



Inactivation of HSV-1 Using Methylene Blue and Visible Light: Correlation of TCID50 Reduction with Glycoprotein D RNA Expression by RT-qPCR

Leila Mousavi Dehaqani¹, Zahra Paz², Zohreh Sharifi¹

¹Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran



Received: 2026/01/11
Accepted: 2026/04/04

<http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.22.1.19>

Citation:

Mousavi Dehaqani L, Paz Z, Sharifi Z. Inactivation of HSV-1 Using Methylene Blue and Visible Light: Correlation of TCID50 Reduction with Glycoprotein D RNA Expression by RT-qPCR. J Iran Blood Transfus. 2026; 23 (1):

Correspondence: Sharifi Z, Associate professor of Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.

Tel: (+9821) 82052152

E-mail: z.sharifi@tmi.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives

Despite Significant advances in blood safety, the risk of infectious agent transmission remains a challenge for blood transfusion centers. To enhance blood safety, methods for removing or inactivating viruses have been developed. This study focuses on the inactivation of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) using methylene blue and visible light in plasma and compares the efficacy of the qRT-PCR and TCID50 methods.

Materials and Methods

Vero cells were cultured in DMEM with 1% penicillin-streptomycin and 10% fetal calf serum at 37°C with 5% CO₂. The virus titer was determined by infectivity these cells. Subsequently, the virus stock was added to plasma at 0.1 volume. The virus was added to five individual plasma units obtained from different blood donors. Five plasma samples containing virus were treated with 1 μM methylene blue and then irradiated for 10 min at 627 nm. Virus titration was performed in 96-well plates, and virus titer was measured before and after irradiation through 10-fold serial dilutions using the TCID50 method. The control group included plasma without virus, plasma containing virus irradiated without methylene blue, and plasma containing methylene blue without irradiation. After RNA extraction from the dilutions and cDNA construction, glycoprotein D expression was quantified by qRT-PCR. All experiments were repeated three times. Statistical analyses were performed using SPSS-26 and the Pearson correlation coefficient between the two tests was calculated.

Results

Before inactivation, the virus titer was determined by observing cytopathic effects in Vero cells as 107TCID50/mL. After inactivation with methylene blue and irradiation, the titer decreased to 102 TCID50/mL, representing a 5-log reduction. The mean threshold cycle (Ct) of the glycoprotein D gene in cell cultures containing non-inactivated HSV-1 (107 TCID50/mL) was 22.6 (Ct = 22.6) whereas the mean Ct of the glycoprotein D gene in plasma samples after inactivation by methylene blue and visible light (102 TCID50/mL) was 28 (Ct = 28). This indicates a 15-fold decrease in glycoprotein D expression (p=0.001).

Conclusions


A correlation was observed between the logarithmic values of TCID50 and Ct values obtained by qRT-PCR assay. Molecular methods based on glycoprotein D (gD mRNA) expression may be served as a useful approach for detecting of active HSV infection.

Key words: Virus Inactivation, Herpes Simplex Virus Infection, methylene blue, visible light, RT-PCR





غیرفعال سازی HSV-1 با متیلن بلو و نور مرئی: همبستگی کاهش TCID50 با بیان RNA گلیکوپروتئین D با روش RT-qPCR

لیلا موسوی دهاقانی^۱، زهرا پاز^۲، زهره شریفی^۳ 

۱- کارشناس ارشد زیست فناوری - مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
 ۲- کارشناس میکروبیولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
 ۳- PhD ویروس‌شناسی - استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

چکیده

سابقه و هدف

علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در سلامت خون، خطر انتقال عوامل عفونی همچنان یک چالش برای مراکز انتقال خون است. برای افزایش سلامت خون، روش‌هایی برای حذف یا غیرفعال کردن ویروس‌ها توسعه یافته است. این مطالعه بر غیرفعال سازی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) با استفاده از متیلن بلو و نور مرئی در پلاسما تمرکز دارد و اثربخشی غیرفعال سازی را با روش‌های RT-PCR و TCID50 مقایسه می‌کند.

مواد و روش‌ها

سلول Vero در محیط DMEM با ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گوساله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ کشت داده شدند. تیتر ویروس با آلوده‌سازی این سلول‌ها تعیین شد. متعاقب آن، ذخیره ویروس در حجم ۰/۱ پلاسما به آن اضافه شد. ویروس به پنج واحد پلاسمای جداگانه که از اهداکنندگان خون مختلف به دست آمده بود، اضافه شد. پنج نمونه پلاسمای حاوی ویروس با متیلن بلو ۱ میکرومولار تیمار شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۶۲۷ نانومتر تحت پرتودهی قرار گرفتند. تیتراسیون ویروس در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شد و تیتر ویروس قبل و بعد از پرتودهی از طریق رقت‌های سریالی ۱۰ برابری با روش TCID50 اندازه‌گیری شد. گروه کنترل شامل پلاسمای بدون ویروس، پلاسمای حاوی ویروس پرتودهی شده بدون متیلن بلو و پلاسمای حاوی متیلن بلو بدون پرتودهی بود. پس از استخراج RNA از رقت‌ها و ساخت cDNA، بیان گلیکوپروتئین D با RT-PCR اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار گردید. در نهایت محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۲۶ انجام شد و ضریب همبستگی پیرسون بین دو آزمایش محاسبه گردید.

