Original Article

Inactivation of HSV-1 Using Methylene Blue and Visible Light: Correlation of $TCID_{50}$ Reduction with Glycoprotein D RNA Expression by RT-qPCR

Leila Mousavi Dehaqani[1], Zahra Paz[2], Zohreh Sharifi[1]

[1]*Biological Products and Blood Safety Resaerch Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*Blood Transfusion Resaerch Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

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

http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.23.1.12

Citation:
Mousavi Dehaqani L, Paz Z, Sharifi Z. Inactivation of HSV-1 Using Methylene Blue and Visible Light: Correlation of $TCID_{50}$ Reduction with Glycoprotein D RNA Expression by RT-qPCR. J Iran Blood Transfus. 2026: 23 (1): 12-21

Correspondence: Sharifi Z, Associate professor of Biological Products and Blood Safety Resaerch 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 $TCID_{50}$ methods.

Materials and Methods

In a experimental study, vero cells were cultured in DMEM with 1% penicillin-streptomycin and 10% fetal calf serum at 37°C with 5% CO2. The virus thiter was determinded by infectivy 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 $TCID_{50}$ 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 $10^7 TCID_{50}$/mL. After inactivation with methylene blue and irradiation, the titer decreased to 10^2 $TCID_{50}$/mL, representing a 5-log reduction. The mean threshold cycle (Ct) of the glycoprotein D gene in cell cultures containing non-inactivated HSV-1 ($10^7 TCID_{50}$/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 (10^2 $TCID_{50}$/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 $TCID_{50}$ and Ct values obtained by qRT-PCR assay. Molecular methods based on glycoprotein D (gD mRNA) expression may be served as a usefull approach for detecting of active HSV infection.

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

Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۵ (۱۲-۲۱)

مقاله پژوهشی

غیرفعال‌سازی HSV-۱ با متیلن بلو و نور مرئی: همبستگی کاهش $TCID_{50}$ با بیان RNA گلیکوپروتئین D با روش RT-qPCR

لیلا موسوی دهاقانی[۱]، زهرا پاز[۲]، زهره شریفی[۳]

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

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

http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.23.1.12

Citation:
Mousavi Dehaqani L, Paz Z, Sharifi Z. Inactivation of HSV-1 Using Methylene Blue and Visible Light: Correlation of $TCID_{50}$ Reduction with Glycoprotein D RNA Expression by RT-qPCR. J Iran Blood Transfus. 2026: 23 (1): 12-21

نویسنده مسئول:
دکتر زهره شریفی. استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
E-mail: z.sharifi@tmi.ac.ir

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 غیرفعال‌سازی ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1)با استفاده از متیلن‌بلو و نور مرئی در پلاسما تمرکز دارد و اثربخشی غیر فعال‌سازی را با روش‌های qRT-PCR و $TCID_{50}$ مقایسه می‌کند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، 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 $TCID_{50}$ اندازه‌گیری شد. گروه کنترل شامل پلاسمای بدون ویروس، پلاسمای حاوی ویروس پرتودهی شده بدون متیلن‌بلو و پلاسمای حاوی متیلن‌بلو بدون پرتودهی بود. پس از استخراج RNA ازرقت‌ها و ساخت cDNA ، بیان گلیکوپروتئین D با qRT-PCR اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار گردید. در نهایت محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار ۲۶ SPSS انجام شد و ضریب همبستگی پیرسون بین دو آزمایش محاسبه گردید.

یافته‌ها

قبل از غیر فعال‌سازی، تیتر ویروس با مشاهده اثرات سیتوپاتیک در سلول‌های Vero به صورت $TCID_{50}/mL$ 10^{7} تعیین شد. پس از غیرفعال‌سازی با متیلن بلو و پرتودهی، تیتر به $TCID_{50}/mL$ 10^{2} کاهش یافت که نشان‌دهنده کاهش ۵ لگاریتمی است. میانگین چرخه آستانه (Ct) ژن گلیکوپروتئین D در کشت‌های سلولی حاوی HSV-1 غیرفعال نشده ($TCID_{50}/mL$ 10^{7})، 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 ($TCID_{50}/mL$ 10^{2})، ۲۸ (Ct= ۲۸)، بود . این نشان دهنده کاهش ۱۵ برابری در بیان گلیکوپروتئین D است (p= ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری

