری نقش دارد. میزان شیوع بیماری MS، از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر نزدیک به ۵۲ نفر گزارش شده است. وابستگی MS با عفونت اپشتین بار و ویروس (EBV) به خوبی مستند شده است ولی در مطالعات انجام شده نتایج متفاوتی گزارش شده است. هدف از این مطالعه تعیین شیوع آنتی بادی IgM و IgG علیه آنتی ژن کپسید EBV در سرم افراد مبتلا به MS و مقایسه آن در افراد سالم بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی که در مرکز آموزشی درمانی بوعلی سینا ساری طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ انجام شده است، میزان شیوع آنتی بادی IgM و IgG علیه EBV-CA توسط کیت الایزا در ۴۵ بیمار مبتلا به MS و ۴۵ نمونه فرد سالم از نظر بیماری MS به عنوان کنترل ارزیابی و با هم مقایسه گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه ۱۰۰ درصد نمونه‌های بیماران مبتلا به MS از نظر آنتی بادی IgG بر ضد آنتی ژن کپسید EBV مثبت بودند در حالی که ۸۵ درصد از نمونه‌های گروه کنترل از نظر آنتی بادی IgG بر ضد آنتی ژن کپسید EBV مثبت بوده‌اند. همچنین ۱۳/۳ درصد نمونه‌های بیماران مبتلا به MS از نظر IgM بر ضد آنتی ژن کپسید EBV مثبت بودند در حالی تمام نمونه‌های گروه کنترل از نظر IgM منفی بوده‌اند.

استنتاج: نتایج نشان داد که میزان IgM در نمونه‌های بیماران مبتلا به MS در مقایسه با نمونه‌های افراد غیر بیمار بر علیه پروتئین VCA ویروس EBV بیش تر می‌باشد.

واژه های کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، ویروس اپشتین بار، بیماری خود ایمنی

مقدمه

عملکرد سلول‌های عصبی فوق و سیستم عصبی می‌شود و در نهایت ممکن است. موجب زوال اعصاب گردد که یک روند غیر قابل برگشت است (۱). علائم بیماری بسته به محل فیبرهای خاص آسیب دیده و شدت آن متفاوت

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis (MS)) یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی است که در آن غلاف محافظتی میلین که اطراف سلول‌های عصبی را پوشش می‌دهد، تخریب می‌شود که این عمل سبب اختلال

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۴۶۸ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مؤلف مسئول: محمدرضا حق شناس؛ ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: haghshenas2001@yahoo.com

۱. دانشجوی ارشد میکروبی شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. دانشیار، گروه میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۴. استادیار، گروه اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۹/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۱۱

سلول B حفظ نماید. فعالیت مجدد ویروس بدون علامت شایع است که این مسئله می تواند منجر به انتقال ویروس به افراد سالم و آلودگی در آن ها گردد (۱۱). بررسی ها نشان می دهد که تیترا آنتی بادی ضد ویروس EBV در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم بالاتر می باشد (۱۲). هم چنین با اندازه گیری آنتی بادی IgG ضد EBV-CA و EBNA-1 در نمونه های خون جمع آوری شده با متوسط زمان ۴ سال قبل از شروع بیماری، مشخص شد که تیترا این آنتی بادی ها قبل از شروع بیماری بالا می باشد (۱۳). منونوکلئوز عفونی که در اثر این ویروس ایجاد می شود، با افزایش احتمال ابتلا به MS همراه است (۲). در این میان برخی مطالعات متناقض نیز در ایران وجود دارد که نشان می دهد تفاوتی در سطح آنتی بادی سرمی علیه EBV بین افراد مبتلا به MS و افراد سالم وجود ندارد (۱۴). همراه بودن بیماری MS و عفونت با ویروس اپشتین بار در بسیاری از مطالعات ثبت شده است (۱۶-۱۴). با این حال در ایران مطالعات متناقضی صورت گرفته است. برخی از مطالعات نشان داده اند که تیترا آنتی بادی علیه EBV در بیماران مبتلا به MS بالاتر از گروه کنترل است (۸) در حالی که گزارش انجام شده دیگری، تفاوتی نشان نمی دهد (۱۷).

