

فراوانی عفونت کونژونکتیویت ناشی از هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران، سال ۱۳۸۸-۱۳۸۹

لیلا نورمحمدیان^۱، سید حمیدرضا منوری^۲، محمود شمسی شهرآبادی^۳، آنزبلا عطایی پیرکوه^۴، مریم اسقایی^۵، مسعود ناصری پور^۶

^۱ دانشجوی کارشناس ارشد ویروس‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۲ استادیار ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۳ استاد ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۴ دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۵ استاد چشم‌پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: براساس پژوهش‌های انجام‌شده، ویروس‌ها از عوامل شایع در بروز عفونت‌های چشمی کودکان و بزرگسالان می‌باشند. از شایع‌ترین این عوامل ویروسی می‌توان به هرپس سیمپلکس ویروس، آدنوویروس و انتروویروس‌ها اشاره نمود. در این میان ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، عامل ۹۰-۶۰٪ عفونت‌ها در بزرگسالان است، و در عود حملات منجر به کراتیت هرپسی شده که علت اکثر نابینایی‌ها در کشورهای در حال توسعه می‌باشد؛ لذا تشخیص سریع جهت درمان ضروری است. این بررسی نیز با هدف تعیین شیوع عفونت‌های کونژونکتیویت هرپس سیمپلکس ویروس در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۸ صورت گرفت.

روش بررسی: این مطالعه به صورت توصیفی-مقطعی، بر روی ۱۰۰ بیمار با تابلوی بالینی کونژونکتیویت ویروسی انجام شد. نمونه‌ها در محیط انتقالی جمع‌آوری و در محیط کشت سلولی تلقیح شدند. اثرات سایتوپاتیک ویروس با کشت سلولی کنترل مقایسه و جهت تأیید نتایج، تکنیک PCR به کار برده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون کای اسکوئر صورت گرفت و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: از تعداد ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۲ مورد (۲٪) توسط کشت سلول هرپس سیمپلکس ویروس ایزوله و به وسیله روش PCR، در ۹ مورد (۹٪) DNA ویروس ردیابی شد. بیشترین فراوانی بیماران با HSV مثبت، در گروه سنی ۶-۲۶ سال (۱۳/۵٪) قرار داشت. تفاوت معنی‌داری بین سن جنس در ابتلا به کونژونکتیویت هرپسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد عفونت‌های چشمی هرپسی عامل اصلی نابینایی است، و با توجه به عود مکرر عفونت، صدمات متعاقب آن و تشابهات بالینی با سایر عفونت‌ها ضروری به نظر می‌رسد، تا با تشخیص سریع و اختصاصی HSV صورت گرفته، نسبت به درمان آن اقدام لازم صورت پذیرد.

کلید واژه‌ها: هرپس سیمپلکس؛ ورم ملتحمه چشم؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: hrmonavari@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۹