بین مقادیر لگاریتمی $TCID_{50}$ و مقادیر Ct به دست آمده از روش qRT-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: غیرفعال‌سازی ویروس ، ویروس هرپس سیمپلکس، متیلن بلو، نور مرئی، RT-PCR

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

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 (۳-۱). 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 ، HSV-1) به عنوان ویروس هرپس انسانی نوع یک و دو (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 تگو منت به کپسید متصل است و ذره کامل ویریون را تشکیل می‌دهد (۷، ۶). 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 هپاران سولفات سطح سلول متصل می‌شود. سپس گلیکوپروتئین gD حداقل به سه گیرنده اختصاصی شناخته شده متصل می‌گردد (۹). گلیکوپروتئین D (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، gD mRNA 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 ($TCID_{50}$)، انجام می‌شود. تعیین تیترهای 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 ($TCID_{50}$) آزمایش‌های تیتراسیون ویروس هستند که می‌توانند با بررسی اثرات سیتوپاتیک ویروس بر روی کشت سلولی میزبان تلقیح شده، برای تعیین کمیت تیترهای ویروس استفاده شوند. در سنجش‌های $TCID_{50}$، رقت‌های مختلف ویروس به جمعیت‌های سلولی میزبان با تعداد سلول یکسان اضافه شده و تا زمانی که اثر سیتوپاتیک مشاهده شود، انکوبه می‌شوند. مقدار $TCID_{50}$ 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 $TCID_{50}$ 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 کپی پایین امکان پذیر است (۱۱).

در این پژوهش برای بررسی مؤثر بودن روش غیر فعال‌سازی HSV-۱ به عنوان ویروس مدل ویروس‌های DNA دو رشته‌ای پوشش‌دار با روش متیلن‌بلو و نور مرئی از کشت سلول استفاده شد و تیتر عفونی ویروس با روش دوز عفونی ۵۰٪ کشت بافت ($TCID_{50}$) 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

که در تانک ازت آزمایشگاه ویروس‌شناسی موجود بود، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کرایو ویال پس از خروج از تانک 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 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ، 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 (10^{-1}-10^{-8}) 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 DMEM ۳۰۰ µL 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 Cytopathogenic Effects (CPE) به مدت ۷ روز بررسی شد و تیتر $TCID_{50}$ بر اساس روش Reed-Muench محاسبه شد.

پلاسمای تازه منجمد Fresh Frozen Plasma (FFP):

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

غیر فعال‌سازی 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 متیلن بلو 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 تیتر 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 فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

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	**Denaturation**	۹۵	۱۰ ثانیه	۴۵	**Quantification**
			۱۰ ثانیه		
	Annealing	۵۸	۲۵		
	Extension	۷۲	۰		
Melting Curve		۹۵	۰	۱	**Melting Curve**
		۶۵			
	Melting	۹۵	۰/۱ **Ramp Rate °C/sec**	**Continuouce**	
Cooling		۴۰	۳۰ ثانیه	۱	-

سپس کیسه خالی شده درون کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده شد. از هر نمونه سریال رقت ۱۰ تایی تهیه گردید. از هر رقت بر روی پلیت ۹۶ خانه‌ای برده شد و CPE سلول‌ها مورد بررسی قرار شد. به منظور بررسی اثر پرتودهی از نمونه‌های شاهد شامل پلاسمای فاقد ویروس بدون پرتودهی، پلاسما پرتو داده شده حاوی ویروس فاقد متیلن بلو، پلاسما همراه ویروس و متیلن بلو بدون پرتودهی استفاده گردید. تمامی آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار گردید. تیتراسیون ویروس پس از غیر فعال‌سازی در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد و کاهش تیتر ویروس با روش Reed-Muench محاسبه گردید (۱۴، ۱۳).