با توجه به تغییرات اخیر در بروز MS در ایران، بررسی عوامل خطر زیست محیطی ممکن است باعث درک بهتر عوامل خطر اصلی شود. بنابراین هدف این مطالعه بررسی شیوع آنتی بادی های IgG و IgM ضد VCA و ویروس اپشتین بار در افراد مبتلا به MS و گروه کنترل بوده است.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد-شاهدی بود که در آن ۴۵ نفر از بیماران مبتلا به MS مراجعه کننده به بخش نورولوژی مرکز آموزش درمانی بوعلی ساری طی سال های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ که حاضر به همکاری شده اند و ۴۵ نفر افراد سالم که از نظر بیماری فاقد بیماری MS

می باشد و هم چنین وابسته به میزان صدمه و اعصاب خاصی که تحت تاثیر قرار گرفته است، می باشد (۲). علل بیماری MS و مکانیسم شکل گیری آن هنوز مشخص نشده است اما در مطالعات و بررسی های مختلف عوامل زیادی مانند واکنش های خود ایمن، فاکتورهای محیطی، عوامل عفونی، ژنتیکی، سابقه فامیلی و عوامل دیگری در ایجاد بیماری MS مطرح نموده اند اما تا کنون هیچ عامل قطعی برای این بیماری مشخص نشده است (۳-۵). میزان ابتلا به بیماری MS در دنیا حدود ۲۳۰۰۰۰۰ نفر تخمین زده می شود که شیوع آن ۳۳ در یک میلیون نفر برآورد شده است (۶) که میزان آن در زنان ۲ تا ۳ برابر مردان گزارش شده است (۷). میزان بیماری MS در ایران کاملاً مشخص نیست ولی احتمال وجود ۵۷ در یک صدهزار نفر را برآورد می کنند که میزان این شیوع طبق برآوردهای اخیر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر ۵۲ نفر در تهران و ۷۳ نفر در اصفهان بیان شده است (۸). با توجه به این که در مراحل اولیه بیماری MS در دوره های عود کننده و بهبود یابنده (Relapsing-Remining) دیده می شود (۷) و از طرفی فعال شدن دوره های بیماری یک ویژگی بارز هرپس ویروس ها می باشد لذا این موضوع می تواند نقش احتمالی آن ها را در ایجاد بیماری MS توجیه نماید (۹). ویروس اپشتین بار (EBV) دارای DNA دو رشته ای خطی بوده و جزء خانواده Herpesviridae و زیر خانواده Gamma Herpesvirinae است (۱۰) که در سال ۱۹۶۴ توسط Barr و Epstein شناسایی شد (۱۱). ویروس پس از ورود ابتدا سلول های ناحیه (Oropharynx) اوروفارنکس را آلوده می کند سپس سلول های B زیر مخاطی (sub-mucosal B cells) آلوده می شوند. سلول های B مزبور شروع به تکثیر کرده و آنتی بادی های مختلفی از جمله اتوآنتی بادی ها و آنتی بادی های هتروفیل را تولید می نمایند. همانند سایر هرپس ویروس ها، EBV نیز می تواند به صورت مخفی باقی بماند و DNA خود را به صورت Episom در