یافته‌ها

قبل از غیرفعال سازی، تیتر ویروس با مشاهده اثرات سیتوپاتیکی در سلول‌های Vero به صورت TCID50/mL ۱۰^۷ تعیین شد. پس از غیرفعال سازی با متیلن بلو و پرتودهی، تیتر به TCID50/mL ۱۰^۲ کاهش یافت که نشان‌دهنده کاهش ۵ لگاریتمی است. میانگین چرخه آستانه (Ct) ژن گلیکوپروتئین D در کشت‌های سلولی حاوی HSV-1 غیرفعال نشده (10^۷ TCID50/mL)، ۲۲/۶ (Ct= ۲۲/۶) بود، در حالی که میانگین Ct ژن گلیکوپروتئین D در نمونه‌های پلاسما پس از غیرفعال شدن توسط متیلن بلو و نور مرئی (10^۲ TCID50/mL)، ۲۸ (Ct= ۲۸) بود. این نشان دهنده کاهش ۱۵ برابری در بیان گلیکوپروتئین D است (p= ۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری

بین مقادیر لگاریتمی TCID50 و مقادیر Ct به دست آمده از روش RT-PCR همبستگی مشاهده شد. روش‌های مولکولی مبتنی بر بیان گلیکوپروتئین D (gD mRNA) ممکن است به عنوان یک رویکرد مفید برای تشخیص عفونت فعال HSV به کار گرفته شوند.

کلمات کلیدی: غیرفعال سازی ویروس، ویروس هرپس سیمپلکس، متیلن بلو، نور مرئی، RT-PCR



تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۱/۱۵

<http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.22.1.19>

Citation:

Mousavi Dehaqani L, Paz Z, Sharifi Z. Inactivation of HSV-1 Using Methylene Blue and Visible Light: Correlation of TCID50 Reduction with Glycoprotein D RNA Expression by RT-qPCR. J Iran Blood Transfus. 2026; 23 (1):

نویسنده مسئول:

دکتر زهره شریفی. استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

E-mail: z.sharifi@tmi.ac.ir

مقدمه

با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در سلامت خون و وجود روش‌های مختلف موجود، هنوز شناسایی عوامل عفونی به صفر نرسیده است و احتمال انتقال ویروس‌ها از طریق خون و فرآورده‌های آن، یکی از چالش‌های مهم و اصلی در مراکز انتقال خون می‌باشد (۱-۳). برای افزایش سلامت خون، روش‌های حذف یا غیر فعال‌سازی ویروس‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۴). برای بررسی مؤثر بودن روش غیر فعال‌سازی، از تکثیر ویروس در کشت سلول استفاده می‌شود و نتایج آزمایش بر اساس تغییرات در مورفولوژی سلول استوار است و ممکن است اثر تخریب طبیعی سلول با اثر سایتوپاتیک ویروس از هم قابل تشخیص نباشد. در نتیجه استفاده از روش‌هایی که تکثیر ویروس را در کشت سلول نشان دهد می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد تا تکثیر ویروس از تخریب طبیعی تشخیص داده شود.

ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک و دو (HSV-2)، به عنوان ویروس هرپس انسانی نوع یک و دو (HSV-1) (human herpesvirus 1 & 2, HHV-1, HHV-2) نیز شناخته می‌شوند (۵). تمام ویروس‌های هرپس دارای ویژگی‌های مشترک ژنوم DNA دو رشته‌ای بزرگ خطی با کپسید بیست وجهی و پوشش خارجی لیپید دولایه می‌باشند. پوشش ویروس توسط تگومنت به کپسید متصل است و ذره کامل ویریون را تشکیل می‌دهد (۶، ۷). ورود هرپس به داخل سلول میزبان توسط چندین گلیکوپروتئین سطح پوشش ویروس به گیرنده‌های سطح سلول انجام می‌شود (۸). بعد از اتصال ویروس به سطح سلول از طریق فیوژن غشا و تلفیق شدن پوشش ویروسی با غشای سلول، محتویات ویروسی به سلول وارد می‌شود. ویروس هرپس ابتدا با دو گلیکوپروتئین gC و gD به هیپران سولفات سطح سلول متصل می‌شوند. سپس گلیکوپروتئین gD حداقل به سه گیرنده اختصاصی شناخته شده متصل می‌گردد (۹). گلیکوپروتئین (gD) برای ورود به سلول و عفونت HSV ضروری است و ژن آن به دلیل نواحی حفاظت شده و اختصاصی بودن برای تشخیص HSV به کار می‌رود، mRNA gD یک هدف مناسب برای تشخیص عفونت فعال HSV است.

از آن جایی که پاتوژن‌های ویروسی برای تکثیر و گسترش خود به مکانیسم‌های سلول میزبان متکی هستند و از آن‌ها بهره می‌برند، بنابراین مطالعه تعاملات بین ویروس و سلول میزبان و تعیین عفونت‌زایی ویروس، به عنوان مثال، با