Real Time RT-PCR

استخراج RNA:

استخراج اسید نوکلئیک، با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت Roche) و مطابق با دستور کار شرکت سازنده انجام شد. حدود ۵ میلیون سلول در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ چاهکی کشت داده شد و نمونه‌ها قبل و بعد از پرتودهی به چاهک‌ها اضافه شدند. پس ازCPE ، 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 (۲۶۰/۲۸۰ OD)، خلوص RNA بیش از ۱/۹ مورد استفاده قرار گرفت . هم‌چنین غلظت RNA در جذب نوری ۲۶۰ نانومتر، نیز محاسبه و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه cDNA:

برای سنتز cDNA از کیت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. ابتدا µL ۵ از RNA استخراج شده از سلول‌های آلوده به ویروس و کنترل سلول با استفاده از µL ۱ از آغازگر راندوم هگزامر و الیگو dT به میکرو تیوپ اضافه و به محلول فوق µL ۴ از DEPC Water افزوده شد. مخلوط فوق ۵-۳ ثانیه سانتریفیوژ و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس ویال به Cool Box منتقل شد. سپس به محلول فوق µL ۱۰ از RT premix افزوده شد. برای سنتز cDNA ، مخلوط فوق به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد 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 می‌باشد:

HSV, Forward (5'-CATCACCGACCCGGAGAGGGAC),
HSV, Reverse (5'-GGGCCAGGCGCTTGTTGGTGTA) ,
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

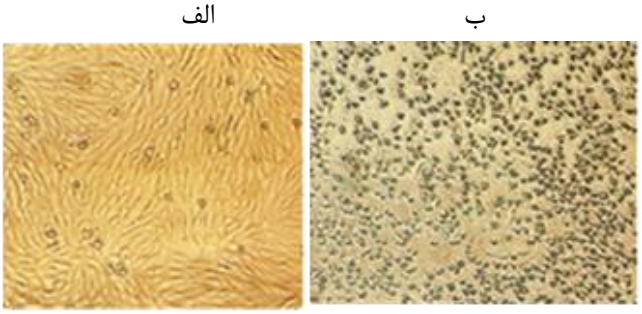
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]
[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

تعداد کلی رقت‌ها؛ تعداد مشخص مورد نیاز کاپیلاری LightCycler در داخل lightCycler Pre cooled 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 Master Mix؛ ۵ µL از cDNA؛ ۵ µL آغازگر Forward و ۱ µL از آغازگر Revers و ۹ µL از ddH_2o افزوده شد. پس از سانتریفیوژ کاپیلاری، داخل دستگاه lightCycler قرار داده شد. مطابق جدول به دستگاه lightCycler برنامه داده شد (جدول ۱).

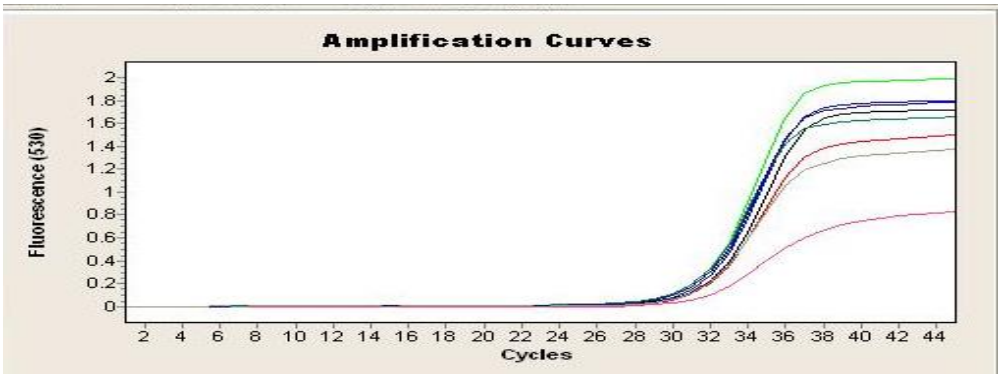
جهت بررسی کارآیی تکثیر ژن‌ها با استفاده از رقت‌های سریالی از cDNA ژن‌های مورد مطالعه، رسم منحنی استاندارد انجام شد. برای این منظور، سری رقت‌هایی از cDNA های نمونه مورد مطالعه تهیه شد. واکنش q PCR انجام شد و بر اساس تجزیه و تحلیل رگرسیون slope و R^2 برای هر دو ژن محاسبه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌های 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 تیتر 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 تیتر ویروس 10^7 $TCID_{50}$/mL محاسبه شد (شکل ۱).