بوده‌اند، مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه بیماران، نمونه‌ها شامل ۳۹ زن و ۶ مرد و در گروه کنترل، شامل ۳۸ زن و ۷ مرد بوده‌اند. بیماران انتخابی به اختلالات خود ایمن دمیلینه شونده غیر از این بیماری مبتلا نبوده‌اند و گروه کنترل شامل افرادی بوده‌اند که عدم ابتلای آن‌ها به بیماری MS توسط متخصص مغز و اعصاب پس از معاینه بالینی و بر اساس پروتکل مکدونالد تأیید شد (۱۸). بیماران MS و افراد سالم از نظر بیماری MS از نظر سن، جنس، نژاد و عدم رابطه فامیلی نسبی، همسان سازی شدند. از افراد پس از صحبت کردن و آگاهی دادن و اطمینان دادن به این که اطلاعات به صورت محرمانه باقی می‌ماند و در صورت اخذ رضایت شفاهی از آن‌ها، ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر عمل خونگیری انجام شد و با استفاده از کول باکس و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشکده پزشکی منتقل شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ در دور 180g در دمای حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در هر دو گروه بیمار و کنترل آنتی‌بادی‌های سرمی IgM و IgG بر ضد VCA به روش تست الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. تمام نمونه‌های سرمی به منظور حضور آنتی‌بادی IgG و IgM علیه EBV-CA توسط کیت الایزا از شرکت EUROIMMUN و طبق پروتکل خاص ارزیابی و با هم مقایسه گردیدند. در تمامی تست‌های الایزا به همراه نمونه‌های بیمار و کنترل، از نمونه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شد. در پایان داده‌ها به صورت میانگین، درصد و نمودار گزارش شده‌اند و با استفاده از آزمون t-test و نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ آنالیز نمونه‌ها انجام گردید. $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر از مجموع ۹۰ نمونه بیمار و سالم از نظر علائم بالینی MS که به آزمایشگاه تشخیصی

گردید، ۴۵ نمونه مربوط به افرادی بوده که دارای علائم بیماری MS بوده و ۴۵ نمونه مربوط به افرادی بوده که فاقد بیماری MS بوده‌اند. در گروه بیماران، نمونه‌ها شامل ۳۹ زن و ۶ مرد با میانگین سنی $31/62 \pm 6/73$ سال و در گروه کنترل، شامل ۳۸ زن و ۷ مرد با میانگین سنی $29/85 \pm 5/20$ سال بود. ۱۰۰ درصد بیماران نمونه‌های مبتلا به MS از نظر آنتی‌بادی IgG بر ضد آنتی‌ژن کپسید EBV مثبت بودند در حالی که ۸۵ درصد از نمونه‌های گروه کنترل نسبت به همان آنتی‌بادی مثبت شدند. در این بررسی مشخص شده است که ۱۳/۳ درصد از نمونه‌های بیماران از نظر وجود آنتی‌بادی IgM بر ضد VCA و ویروس EBV مثبت بودند. در حالی که تمام اعضای گروه کنترل نسبت به این آنتی‌بادی منفی شدند. در گروه بیماران، ۴۱ بیمار (۹۱/۱ درصد) از دسته فروکش‌کننده، ۱ بیمار (۲/۲ درصد) از دسته پیش‌رونده اولیه و ۳ بیمار (۶/۷ درصد) از دسته پیش‌رونده ثانویه بودند که نتایج برحسب سیربیماری و نتیجه IgM در جدول شماره ۱ آمده است. نتایج این مطالعه نشان داده است که آنتی‌بادی‌های ضد VCA در افراد بیمار مبتلا به MS به طور معنی‌داری بیش‌تر از افراد سالم از نظر MS بوده‌اند ($p=0/01$).

جدول شماره ۱: نتایج تست الایزا (IgM) در بیماران مبتلا به MS بر حسب سیر بیماری

نتیجه سیربیماری	پیش‌رونده اولیه			پیش‌رونده ثانویه			فروکش‌کننده			کل
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		
IgM مثبت	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۶ (۱۳/۷)	۶ (۱۳/۷)	۶ (۱۳/۷)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۲ (۲۶)
IgM منفی	۱ (۲/۲)	۳ (۶/۷)	۳ (۶/۷)	۳۹ (۸۴/۷)	۳۵ (۷۸/۸)	۳۵ (۷۸/۸)	۴۵ (۱۰۰)	۴۱ (۹۱/۱)	۴۱ (۹۱/۱)	۱۳۹ (۳۰۴)
کل	۱ (۲/۲)	۳ (۶/۷)	۳ (۶/۷)	۴۵ (۱۰۰)	۴۱ (۹۱/۱)	۴۱ (۹۱/۱)	۴۵ (۱۰۰)	۴۱ (۹۱/۱)	۴۱ (۹۱/۱)	۱۳۹ (۳۰۴)