سنجش‌های دوز عفونی ۵۰٪ کشت بافت (TCID₅₀)، انجام می‌شود. تعیین تیتراهای کمی ویروس ابزاری مهم برای تعیین عفونت‌زایی و تکثیر ویروس هستند و هر دو پارامترهای حیاتی برای ارزیابی و بررسی تأثیر روش‌های غیر فعال‌سازی ویروس‌ها می‌باشند. سنجش‌های دوز عفونی ۵۰٪ کشت بافت (TCID₅₀) آزمایش‌های تیتراسیون ویروس هستند که می‌توانند با بررسی اثرات سیتوپاتیک ویروس بر روی کشت سلولی میزبان تلقیح شده، برای تعیین کمیت تیتراهای ویروس استفاده شوند. در سنجش‌های TCID₅₀، رقت‌های مختلف ویروس به جمعیت‌های سلولی میزبان با تعداد سلول یکسان اضافه شده و تا زمانی که اثر سیتوپاتیک مشاهده شود، انکوبه می‌شوند. مقدار TCID₅₀ نشان‌دهنده مقدار رقت ویروس مورد نیاز برای القای اثرات سیتوپاتیک در ۵۰٪ از چاهک‌های حاوی کشت سلولی تلقیح شده پس از یک دوره زمانی مشخص است. سنجش‌های TCID₅₀ با شمارش چشمی تعداد چاهک‌های آسیب دیده یا سنجش‌های زنده مانی سلول با استفاده از میکروسکوپ معکوس به عنوان نتیجه نهایی ارزیابی می‌شود (۱۰).

برای بررسی تغییرات ناشی از عوامل طبیعی یا غیره در فرآیندهای بیولوژیک سلول، از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. یکی از این راه‌ها، بررسی تغییرات ایجاد شده در میزان رونوشت‌های سلولی (transcript) است که نشانه تغییرات پروتئین‌های سلول می‌باشد. در حال حاضر با استفاده هم‌زمان از واکنش ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR) شناسایی یک رونوشت RNA از ژن‌های اولیه حاوی تعداد کمی پایین امکان پذیر است (۱۱).

در این پژوهش برای بررسی مؤثر بودن روش غیر فعال‌سازی HSV-1 به عنوان ویروس مدل ویروس‌های DNA دو رشته‌ای پوشش‌دار با روش متیلن‌بلو و نور مرئی از کشت سلول استفاده شد و تیترا عفونی ویروس با روش دوز عفونی ۵۰٪ کشت بافت (TCID₅₀) و Real Time PCR قبل و بعد از غیر فعال‌سازی بررسی و همبستگی دو روش مقایسه شد تا روشی حساس و با دقت بالا که از نظر زمان و هزینه به صرفه باشد ارائه شود.

مواد و روش‌ها

کشت سلول:

لاین سلولی VERO با منشا کلیه میمون سبز آفریقایی که در تانک از آزمایشگاه ویروس‌شناسی موجود بود، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کرایو ویال پس از خروج از تانک

Merk) تهیه گردید. با توجه به جرم مولی متیلن‌بلو، ۱ cc (۸۵/۳۱۹ g/mol) از محلول متیلن‌بلو با غلظت ۵۰۰ μM تهیه و در ظرفی تاریک در ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

غیرفعال‌سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن‌بلو و پرتودهی با نور مرئی:

به منظور استفاده از روش متیلن‌بلو و پرتودهی، از دستگاه پرتودهی با نور مرئی استفاده شد (۱۲). غیر فعال‌سازی ویروس با نور دو طرفه طی دستورالعمل زیر انجام گرفت. ابتدا نمونه پلاسما از فریزر ۳۰- درجه سانتی‌گراد خارج و در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید.

کیسه حاوی ۵۰ میلی‌لیتر فرآورده پلاسمایی تا زمان استفاده در فریزر ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هنگام آزمایش فرآورده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب و در حجم‌های کوچکتر (۱۰ cc) تقسیم گردید. در زیر هود لامینار کلاس ۲ با استفاده از رابط استریل و دستگاه اتصال (آلمان، CompoDock Fresenius) ۵۰ میلی‌لیتر پلاسما از کیسه اصلی به ۵ کیسه به حجم ۱۰ میلی‌لیتری تقسیم و بدون باز کردن به کیسه‌ها منتقل شد و با استفاده از ترازو توزین شد. کیسه‌ها توسط یک دستگاه سیلر حرارتی (Fresenius، آلمان) از هم جدا شدند. سپس به کمک سرنگ استریل از طریق کورد به ازای هر ۹ میلی‌لیتر پلاسما، ۱ میلی‌لیتر از استوک ویروس و متیلن‌بلو با غلظت ۱ μM به پلاسمای موجود در کیسه اضافه و با سیلر حرارتی سیل گردید به نحوی که ضخامت پلاسما در کیسه حدود یک میلی‌متر شد.

سپس کیسه در محل تعبیه شده در دستگاه برای پرتودهی گذاشته شد. پرتودهی در زمان ۱۰ دقیقه به صورت دو طرفه در ۶۲۷ nm تحت تابش و shaking قرار گرفتند. به منظور تعیین کاهش تیترو ویروس از پلاسما پس از پرتودهی نمونه‌برداری شد. پس از ضد عفونی کردن کیسه پس از تابش، زیر هود کلاس ۲ با استفاده از قیچی استریل کورد بریده شد و محتویات آن به آرامی به یک فالدکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس کیسه خالی شده درون کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده است. از هر نمونه سریال رقت ۱۰ تایی تهیه گردید. از هر رقت بر روی پلیت ۹۶ خانه‌ای برده شد و CPE سلول‌ها در بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر پرتودهی از نمونه‌های شاهد شامل پلاسمای فاقد ویروس بدون پرتودهی، پلاسما پرتو داده شده

ازت در ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد به سرعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شد. پس از شستشو و حذف DMSO، سلول‌ها با لام نئوبار و محلول تریپان‌بلو شمارش گردید و درصد سلول زنده محاسبه شد. سپس سلول‌ها در محیط (DMEM) Dulbecco's Modified Eagle Medium، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین تا غلظت نهایی ۱٪ و سرم جنین گوساله ۱۰٪ (Gibco) به فلاسک کشت 25 cm^3 منتقل شد و در انکوباتور حاوی رطوبت ۹۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ قرار داده شد.