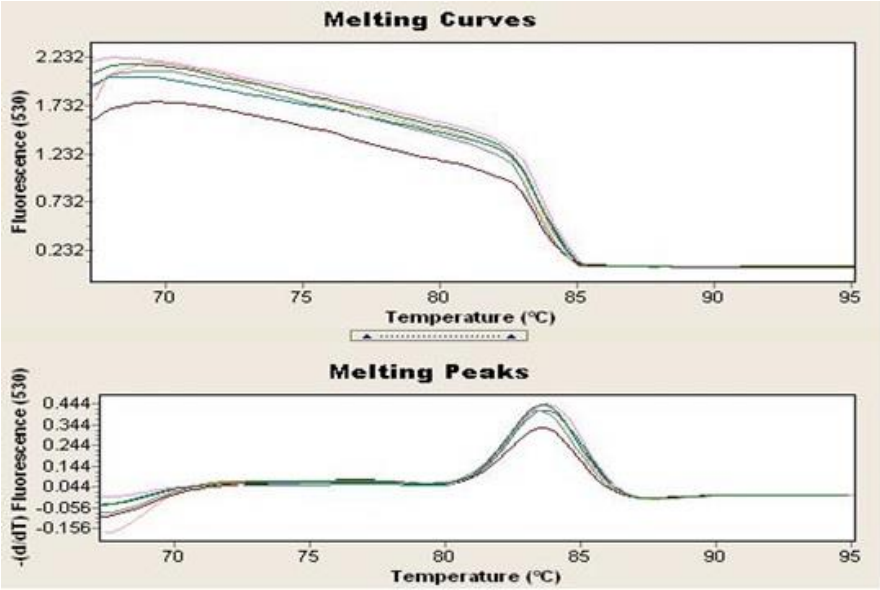
شکل ۱: اثر CPE در کشت سلول با استفاده از میکروسکوپ معکوس. الف) سلول‌های vero را نشان می‌دهد که سلول‌های تک لایه بدون اثر تخریب سلولی و بدون مجاورت با ویروس و به عنوان سلول کنترل می‌باشد. ب) سلول‌های vero با رقت‌های ۱۰ برابری با ویروس هرپس مجاور شده‌اند و در میکروسکوپ معکوس آثار CPE که شامل گرد شدن سلول‌ها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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]



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 واکنشReal Time PCR استفاده شده است. جدا شدن دو رشته آمپلیکون‌ها از هم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد نشانه اختصاصی بودن واکنشReal Time PCR می‌باشد.

پس از غیر فعال‌سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن‌بلو و نورمرئی، تیتراسیون مجدد ویروس قبل و بعد از غیر فعال‌سازی انجام شد. تیتر ویروس‌ها پس از غیر فعال‌سازی 10^{2} TCID $_{50}$/mL ، محاسبه شد. کاهش لگاریتمی تیتر ویروس HSV-1؛ ۵ لوگ گزارش شد.

برای بررسی تیتر 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 غیر فعال‌سازی با روش متیلن‌بلو و نورمرئی، استخراج RNA و ساخت cDNA ، با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *GAPDH* و گلیکوپروتئین D (GPD) برای ویروس HSV Real Time RT-PCR 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 ۳/۱۵- و ۳/۲- و ۹۹٪ و ۹۹/۵٪ 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 گلیکوپروتئینD در مقابل ژن رفرانس محاسبه شد. میانگین چرخه آستانه ژن گلیکوپروتئین D در کشت سلول حاوی ویروس HSV-1 بدون غیر فعال‌سازی (10^{7} TCID $_{50}$/mL)، برابر ۲۲/۶ (Ct= ۲۲/۶) و میانگین چرخه آستانه ژن گلیکوپروتئین D در نمونه پلاسما پس از غیر فعال‌سازی با روش متیلن‌بلو و نور مرئی (10^{2} TCID $_{50}$/mL)، برابر ۲۸ (Ct=۲۸) بود، که کاهش معنادار بیان ژن گلیکوپروتئین D (10^{2} TCID $_{50}$/mL) مشاهده شد (p= ۰/۰۰۱). بر اساس Ct های حاصله و نرم‌افزار Rest ، بیان گلیکوپروتئین D در گروه کنترل (قبل از غیر فعال‌سازی) نسبت به گروه درمان (بعد از غیر فعال‌سازی)، ۱۵ برابر کاهش یافته بود (p = ۰/۰۰۱).