مقدمه

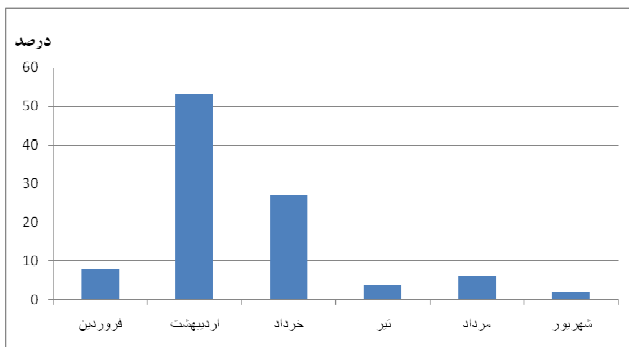
هرپس سیمپلکس و ویروس تیپ ۱ (HSV-1)، ویروس DNA دار ۲ رشته‌ای خطی است که متعلق به زیرخانواده α هرپس ویرینه و خانواده هرپس ویریده است (۱-۳). براساس پژوهش‌های انجام شده در بسیاری از کشورها، ویروس‌ها یکی از عوامل شایع در بروز عفونت‌های چشمی در کودکان و بزرگسالان می‌باشند (۴-۶). عفونت چشمی ناشی از هرپس سیمپلکس تیپ ۱ با شیوع سالیانه بین ۲۰/۷-۵/۹ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال، گزارش شده است (۷). در چشم‌پزشکی کونژنکتیویت و کراتیت دو شکل رایج بیماری‌های چشمی می‌باشند (۴). التهاب ملتحمه (کونژنکتیویت) ویروسی عفونت شایع چشمی است که می‌تواند توسط برخی از عوامل ویروسی ایجاد شود. شدت این بیماری از شدید تا عفونت خفیف سریعاً محدودشونده، متفاوت است (۵، ۶). کونژنکتیویت همراه با پرخونی خفیف با ریزش اشک تا التهاب ملتحمه شدید به همراه ترشحات چرکی متغیر می‌باشد (۵، ۶). از علائم مهم کونژنکتیویت احساس جسم خارجی در چشم، احساس خراشیدگی، سوزش، خارش و فتوفوبی همراه با پرخونی ملتحمه است، در صورت احساس درد، درگیر بودن قرنیه نیز مطرح می‌باشد (۸). عود حملات هرپسی غالباً به کراتیت تبدیل می‌شود (۸)، که در این حالت حدود ۱۰٪ از بیماران دارای علائم کلینیکی هستند (۹). کراتو کونژنکتیویت ویروسی، درگیری توأم قرنیه و ملتحمه بوده که در بیشتر موارد به علت فعالیت هرپس سیمپلکس ویروس و آدنوویروس‌ها در برخی از عفونت‌ها ناشی از سرخک مشاهده می‌شود (۱، ۱۰). کراتیت‌های ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس خصوصاً تیپ ۱، شایع‌ترین نوع کراتیت ویروسی است که عامل مهم اکثر نابینایی‌ها در کشورهای در حال توسعه شناخته شده است (۱، ۸)، همچنین شایع‌ترین علت زخم قرنیه و کوری در ایالت متحده آمریکا می‌باشد (۲، ۱۱). در نهایت تشخیص سریع و درست برای شروع درمان سریع و مناسب ضروری به نظر می‌رسد (۱۲). از تست‌های آزمایشگاهی در تشخیص هرپس سیمپلکس ویروس می‌توان به سیتولوژی سلولی، ردیابی آنتی‌ژن ویروسی (ایمونواسی)، جداسازی ویروس توسط کشت سلول، ردیابی DNA ویروس PCR و (In Situ Hybridisation) ISH اشاره نمود که این تکنیک‌ها از نظر حساسیت و اختصاصی بودن متفاوت هستند (۴، ۱۳). اگرچه لزیون‌های قرنیه و کوتانوس

ایجاد شده تیپیک و خاص می‌باشد، ولی بایستی هرپس سیمپلکس ویروس جداسازی و ردیابی شود. با توجه به مطالعات معدودی که در مورد اپیدمیولوژی هرپس سیمپلکس ویروس انجام گرفته است (۹)، عود مکرر عفونت‌ها و صدمات وارده بر اثر این ویروس به چشم، ایجاب می‌کند که مورد بررسی قرار گیرد. همچنین به علت مشابه بودن تظاهرات بیماری چشمی ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس با دیگر عفونت‌ها، ضروری است تا با تشخیص سریع و اختصاصی هرپس سیمپلکس ویروس از درمان نامناسب بیماران اجتناب شود (۱۴). در این مطالعه نیز جهت تشخیص هرپس سیمپلکس ویروس بر روی نمونه‌های اشک گرفته شده از بیماران با تابلوی بالینی کونژنکتیویت ویروسی از تکنیک کشت سلول و PCR (Polymerase Chain Reaction) جهت تأیید آن استفاده گردید.