تیتراسیون ویروس:

ابتدا سلول‌های Vero در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پس از کامل شدن ۷۰٪ لایه سلولی، استوک ویروس HSV-1 از فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد ذوب شد و در هشت رقت از (۱۰^{-۸}-۱۰^{-۱}) تهیه گردید. برای رقت‌های تهیه شده چهار چاهک کشت سلول، کشت سلول بدون ویروس به عنوان کنترل سلول و در چهار چاهک کشت سلول، از استوک ویروس بدون ایجاد رقت به عنوان کنترل ویروس ریخته شد. محیط کشت از چاهک‌های پلیت خارج شد و سطح سلول‌ها به منظور حذف سرم سه بار با ۳۰۰ μL DMEM شسته شد. از هر رقت ویروس ۱۰۰ μL در ۴ چاهک ریخته شد. به مدت ۱ ساعت ویروس در مجاورت سلول در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در طول این مدت، هر ۱۰ دقیقه یک بار پلیت چرخانده شد تا ویروس در تماس با سلول‌ها قرار گیرد. پس از یک ساعت، ۳۰۰ μL محیط کشت با ۲٪ سرم به چاهک‌های پلیت اضافه شد. پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. اثر سیتوپاتوژنیک (CPE) Cytopathogenic Effects به مدت ۷ روز بررسی شد و تیترو TCID50 بر اساس روش Reed-Muench محاسبه شد.

پلاسمای تازه منجمد (FFP) Fresh Frozen Plasma:

پنج نمونه پلاسمای تازه منجمد شده با گروه خونی O مثبت از سازمان انتقال خون، پایگاه وصال تهیه گردید. فرآورده‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هنگام آزمایش فرآورده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید و در حجم‌های کوچکتر (۱۰ cc) تقسیم شد.

متیلن بلو:

متیلن بلو از شرکت (product number 1592700010)

جدول ۱: برنامه چرخه دمایی برای انجام Real Time PCR

مرحله	درجه حرارت	مدت	تعداد چرخه	نوع تجزیه و تحلیل
Pre-Incubation	۹۴	۱۰ دقیقه	۱	-
Amplification	۹۵	۱۰ ثانیه	۴۵	Quatification
		۱۰ ثانیه		
	۵۸	۲۵		
	۷۲	۰		
Melting Curve	۹۵	۰	۱	Melting Curve
	۶۵			
Melting	۹۵	Ramp Rate °C/sec ۰/۱	Continuouce	-
Cooling	۴۰	۳۰ ثانیه	۱	-

حاوی ویروس فاقد متیلن بلو، پلاسما همراه ویروس و متیلن بلو بدون پرتو دهی استفاده گردید. تمامی آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار گردید. تیتراسیون ویروس پس از غیر فعال سازی در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد و کاهش تیترو ویروس با روش Reed-Muench محاسبه گردید (۱۴، ۱۳).

۴ μL از DEPC Water افزوده شد. مخلوط فوق ۵-۳ ثانیه سانتریفیوژ و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شده و سپس ویال به Cool Box منتقل شد. سپس به محلول فوق ۱۰ μL از RT premix افزوده شد. برای سنتز cDNA به مخلوط فوق به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد؛ ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در ترمال سایکلر قرار داده شد. سپس با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GAPDH* و گلیکوپروتئین D (GPD) (با شماره دسترسی OZ349004) برای ویروس HSV؛ بر روی cDNA، Real Time RT-PCR انجام شد (۱۵).

توالی آغازگری ژن‌های مورد استفاده؛ شامل ژن‌های *GAPDH* و گلیکوپروتئین D (GPD) برای ویروس HSV می باشد:

HSV, Forward (5'-CATCACCCGACCCGGAGAGGGAC),
 HSV, Reverse (5'-GGGCCAGGCGCTTGTGGGTGTA),
GAPDH F, 5' CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT 3'
GAPDH R, 5' CCATGGTGTCTGAGCGATGT 3'.

برای انجام آزمایش مطابق دستور عمل کیت (Fast SYBR® Green Master Mix) شرکت رُوش عمل شد. محتوای هر یک از ویال‌های Reaction Mix و آنزیم Reaction Mix به مدت ۲۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. بر اساس تعداد کلی رقت‌ها؛ تعداد مشخص مورد نیاز کاپیلاری LightCycler Pre cooled در داخل Centrifuge Adapters قرار داده شد. چیدمان کاپیلاری‌ها با سه تکرار برای HSV و *GAPDH* در گروه‌های شاهد؛ ویروسی؛ و رقت‌های از 10^{-1} تا 10^{-8} قرار داده شد. در داخل هر کاپیلاری LightCycler از پیش سرد شده ۴ μL از

استخراج اسید نوکلئیک، با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت Roche) و مطابق با دستور کار شرکت سازنده استخراج شد. حدود ۵ میلیون سلول در میلی لیتر در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشت داده شد و نمونه‌ها قبل و بعد از پرتو دهی به چاهک‌ها اضافه شدند. پس از CPE پلیت‌ها در روز سوم فریز شدند. برای استخراج RNA، محتویات هر چاهک در ۳۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و از سوسپانسیون آن جهت استخراج استفاده شد. جهت بررسی کیفیت RNA تخلیص شده، از دستگاه نانو دراپ استفاده شد. با استفاده از نسبت (OD ۲۶۰/۲۸۰)، خلوص RNA بیش از ۱/۹ مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین غلظت RNA در جذب نوری ۲۶۰ نانومتر، نیز محاسبه شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