از آزمون تی مستقل دونمونه‌ای در حالت نابرابری واریانس‌ها برای مقایسه میانگین‌های IgM در دو گروه بیمار و کنترل استفاده شد که طبق آن میانگین‌های دو گروه اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($p=0/01$).

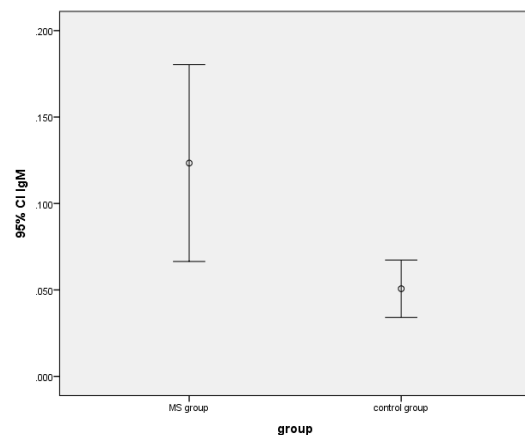
فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای میانگین IgM در دو گروه بیمار از نظر MS و گروه کنترل در آزمون الایزا نشان داد که به دلیل عدم هم‌پوشانی فواصل اطمینان،

بحث

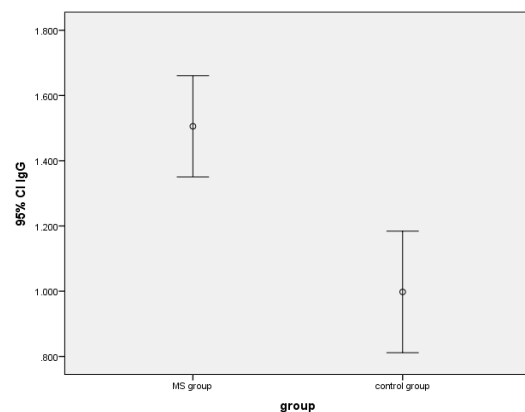
MS یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی است که عمدتاً ماده سفید را درگیر می‌کند و با تخریب میلین و ایجاد ساختاری به نام پلاک همراه است که مکانیسم شکل‌گیری MS و علل پدید آورنده آن موضوع پیچیده‌ای است (۱۹). مطالعات متعدد نشان می‌دهند که میزان آلودگی به ویروس EBV در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد غیر مبتلا به MS بالاتر می‌باشد. در مطالعه Mouhieddine و همکاران با عنوان عوامل خطر MS و ارتباط آن با آنتی‌بادی ضد EBV که در طی سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴ در آمریکا انجام گرفت، مشخص شد که جنس مونث و سن بالا دارای تیترا بالاتری از آنتی‌بادی علیه آنتی ژن VCA و جنس مذکر دارای تیترا بالاتر آنتی‌بادی علیه EBNA-1 در مقایسه با گروه کنترل می‌باشند (۱۲). در مطالعه کرمپور و همکاران با عنوان بررسی سرولوژیکی EBV در افراد مبتلا به MS که روی ۶۰ بیمار در تهران صورت گرفت، مشخص شد که ۸۲ درصد از افراد سالم و همه مبتلایان به MS از نظر آنتی‌بادی‌های EBV مثبت بوده‌اند (۲۰). در مطالعه خاکی و همکاران با هدف بررسی آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی در بیماران مبتلا به MS روی ۶۱ بیمار مبتلا به MS و ۶۰ نمونه سالم که طی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۰ در اراک جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفت، ۱۰۰ درصد نمونه‌های بیمار و کنترل از نظر آنتی‌بادی IgM ضد ویروس EBV منفی بودند (۱۷). در مطالعه حاضر میانگین میزان جذب نوری آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgM و IgG ضد VCA در آزمون الیزا در افراد مبتلا به MS به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود که بیان‌گر تیترا بالای آنتی‌بادی علیه EBV در بیماران MS نسبت به گروه کنترل می‌باشد. یافته‌های مطالعه حاضر هم راستا با گزارشات Mouhieddine و همکاران (۱۲)، Pfuhl و همکاران (۲۱) و کرم پور و همکاران (۲۰) مبنی بر مثبت بودن آنتی‌بادی‌های ضد EBV در بیماران مبتلا به MS و حضور عفونت در این افراد و خلاف یافته خاکی و