روش بررسی

این بررسی به روش توصیفی - مقطعی بر روی ۱۰۰ بیمار حداقل ۱/۵ و حداکثر ۷۰ ساله با تابلوی بالینی کونژنکتیویت ویروسی مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفت. پس از تهیه و تنظیم پرسشنامه، توسط پزشک متخصص در درمانگاه مربوطه با استفاده از سواب پنبه‌ای نرم استریل از ملتحمه بیماران و قطرات اشک نمونه گیری شد و به محیط انتقالی (Viral Transport Medium) در حجم ۲ml که قبلاً در آزمایشگاه ساخته شده بود، منتقل گردید. برای هر بیمار ۲ سواب پنبه‌ای استریل، یکی جهت روش PCR و دیگری برای تکنیک کشت سلول در نظر گرفته شد. تمامی نمونه‌های جمع آوری شده قبل از هرگونه درمان، ضد ویروسی شده و در ظروف حاوی یخ خشک پس از انتقال به بخش ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران تا زمان آزمایش در فریزر -70°C نگهداری شدند. برای جداسازی ویروس، از محیط کشت DMEM (Dubleccos' Modified Eagle Medium) ساخته شده از رده سلولی کلیه میمون سبز آفریقای (Vero) که قادر به تحمل پاساژهای مکرر و حساس برای رشد و تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس می‌باشد، استفاده گردید (۱۲). برای این منظور ابتدا سلول‌ها بعد از رشد در فلاسک‌های یک بار مصرف کشت سلولی Nunc، جهت انجام آزمایش و تلقیح نمونه‌های بیماران به

دچار پرخونی، درد و ریزش اشک بودند. در ۷۵٪ خارش و تحریک، ۸/۶۸٪ ادم، ۳۱/۲٪ فولیکولی و ۶/۲٪ فارنیت مشاهده گردید.



نمودار: مبتلایان به کونژونکتیویت ویروسی بر اساس فصل

از مجموع ۱۰۰ بیمار نمونه برداری شده، ۵۹ نفر مرد و ۴۱ نفر زن با میانگین سنی ۳۳/۸ سال بودند. عفونت ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس در افراد مذکر با ۷ مورد (۷/۷٪) نسبت به افراد مؤنث با ۲ مورد (۲/۲٪) بالاتر گزارش شد. بین جنس و سن (جدول) با ابتلا به عفونت ویروس هرپس سیمپلکس تپ ۱، از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت.

جدول: توزیع مبتلایان به کونژونکتیویت هرپس سیمپلکس ویروس تپ ۱ بر اساس سن و جنس

گروه‌های سنی (سال)	موارد مثبت (درصد)		جنس (درصد)		کل موارد مثبت (درصد)
	مرد	زن	مرد	زن	
< ۵	۰ (۰)	۳ (۰)	۰	۰	۰ (۰)
۶-۲۶	۱۷ (۱)	۲۰ (۴)	۵/۸	۲۰	۵ (۱۲/۹)
۲۷-۴۷	۱۴ (۰)	۲۱ (۳)	۰	۱۴/۲	۳ (۷/۲)
۴۸-۶۸	۷ (۱)	۱۳ (۰)	۱۴/۲	۱۲/۵	۱ (۱۳/۴)
> ۶۹	۳ (۰)	۲ (۰)	۰	۰	۰ (۰)
کل	۴۱ (۲)	۵۹ (۷)	۴/۹	۱۱/۹	۹ (۹)

از رده سلولی Vero جهت کشت سلول برای مشخص نمودن حضور ویروس در نمونه‌های چشمی گرفته شده از بیماران استفاده شد. اثرات سایتوپاتیک ویروسی تنها در ۲ نمونه مشاهده گردید، لذا HSV در ۲٪ از نمونه‌های بیماران مورد مطالعه توسط کشت سلول جدا شد.

سلول vero مونولایر طبیعی قبل از تلقیح نمونه، اثرات سایتوپاتیک ویروس هرپس سیمپلکس تلقیح شده بر روی سلول مونولایر vero و پس از ۲۴ ساعت DNA ویروس توسط PCR، در ۹ مورد از