Real Time RT-PCR

استخراج RNA:

تهیه cDNA:

برای سنتز cDNA از کیت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. ابتدا ۵ μL از RNA استخراج شده از سلول‌های آلوده به ویروس و کنترل سلول با استفاده از ۱ μL از آغازگر راندوم هگزامر و الیگو dT به میکرو تیوپ اضافه شد و به محلول فوق

برای بررسی تیتراژ عفونت‌زایی ویروس با روش Real Time PCR، در روز سوم بعد از آلودگی به ویروس HSV-1 بدون رقت و با رقت‌های ۱۰ برابری قبل و بعد از غیرفعال‌سازی با روش متیلن‌بلو و نورمرئی، استخراج RNA و ساخت cDNA، با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GAPDH* و گلیکوپروتئین D (GPD) برای ویروس HSV-1 انجام شد. براساس Ct های به دست آمده از رقت‌های مختلف نمودار منحنی استاندارد برای هر دو ژن مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس تجزیه و تحلیل رگرسیون نتایج برای slope و R^2 برای هر دو ژن به ترتیب $-3/15$ و $-3/2$ و $0/99$ و $0/99$ گزارش شد (شکل ۲). برای بررسی اختصاصی بودن آزمایش در واکنش PCR از melt curve analysis استفاده شد (شکل ۳).

برای هر رقت ویروسی سه تکرار انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار Rest بیان ژن گلیکوپروتئین D در مقابل ژن رفرانس محاسبه شد. میانگین چرخه آستانه ژن گلیکوپروتئین D در کشت سلول حاوی ویروس HSV-1 بدون غیرفعال‌سازی 5.0×10^7 TCID₅₀ /mL، برابر $22/6$ ($Ct=22/6$) و میانگین چرخه آستانه ژن گلیکوپروتئین D در نمونه پلاسما پس از غیرفعال‌سازی با روش متیلن‌بلو و نورمرئی 5.0×10^7 TCID₅₀ /mL، برابر 28 ($Ct=28$) بود، که کاهش معنادار بیان ژن گلیکوپروتئین D (5.0×10^7 TCID₅₀ /mL) مشاهده شد ($p=0/001$). بر اساس Ct های حاصله و نرم‌افزار Rest، بیان گلیکوپروتئین D در گروه کنترل (قبل از غیرفعال‌سازی) نسبت به گروه درمان (بعد از غیرفعال‌سازی)، ۱۵ برابر کاهش یافته بود ($p=0/001$).

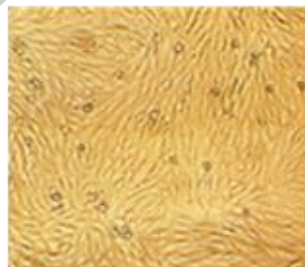
Master Mix؛ $5 \mu\text{L}$ از cDNA؛ $5 \mu\text{L}$ آغازگر Forward و $1 \mu\text{L}$ از آغازگر Revers و $9 \mu\text{L}$ از ddH₂O افزوده شد. پس از سانتریفیوژ کاپیلاری، داخل دستگاه lightCycler قرار داده شد. مطابق جدول زیر به دستگاه lightCycler برنامه داده شد.

جهت بررسی کارآیی تکثیر ژن‌ها با استفاده از رقت‌های سریالی از cDNA ژن‌های مورد مطالعه، رسم منحنی استاندارد انجام شد. برای این منظور سری رقت‌هایی از cDNA های نمونه مورد مطالعه تهیه شد. واکنش q PCR انجام شد و بر اساس تجزیه و تحلیل رگرسیون slope و R^2 برای هر دو ژن محاسبه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time PCR از نرم‌افزار REST استفاده شد. محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS-26 انجام شد و ضریب همبستگی پیرسون بین دو آزمایش محاسبه گردید.

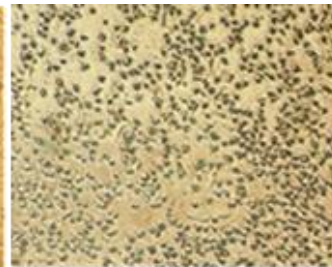
یافته‌ها

برای تعیین تیتراژ ویروس، سلول‌های vero با رقت‌های ۱۰ برابری از ویروس HSV-1 مجاور شده‌اند. اثر CPE، شامل گرد شدن سلول‌ها در مقابل سلول شاهد بدون مجاورت با ویروس با استفاده از میکروسکوپ اینورت مشاهده گردید و تیتراژ ویروس 5.0×10^7 TCID₅₀ /mL محاسبه شد (شکل ۱). پس از غیرفعال‌سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن‌بلو و نورمرئی، تیتراژ ویروس مجدد و ویروس قبل و بعد از غیرفعال‌سازی انجام شد. تیتراژ ویروس‌ها پس از غیرفعال‌سازی 5.0×10^7 TCID₅₀ /mL، محاسبه شد. کاهش لگاریتمی تیتراژ ویروس HSV-1؛ ۵ لوگ گزارش شد.