به دلیل استفاده از رنگ سایبرگرین در واکنش Real Time PCR و به علت اتصال غیر اختصاصی این رنگ به تمامی DNA های دورشته‌ای، برای اطمینان از اختصاصی بودن واکنش از melt curve analysis استفاده شد(شکل ۳). واکنش Real Time-PCR ، تا 10^{-2} TCID $_{50}$/mL ۵ لوگ کاهش بیان گلیکوپروتئین D (GPD) را در محیط کشت سلول‌های Vero پس از غیر فعال‌سازی ویروسی (10^{-2} TCID $_{50}$/mL) نشان داد.

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

ارتباط بین مقادیر Ct به دست آمده از هر رقت ویروسی با تیتر 10^{2} TCID $_{50}$/mL (در مقیاس) Log ۱۰ بررسی شدند. مقادیر Ct مرتبط به qRT-PCR به دست آمده از غیر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]
[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

فعال‌سازی ویروس با تیتر TCID ۵۰/mL محاسبه شده پس از غیر فعال‌سازی طبق روش Reed-Muench ، با یکدیگر همبستگی داشتند (r= ۰/۹۸ ، p< ۰/۰۰۱).

بحث

برای کاهش بیشتر عفونت‌های منتقله از طریق خون (TTIs)، ویروس‌زدایی یک راهبرد است. برای بررسی مؤثر بودن روش غیر فعال‌سازی ویروسی، از اثر CPE روی سلول‌های کشت شده استفاده می‌شوند. در روش سنتی برای تعیین کمیت تیتر عفونی، تیتراسیون نقطه پایانی و محاسبه دوز ۵۰ درصد آلوده‌کننده کشت بافت در هر میلی‌لیتر (TCID ۵۰/mL) استفاده می‌شود که به عنوان "بار ذرات عفونی ویروسی در واحد حجم که قادر به ایجاد اثر سیتوپاتیک در نیمی از کشت‌های سلولی آلوده هستند" تعریف می‌شود (۱۸-۱۶). 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 می‌کشد 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 فوق‌الذکر، عملی نباشد. هم‌چنین تنوع سیستم بیولوژیکی می‌تواند به راحتی بر نتایج تأثیر بگذارد و استانداردسازی این نوع کمیت نیز دشوار است. در واقع، تنوع بیولوژیکی به دلیل دشواری در کشت تعداد یکسانی از سلول‌ها، افزودن مقدار یکسانی از ویروس و توقف هم‌زمان عفونت، زیاد است. استراتژی‌های 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. روش‌های نیمه کمی و کمی از نظر دقت نتیجه‌ای که در پایان تجزیه و تحلیل به دست می‌آورند، متفاوت هستند. در روش‌های نیمه کمی (qRT-PCR)، شدت فلورسانس ساطع شده پس از هر چرخه تکثیر ثبت می‌شود تا مقدار نسبی هدف تعیین شود و مقادیر آستانه چرخه (Ct) که به این ترتیب به دست می‌آیند، با مقدار بار ویروسی نسبت معکوس دارند، اما نمی‌توان آن‌ها را مستقیماً به معادل‌های تعداد کپی ژنوم تبدیل کرد. تعیین کمی نسبی کپی‌های هدف با استفاده از qRT-PCR مستلزم تولید یک منحنی استاندارد است.

از آن جایی که شناسایی CPE ناشی از ویروس‌ها در کشت سلول طولانی مدت (۷-۵ روز) است و گاهی با تخریب سلول اشتباه می‌شود، بنابراین استفاده از روش‌های دیگر مانند Real Time RT-PCR در مقایسه با تکثیر ویروس هرپس بر روی سلول‌های VERO و مشاهده CPE با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه سلول‌های VERO با میزان پرشدگی ۹۰٪ (Confluency) در مجاورت رقت‌های مختلف ویروس هرپس با ۸ رقت لگاریتمی در نمونه پلاسما حاوی ویروس قبل و بعد از غیر فعال‌سازی با روش متیلن‌بلو و نور مرئی قرار گرفت و تیتر ویروس با روش مشاهده CPE و Real Time RT-PCR مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه تیتر ویروس 10^7 $TCID_{50}/mL$ محاسبه شد. پس از غیر فعال‌سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن‌بلو و نورمرئی، تیتراسیون مجدد ویروس قبل و بعد از غیر فعال‌سازی انجام شد. تیتر ویروس‌ها پس از غیر فعال‌سازی 10^2 $TCID_{50}/mL$ محاسبه شد. کاهش لگاریتمی تیتر ویروس HSV-1؛ ۵ لوگ گزارش شد. در واکنش RealTime-PCR بر روی رقت‌های مختلف ویروس قبل و بعد از غیر فعال‌سازی در کشت سلول از 10^2 $TCID_{50}/mL$ کاهش معنادار در مقادیر Ct و بیان گلیکوپروتئین D (GPD) در محیط کشت سلول‌های Vero پس از غیر فعال‌سازی ویروسی یعنی ۵ TCID ۵۰/mL لوگ را نشان دادکه با نتایج روش TCID ۵۰ مطابقت داشت. تاثیر غیر فعال‌سازی ویروس HSV-1 با روش متیلن‌بلو و نور مرئی با مطالعه الیکایی و همکاران مطابقت داشت و بیشترین کاهش لگاریتمی برای HSV به مقدار ۶/۲۸ ، لوگ با زمان پرتودهی ۴۵ دقیقه بود (۱۲).