میکروتیوپ‌های ۲۴ خانه‌ای یک بار مصرف انتقال داده شدند. در ادامه، پس از تشکیل منولایر سلولی از سلول Vero نمونه بیماران به آنها تلقیح گردید و به مدت یک ساعت در 37°C به منظور جذب ویروس‌ها انکوبه شدند. سپس محیط کشت سلولی جدید همراه با سرم جنین گاو (۸٪ FBS) خریداری شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، بر روی بستر سلول‌های آلوده به ویروس اضافه شد. در مرحله بعد، میکروپلیت‌ها در انکوباتوری با شرایط 37°C و ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شدند. به منظور مشاهده اثرات سایتوپاتیک ویروس (CPE)، یک خانه جهت کنترل مثبت (آلوده با بذر ویروس هرپس سیمپلکس تپ ۱ که قبلاً از بیمار جدا شده و در آزمایشگاه توسط منوکلونال آنتی‌بادی بر علیه HSV-1 تعیین تپ شده بود) و یک خانه جهت کنترل منفی (کنترل شاهد سلولی) که آلوده به ویروس نبود، در نظر گرفته شد و تمام مراحل فوق بر روی آنها صورت گرفت. سپس هر روز تا ۴۸ ساعت کشت‌های سلولی حاوی نمونه‌ها جهت اثرات سایتوپاتیک حاصل از ویروس هرپس سیمپلکس در مقایسه کشت سلولی کنترل منفی و کنترل مثبت، به وسیله میکروسکوپ معکوس (Invert) بررسی شدند (۱۲).

جهت تأیید نتایج مثبت و منفی کشت سلول از تکنیک PCR استفاده گردید. به علت آنکه امکان غیرفعال شدن ویروس تا زمان انجام آزمایش وجود داشت؛ لذا در کنار تکنیک کشت سلول، PCR نیز گذاشته شد. جهت جداسازی و استخراج DNA ویروس، نمونه‌های گرفته شده به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند، سپس تکنیک PCR توسط کیت خریداری شده از شرکت تکاپو زیست و توسط ترموسایکلر 40 بر روی تمامی نمونه‌ها انجام گردید.

سیکل PCR جهت HSV-1 دارای مراحل زیر می‌باشد:

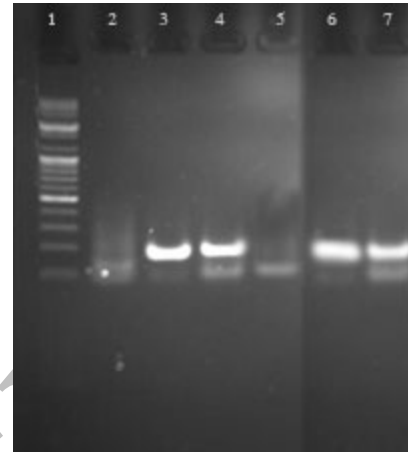
ابتدا ۳ دقیقه در 95°C یک سیکل (جداسازی اولیه)، سپس ۴۰ سیکل که شامل ۳ مرحله می‌باشد: 95°C ؛ ۳۰ ثانیه، 50°C ؛ ۳۰ ثانیه، 72°C ؛ ۳۰ ثانیه و مرحله نهایی ۳ دقیقه در 72°C یک سیکل (طویل شدن نهایی).

یافته‌ها

توزیع فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۱۰۰ بیمار برحسب ماه‌های مختلف در تصاویر نمایش داده شده است. ۸۷/۵٪ بیماران