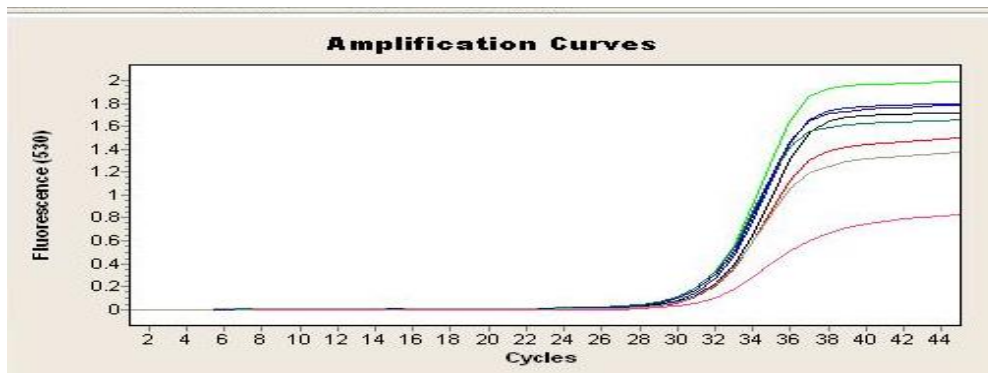
الف



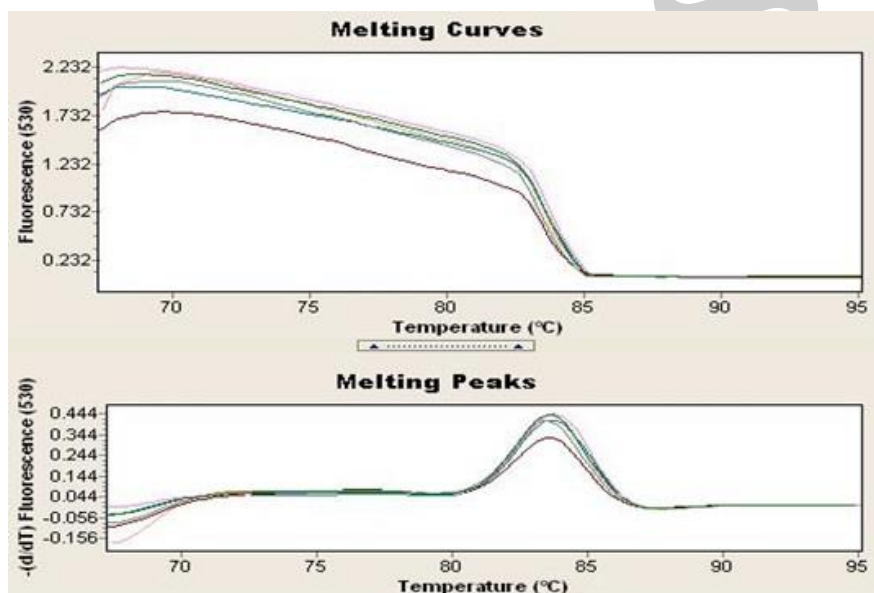
ب



شکل ۱: اثر CPE در کشت سلول با استفاده از میکروسکوپ معکوس. الف) سلول‌های vero را نشان می‌دهد که سلول‌های تک لایه بدون اثر تخریب سلولی و بدون مجاورت با ویروس و به عنوان سلول کنترل می‌باشد. ب) سلول‌های vero با رقت‌های ۱۰ برابری با ویروس هرپس مجاور شده‌اند و در میکروسکوپ معکوس آثار CPE که شامل گرد شدن سلول‌ها در مقابل سلول کنترل بدون مجاورت ویروس مشاهده گردید.



شکل ۲: نمودار تکثیر (Amplification) سه روز بعد از آلودگی سلول‌های vero با رقت‌های مختلف ویروس HSV-1 به عنوان کنترل ویروس بدون غیر فعال‌سازی با روش متیلن بلو و نور مرئی. محور عمودی شدت رنگ فلورسانس هر نمونه را در طول موج ۵۳۰ نانومتر نشان می‌دهد و محور افقی تعداد چرخه‌های هر نمونه که از خط آستانه عبور کرده و به صورت Ct گزارش می‌شود.



شکل ۳: نمودار melt curve analysis واکنش Real Time PCR جهت اختصاصی بودن واکنش. محور عمودی شدت رنگ فلورسانس هر نمونه را در طول موج ۵۳۰ نانومتر نشان می‌دهد و محور افقی دمای ذوب هر نمونه را نشان می‌دهد که برای تعیین اختصاصیت آمپلیکون‌ها در واکنش Real Time PCR استفاده شده است. جدا شدن دو رشته آمپلیکون‌ها از هم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد نشانه اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR می‌باشد.

همبستگی بین $qRT-PCR$ و $TCID_{50}/mL$:

ارتباط بین مقادیر Ct به دست آمده از هر رقت ویروسی با تیتراژ $TCID_{50}/mL$ (در مقیاس Log_{10} بررسی شدند. مقادیر Ct مرتبط به $qRT-PCR$ به دست آمده از غیر فعال‌سازی ویروس با تیتراژ $TCID_{50}/mL$ محاسبه شده پس از غیر فعال‌سازی طبق روش Reed-Muench، با یکدیگر همبستگی داشتند ($r=0.98$ ، $p<0.001$).

به دلیل استفاده از رنگ سایبرگرین در واکنش Real Time PCR و به علت اتصال غیر اختصاصی این رنگ به تمامی DNAهای دورشته‌ای، برای اطمینان از اختصاصی بودن واکنش از melt curve analysis استفاده شد (شکل ۳). واکنش RealTime-PCR، تا $TCID_{50}/mL$ ۵ لوگ کاهش بیان گلیکوپروتئین D (GPD) را در محیط کشت سلول‌های Vero پس از غیر فعال‌سازی ویروسی ($TCID_{50}/mL$)^۲ نشان داد.