میانگین IgM در دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری باهم دارند (نمودار شماره ۱). در بررسی به عمل آمده و با استفاده از آزمون تی مستقل دو نمونه‌ای در حالت برابری واریانس‌ها برای مقایسه میانگین‌های IgG و نتایج تست الیزای IgG در دو گروه بیماران مبتلا به MS و کنترل، میانگین‌های IgG در دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($p=0/00$).

فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای میانگین IgG در دو گروه بیمار از نظر MS و گروه کنترل در آزمون الیزا نشان داد که به دلیل عدم هم‌پوشانی فواصل اطمینان‌ها، میانگین IgG در دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری باهم دارند (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان IgM در نمونه‌های بیماران مبتلا به MS و گروه کنترل



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین IgG در نمونه‌های بیماران مبتلا به MS و گروه کنترل

EBV بایستی از بروز MS جلوگیری کند (۲۵،۲۴). در مطالعه حاضر میزان تیتراژ آنتی بادی در آزمون الیزا در بیماران MS بالاتر از افراد گروه کنترل بود که بیانگر تیتراژ بالای آنتی بادی علیه EBV در بیماران MS نسبت به گروه کنترل می باشد. در نتیجه می توان پیشنهاد نمود که وجود تیتراژ بالای آنتی بادی علیه EBV و هم چنین شیوع بالای آن در بیماران MS احتمالاً بیانگر ارتباط ویروس EBV و بیماری MS می باشد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبی شناسی خانم مریم عبدلهی و با شماره طرح (۱۴۶۸) بوده است. از همکاری همه بیماران MS و غیر بیمار MS که در اهداء نمونه کمک کردن و هم چنین از همکاران بخش نورولوژی سرکارخانم دکتر کریمی، آقای دکتر چراغ مکانی و سایر همکاران به خاطر انتخاب بیمار و عمل نمونه گیری و رئیس محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و معاونت محترم تحقیقات و فن آوری به خاطر حمایت مالی تقدیر و تشکر به عمل می آید.

همکاران (۱۷) مبنی بر عدم حضور آنتی بادی ضد EBV بود. بررسی ها نشان می دهد که استان مازندران از نظر شیوع بیماری MS، یک منطقه با ریسک بالا می باشد و با توجه به وجود تناقض در بررسی ها لذا به نظر می رسد که برای اطمینان بیش تر نیاز به تحقیقات بیش تر باشد. عفونت EBV باعث آلودگی پایدار در لنفوسیت های B می گردد و لنفوسیت های T برای تمام عمر، لنفوسیت های B آلوده را تحت نظر دارند ولی حضور سلول های T پاسخ دهنده به آنتی ژن های EBV اساساً بیماری زا نیست چون آن ها به شکل غیر فعال در بیش تر بالغین سالم EBV مثبت حضور دارند. بیماری زایی بالقوه این سلول ها احتمالاً نیاز به فعال سازی از طریق تقلید مولکولی دارد و یک توالی پنتا پپتید در EBNA یافت شده است که توالی آن با یک اپی توپ از پروتئین پایه ای میلین که از اجزای اصلی غشای میلین است، شباهت دارد (۲۳،۲۲). هم چنین در مطالعه ای کاهش معنی داری از وخامت بیماری در بیماران در دوره های عود و بهبودی که با آسیکلوویر درمان شده اند، گزارش شده است. بنابراین در صورتی که نقش EBV در بیماری زایی MS کاملاً مشخص شود، استفاده از دارویی که از تکثیر EBV جلوگیری کند و یا استفاده از واکسن موثر و ایمن علیه