گردید. اگرچه روش کشت سلول روش استاندارد طلایی جهت ردیابی عفونت‌های فعال HSV-1 است، اما می‌تواند تکنیک غیرحساسی نیز برای جداسازی HSV-1 از لایه‌های عمیق قرنیه باشد و از طرفی، ممکن است قادر به ردیابی عفونت نیز نباشد (۱۳). جداسازی ویروس توسط تکنیک کشت سلول نیاز به ارگانسیم زنده، فعال و محیط انتقالی ویروس جهت انتقال آزمایشگاه دارد، همچنین فاصله بین نمونه‌گیری از بیماران و انتقال به آزمایشگاه و قراردادن نمونه‌ها در دمای مناسب باید سریع انجام شود که این روند معمولاً سخت و وقت‌گیر است. در حقیقت، احتمالاً علت کاهش فراوانی ویروس جداشده توسط تکنیک کشت سلول به دلایل بالا بوده که امکان غیرفعال شدن ویروس تا زمان انجام آزمایش را موجب می‌شود. مطالعات دیگر محققین نیز در این زمینه صحت مطالب بالا را تأیید می‌کند. به‌عنوان مثال در پژوهش توسط MA-E1 و همکارانش در سال ۲۰۰۵، از ۴۸ مورد تنها ۱۰ مورد به‌وسیله کشت سلول جدا شد (۱۲) و در مطالعه‌ای که توسط خدادوست و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت از ۲۵ مورد تنها ۳ مورد توسط کشت سلول جدا گردید (۴). همچنین در مطالعه Eiichi و همکارانش در سال ۲۰۰۰، از ۴۷۸ مورد ۲۳ مورد گزارش شد (۶) و در تحقیق Pramod و همکارانش در سال ۱۹۹۸ از ۷۰ مورد، ۱۴ مورد توسط کشت سلول جدا گردید (۱۶). PCR یک روش تشخیصی حساس و سریع آزمایشگاهی جهت شناسایی هرپس ویروس‌ها می‌باشد (۱۷). در مقایسه این مطالعه با پژوهش‌های دیگری که در آنها از تکنیک PCR جهت ردیابی DNA هرپس ویروس‌ها استفاده شده بود مثل پژوهش توسط MA-E1 در سال ۲۰۰۵، این فراوانی ۲۹/۲٪ گزارش گردید (۱۲). در پژوهش خدادوست و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۴، ۸۸٪ DNA HSV-1 در نمونه‌های گرفته‌شده از قطرات اشک بیماران ردیابی شد (۴) که نشان‌دهنده حساس بودن این تکنیک جهت ردیابی DNA HSV-1 در قرنیه و قطرات اشک می‌باشد، نتایج به دست آمده نیز مبین غیرفعال شدن ویروس بود که توسط کشت سلول قابل شناسایی نبود، ولی با استفاده از PCR، DNA ویروس ردیابی شد. با مقایسه نتایج کسب‌شده از این مطالعه با تحقیقات دیگر می‌توان به این نتیجه دست یافت که اندکی اختلاف بین یافته‌های فوق از نظر شیوع کونژنکتیویت در

نمونه‌ها ردیابی گردید. نتایج آزمایش PCR با استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی صورت گرفت، همچنین سایز مارکر به اندازه ۱۰۰bp و اندازه باند DNA ویروس به دست آمده ۱۹۶bp بود.



شکل: ردیابی DNA هرپس سیمپلکس تیپ ۱ (HSV-1) از بیماران توسط روش PCR در ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰٪. ردیف ۱، سایز مارکر ۱۰۰bp را نشان می‌دهد. ردیف ۲، نمونه کنترل منفی و ردیف شماره ۳ کنترل مثبت ۱۹۶bp است. ردیف‌های ۴-۷، نمونه بیماران می‌باشد.

بحث

بسیاری از میکروارگانسیم‌ها به‌ویژه ویروس‌ها در بروز اشکال عفونت‌های چشمی انسان شناسایی شده‌اند، که از شایع‌ترین آنها می‌توان هرپس ویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها را نام برد (۱۱). پیدایش هرگونه اختلال در عمل طبیعی اپی‌تلیوم قرنیه، چشم را برای کراتیت مستعد می‌کند. اگرچه کراتو کونژنکتیویت در ایران هم همانند بسیاری از دیگر کشورهای در حال توسعه یک مشکل شایع و مهم می‌باشد، ولی تحقیقات اندکی راجع به آن در ایران صورت گرفته است. در این پژوهش از مجموع ۱۰۰ نمونه چشمی جمع‌آوری شده از مبتلایان به کونژنکتیویت، ۲٪ پس از کشت و ۹٪ بعد از PCR از نظر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ مثبت گزارش شده‌اند که کمی بالاتر از نتایج دیگر مطالعات می‌باشد، به‌طوری‌که در تحقیق تمیزی‌فر و همکارانش در سال ۱۳۸۱، فراوانی آن ۲٪ (۸)، در مطالعه مدرسی و همکارانش در سالهای ۱۳۷۶-۱۳۷۴، ۱/۴٪ (۱۱) و در پژوهشی که در کراچی طی سالهای ۱۹۹۲-۱۹۹۰ انجام گرفت، ۲/۳٪ (۱۵) گزارش

درگیری توأم قرنیه و ملتحمه می‌شود و عود حملات هر غالباً به کراتیت هرپسی قابل تبدیل است (۸)، همچنین کراتیت‌های ناشی از این ویروس خصوصاً تیپ ۱، عامل مهم اکثر نابینایی‌ها در کشورهای در حال توسعه می‌باشد؛ لذا ضرورت تشخیص صحیح و درست جهت شروع درمان سریع و مناسب باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

مناطق مختلف جهان وجود دارد که خود گویای تفاوت جغرافیایی و بهداشتی این مناطق با دیگر نقاط است.