بحث

برای کاهش بیشتر عفونت های منتقله از انتقال خون (TTIs)، ویروس زدایی یک راهبرد است. برای بررسی مؤثر بودن روش غیر فعال سازی ویروسی، از اثر CPE روی سلول های کشت شده استفاده می شوند. در روش سنتی برای تعیین کمیت تیترا عفونی، تیتراسیون نقطه پایانی و محاسبه دوز ۵۰ درصد آلوده کننده کشت بافت در هر میلی لیتر (TCID₅₀/mL) استفاده می شود که به عنوان "بار ذرات عفونی ویروسی در واحد حجم که قادر به ایجاد اثر سیتوپاتیک در نیمی از کشت های سلولی آلوده هستند" تعریف می شود (۱۶-۱۸). این فرآیند نیاز به دانش وسیع در زمینه تکثیر و نگهداری کشت سلولی دارد، پر زحمت است و به طور متوسط سه تا چهار روز طول می کشد تا تکمیل شود. علاوه بر این، عفونت سلولی باید در یک آزمایشگاه با سطح ایمنی زیستی مناسب انجام شود. با توجه به دلایل فوق، در شرایط خاص، تیتراسیون نقطه پایانی ممکن است به دلیل فقدان یکی از حداقل الزامات فوق الذکر، عملی نباشد. همچنین تنوع سیستم بیولوژیکی می تواند به راحتی بر نتایج تأثیر بگذارد و استاندارد سازی این نوع کمیت نیز دشوار است. در واقع، تنوع بیولوژیکی به دلیل دشواری در کشت تعداد یکسانی از سلول ها، افزودن مقدار یکسانی از ویروس و توقف هم زمان عفونت، زیاد است. استراتژی های تشخیص و تکثیر اسید نوکلئیک، یعنی RT-PCR ممکن است به تعیین کمی بار ویروسی یا نیمه کمی در نمونه مورد نظر به همان اندازه حساس منجر شود. روش های نیمه کمی و کمی از نظر دقت نتیجه ای که در پایان تجزیه و تحلیل به دست می آورند، متفاوت هستند. در روش های نیمه کمی (qRT-PCR)، شدت فلورسانس ساطع شده پس از هر چرخه تکثیر ثبت می شود تا مقدار نسبی هدف تعیین شود و مقادیر آستانه چرخه (Ct) که به این ترتیب به دست می آیند، با مقدار بار ویروسی نسبت معکوس دارند، اما نمی توان آن ها را مستقیماً به معادل های تعداد کپی ژنوم تبدیل کرد. تعیین کمی نسبی کپی های هدف با استفاده از qRT-PCR مستلزم تولید یک منحنی استاندارد است.

از آن جایی که شناسایی CPE ناشی از ویروس ها در کشت سلول طولانی مدت (۷-۵ روز) است و گاهی با تخریب سلول اشتباه می شود، بنابراین استفاده از روش های دیگر مانند Real Time RT-PCR در مقایسه با تکثیر ویروس هرپس بر روی سلول های VERO و مشاهده CPE با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه

سلول های VERO با میزان پرشدگی ۹۰٪ (Confluency) در مجاورت رقت های مختلف ویروس هرپس با ۸ رقت لگاریتمی در نمونه پلاسما حاوی ویروس قبل و بعد از غیر فعال سازی با روش متیلن بلو و نور مرئی قرار گرفت و تیترا ویروس با روش مشاهده CPE و Real Time RT-PCR مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه تیترا ویروس ۵۰ TCID₅₀/mL محاسبه شد. پس از غیر فعال سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن بلو و نور مرئی، تیتراسیون مجدد ویروس قبل و بعد از غیر فعال سازی انجام شد. تیترا ویروس ها پس از غیر فعال سازی ۵۰ TCID₅₀/mL محاسبه شد. کاهش لگاریتمی تیترا ویروس HSV-1؛ ۵ لوگ گزارش شد. در واکنش RealTime-PCR بر روی رقت های مختلف ویروس قبل و بعد از غیر فعال سازی در کشت سلول از ۵۰ TCID₅₀/mL ۱۰^۲ کاهش معنادار در مقادیر Ct و بیان گلیکوپروتئین (GPD) در محیط کشت سلول های Vero پس از غیر فعال سازی ویروسی یعنی ۵۰ TCID₅₀/mL لوگ را نشان داد که با نتایج روش ۵۰ TCID₅₀ مطابقت داشت. تأثیر غیر فعال سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن بلو و نور مرئی با مطالعه الیکایی و همکاران مطابقت داشت و بیشترین کاهش لگاریتمی برای HSV به مقدار ۶/۲۸، لوگ با زمان پرتو دهی ۴۵ دقیقه بود (۱۲).

همچنین در این مطالعه بین مقادیر Ct مرتبط به qRT-PCR به دست آمده از غیر فعال سازی ویروس با تیترا ۵۰ TCID₅₀/mL محاسبه شده پس از غیر فعال سازی ویروس با یکدیگر همبستگی داشتند که با مطالعه ای که بین دو روش qRT-PCR برای تعیین تعداد دقیق کپی های RNA ویروس کرونا سندرم حاد تنفسی ۲ (SARS-CoV-2) و تیتراسیون ویروس کرونا عفونی روی کشت های سلولی انجام شده بود موافقت داشت که نشان داده بودند بین بار نسخه های RNA (Ct) ویروسی و تیترا عفونی ویروس با دوز آلوده کننده کشت بافت در هر میلی لیتر (۵۰ TCID₅₀/mL)، همبستگی وجود داشته است (۱۱). از طرف دیگر، در مطالعه لوگان و همکاران نشان داده شد بین میزان گرانولوسیتی سلول که با روش فلوسایتومتری تعیین می شود با تیترا لگاریتمی ویروس عفونی ارتباط معناداری وجود دارد و شناسایی بدون فلورسنت غلظت ویروس عفونی از طریق فلوسایتومتری می تواند ابزار سریع و دقیق برای تعیین تیترا ویروس در نظر گرفته شود (۱۹).