References

1. Pravica V, Markovic M, Cupic M, Savic E, Popadic D, Drulovic J, et al. Multiple sclerosis: individualized disease susceptibility and therapy response. *Biomark Med* 2013; 7(1): 59-71.
2. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9(7): 727-739.
3. Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9(3): 409-416.
4. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 2010; 9(5): A387-394.
5. Pakseresht M, Shobeyri S, Rafiei A, Amjadi O, Abedini M. The Role of Infectious Agents on Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(122): 456-474.
6. MS international Federation (MSI). *Atlas OF MS* 2013. Geneve: World Health Organization; 2013.
7. Abedidni M, Habibi Saravi R, Zarvani A, Farahmand M. Epidemiologic study of multiple sclerosis in Mazandaran. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2008; 18(66): 82-86.

8. Etemadifar M, Abtahi S-H, Akbari M, Murray RT, Ramagopalan SV, Fereidan-Esfahani M. Multiple sclerosis in Isfahan, Iran: an update. *Mult Scler* 2013; 20(8): 1145-1147.
9. Christensen T. The Role of EBV in MS Pathogenesis. *Int MS J* 2006; 13(2): 52-57.
10. Wallach J. Interpretation of diagnostic tests. 7th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
11. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 20th ed. Philadelphia: WB Saunderds; 2001.
12. Mouhieddine TH, Darwish H, Fawaz L, Yamout B, Tamim H, Khoury SJ. Risk factors for multiple sclerosis and associations with anti-EBV antibody titers. *Clin Immunol* 2015; 158(1): 59-66.
13. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA* 2003; 289(12): 1533-1536.
14. Reidl M, Khalil M, Berger T. Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS. *J Neuro immunol* 2006; 180(1-2): 50-62.
15. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 2005; 293(20): 2496-2500.
16. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67(6): 824-830.
17. Khaki M, Ghazavi A, Ghasami K, Rafiei M, Payani M-A, Ghaznavi-Rad E, et al. Evaluation of viral antibodies in Iranian multiple sclerosis patients. *Neurosci Riyadh* 2011; 16(3): 224-228.
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69(2): 292-302.
19. Pravica V, Popadic D, Savic E, Markovic M, Drulovic J, Mostarica-Stojkovic M. Single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis: disease susceptibility and treatment response biomarkers. *Immunol Res* 2012; 52(1-2): 42-52.
20. Karampoor S, Zahednasab H, Ataei Pirkouh A, Monavari H, Ramagopalan S, Keyvan H. Serostatus of Epstein-Barr virus in Iranian MS patients. *Acta Neurol Belg* 2016; 116(1): 43-46.
21. Pfuhl C, Oechtering J, Rasche L, Gie RM, Behrens JR, Wakonig K, et al. Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2015; 285: 156-160.
22. Lunemann JD, Munz C. EBV in MS: guilty by association? *Trends Immunol* 2009; 30(6): 243-248.
23. Christensen T. The role of EBV in MS pathogenesis. *Int MS J* 2006; 13(2): 52-57.
24. Lycke J, Svennerholm B, Hjelmquist E, Frisén L, Badr G, Andersson M, et al. Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebocontrolled, double-blind study. *J Neurol*.1996; 243(3): 214-224.
25. Taherkhani R, Farshadpour F, MirjaliliA, Amirinejad R. Determination of the association between Epstein-Barr virus (EBV) infection and Multiple sclerosis (MS) disease. *Iran South Med J* 2014; 17(4): 666-675.