نتیجه‌گیری

عفونت‌های ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس به دو صورت فعال و عودشونده می‌تواند وجود داشته باشد. با توجه به اینکه عفونت‌های چشمی ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس منجر به

References:

1. Field BN, Knipe DM. *Virology*. 3rd ed. New York: Raven Press; 1996. p. 672-73,215,2320-22.
2. Jawetz E. *Medical Microbiology*. 19th ed. California: Appleton of Larg; 1991.
3. White Fenner F. *Medical Virology*. 4th ed. USA: Academic Press; 1994.
4. Khodadoost M, Sabahi F, Behroz M, Roustai M, Sadari H, Amini-Bavil-Olyae S, et al. Study of a Polymerase Chain Reaction-Based Method for Detection of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Among Iranian Patients with Ocular Herpetic Keratitis Infection. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2004;48(4):328-32.
5. Mendell GL, Douglas A. *Principles and Practice of Infection Disease*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1251-56.
6. Eiichi U, Satoshi T, N Orihiko I. Clinical and Epidemiological Feature of Acute Follicular Conjunctivitis with Special Reference to that Cause by Herpes Simplex Virus Type 1. *Br J Ophthalmology* 2000;84:968-72.
7. Kaye S, Choudhary A. Herpes Simplex Keratitis. *Progress in Retinal and Eye Research* 2006;25:355-80.
8. Tamizifar H, Moeni HA, Azizollahi B, Fazeli H. A Study of the Prevalence of AdenoVirus and Herpes Simplex Virus Infection in Patient with Conjunctivitis and Keratoconjunctivitis by Immunofluorescence Test and Cell Culture. *Esfahan Univer of Med Scien J* 2004;22(74,75):13-17. [Full Text in Persian]
9. Labetoulle M, Auquire P, Conrad H, Crochard A, Daniloski, M Bouè S, et al. Incidence of Herpes Simplex Virus Keratitis in France. *Ophthalmology* 2005;112:888-895.
10. Vaughan D, Asbury T. *General Ophthalmology*. 11th ed. California: Appleton & Lange; 1986. p. 10-12,88-115.
11. Modaresi Sh, Lashibe AR. Study of Virus Againt (Herpes Virus, Adenovirus and Entro Viruses) of Corneal Infection in Tehran Farabi Hospital. *Univer of Med Scien J* 2001;31(30):20-26. [Full Text in Persian]
12. MA El-Aal, ME Sayed, Mohammed E, Ahmmmed M, Fathy M. Evaluation of Herpes Simplex Detection in Corneal Scrapings by Three Molecular Methods. *Current Microbiology* 2006;52(5):379-82.
13. Kaye BS, Baker K, Bonshek R, Maseruka H, Grinfeld E, Tullo Andrew, et al. Human Herpesviruses in the Cornea. *Br J Ophthalmol* 2000;84:563-571.
14. Asbell PA, Torres MA, Kamenar T, Botton EJ. Rapid Diagnosis of Ocular Herpes Simplex. *British Journal of Ophthalmology* 1995;79:473-475.
15. Woodlan RM, Darougar S, Thaker V, Commell L, Siddque M, Wainia J. Causes of Conjunctivitis and Keratoconjunctivitis in Karachi, Pakistan *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 1992;86(4):317-320.
16. Pramod NP, Thyagarajan SP, Kannan, et al. Virological and Clinical Features of Herpes Simplex Keratitis in South India. *Inter Net J Ophthalmol* 1997;2:18-26.
17. Aono T, Murakami S, Yanagihara N, et al. Detection of Human Alfa-Herpesvirus DNA Using Consensus Primers and Specific Probes. *Acta Otolaryngol* 1994;514(Suppl):132-4.