در مطالعه گوستافسون و همکاران برای ارزیابی تیترا

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به تایید شورای تحصیلات تکمیلی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایران رسیده است.

عدم تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نقش نویسندگان

لیلا موسوی دهقانی: نگارش پایان نامه و انجام آزمایش‌ها
زهرا پاز: آموزش روش‌ها و کمک در اجرای آن
دکتر زهره شریفی: طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای پایان نامه و نگارش مقاله

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایران است. بدین‌وسیله از این مؤسسه به خاطر حمایت‌های مالی آن تشکر می‌شود.

ویروس هرپس انسانی ۶ (HHV-6)، با استفاده از روش‌های q-PCR و TCID₅₀، به خوبی بیان پروتئین‌های ویروسی با روش TCID₅₀ همبستگی داشت و از ویژگی بالایی برای تعیین دوز عفونی برخوردار بود (۱۰).

نتیجه‌گیری

داده‌های ما همبستگی قوی بین تیترا ویروس (۵۰/mL) TCID₅₀ با مقادیر Ct (بیان گلیکوپروتئین D) در روش qRT-PCR نشان داد. TCID₅₀/mL به دلیل تنوع استفاده از سیستم بیولوژیکی می‌تواند به راحتی بر نتایج تأثیر بگذارد و استانداردسازی این نوع کمیت را دشوار کند. روش‌های مولکولی مبتنی بر بیان گلیکوپروتئین D (gD mRNA) می‌تواند به عنوان یک هدف برای تشخیص عفونت فعال HSV مورد استفاده قرار گیرد.

حمایت مالی

این پروژه توسط مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین مالی شده است.

References:

- 1- Yao C-Y, Fu W-L. Biosensors for hepatitis B virus detection. *World Journal of Gastroenterology*: WJG. 2014;20(35):12485-92.
- 2- Wang YF, Pang DW, Zhang ZL, Zheng HZ, Cao JP, Shen JT. Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement. *Journal of medical virology*. 2003;70(2):205-11.
- 3- Quint Wv, Heijtkink R, Schirm J, Gerlich W, Niesters H. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(1):225-8.
- 4- Elikaei A, Hosseini S, Sharifi Z, Latifi H, Nikbakht H, Mirshafiee H, *et al*. Methylene blue based device for pathogen reduction in human plasma. *Iranian journal of pediatric hematology and oncology*. 2013;3(3):97-102.
- 5- Ryan KJ, Ray CG. *Medical microbiology: An introduction to infectious diseases*: McGraw-Hill; 2004.
- 6- Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current opinion in microbiology*. 2006;9(4):423-9.
- 7- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus research*. 2006;117(1):90-104.
- 8- Clarke RW. Forces and Structures of the Herpes Simplex Virus (HSV) Entry Mechanism. *ACS Infectious Diseases*. 2015;1(9):403-15.
- 9- Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS journal*. 2009;276(24):7228-36.
- 10- Gustafsson RK, Engdahl E, Fogdell-Hahn A. Development and validation of aQ-PCR based TCID₅₀ method for human herpesvirus 6. *Virology Journal* 2012; 9:311.
- 11- M Brandolini, F Taddei, MM Marino, L Grumiro, A Scalcione, ME Turba, *et al*. Correlating qRT-PCR, dPCR and Viral Titration for the Identification and Quantification of SARS-CoV-2: A New Approach for Infection Management. *Viruses*. 2021 May 28;13(6):1022.
- 12- A Elikaei, Z Sharifi, S M Hosseini, H Latifi, M K Musavi Hosseini. Inactivation of model viruses suspended in fresh frozen plasma using novel methylene blue based device. *Iran. J. Microbiol*. 2014; 6: 41-45.
- 13- Reed, L. J.; Muench, H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *Am. J. Epidemiol*. 1938; 27, 493-497.
- 14- Lei, C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Viol*. 202; 36(1), 141-144.
- 15- Zamanian M, Sharifi Z, Noormohammadi Z, Akbarzadeh T, Bineshian F. Antiviral effect of Artemisia aucheri aqueous extract on UL46 and US6 genes of HSV-1. *Antiviral Therapy*. 2021;26(1-2):43-48.
- 16- Stelzer-Braid, S, Walker G.J, Aggarwal A, Isaacs S.R, Yeang, M, Naing, Z, *et al*. Virus isolation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) for diagnostic and research purposes. *Pathology* 2020; 52: 760-763.

- 17- Lei, C.; Yang, J.; Hu, J.; Sun, X. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virology*. 2021; 36: 141–144.
- 18- Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier Sh, McMahon M, Meade P, *et al.* An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2020; 58: e108.
- 19- Logan M, Manalil J, Notte Ch, Kearse C, George S, Zeiser A, *et al.* A flow cytometric granularity assay for the quantification of infectious virus, *Vaccine*, 2019; 37: 7090-7099.

In Press