هم‌چنین در این مطالعه بین مقادیر Ct مرتبط به qRT-PCR به دست آمده از غیر فعال‌سازی ویروس با تیتر TCID ۵۰/mL محاسبه شده پس از غیر فعال‌سازی ویروس با یکدیگر همبستگی داشتند که با مطالعه‌ای که بین دو روش qRT-PCR برای تعیین تعداد دقیق کپی‌های RNA ویروس کرونا سندرم حاد تنفسی ۲ (SARS-CoV-2) و تیتراسیون ویروس کرونا عفونی روی کشت‌های سلولی انجام شده بود، موافقت داشت که نشان داده بودند بین بار نسخه‌های RNA (Ct) ویروسی و تیتر عفونی ویروس با دوز آلوده‌کننده کشت بافت در هر میلی‌لیتر (TCID ۵۰/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 می‌شود با تیتر لگاریتمی ویروس عفونی ارتباط معناداری

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

وجـود دارد و شناسـایی بـدون فلورسـنت غلظـت ویـروس عفونی از طریق فلوسایتومتری می‌تواند ابزار سـریع و دقیـق برای تعیین تیتر ویروس در نظر گرفته شود (۱۹).

در مطالعـه گوستافسـون و همکاران بـرای ارزیابی تیتر ویروس هرپس انسانی ۶ (HHV-6)، با استفاده از روش‌های q-PCR و $TCID_{۵۰}$، به خوبی بیان پروتئین‌های ویروسی بـا روش $TCID_{۵۰}$ همبستگی داشت و از ویژگـی بـالایی بـرای تعیین دوز عفونی برخوردار بود (۱۰).

نتیجه‌گیری

داده‌های ما همبستگی قوی بـین تیتـر ویـروس ($TCID_{۵۰}$/mL) با مقادیر Ct (بیان گلیکوپروتئینD) در روش qRT-PCR نشان داد. $TCID_{۵۰}$/mL بـه دلیـل تنـوع اسـتفاده از سیستم بیولوژیکی می‌تواند به راحتی بر نتایج تأثیر بگـذارد و استانداردسازی این نوع کمیت را دشـوار کنـد. روش‌هـای مولکولی مبتنـی بـر بیـان گلیکـوپروتئین D (gD mRNA) می‌تواند به عنوان یک هدف بـرای تشـخیص عفونـت فعـال HSV مورد استفاده قرار گیرد.

حمایت مالی

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

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به تایید شورای تجصیلات تکمیلـی مؤسسـه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایران رسیده است.

عدم تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نقش نویسندگان

لیلا موسوی دهاقانی: نگارش پایان نامه و انجـام آزمایش‌هـا
زهرا پاز: آموزش روش‌ها و کمک در اجرای آن
دکتر زهره شریفی: طراحـی مطـالعـه، نظـارت بـر اجـرای پایان نامه و نگارش مقاله

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامـه کارشناسـی ارشـد زیسـت فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایـران است. بدیـن‌وسیلـه از ایـن مـؤسسه به خـاطر حمایت‌هـای مالی آن تشکر می‌شود.

References:

1- Yao C-Y, Fu W-L. Biosensors for hepatitis B virus detection. World J Gastroenterol. 2014; 20(35): 12485-92. [DOI:10.3748/wjg.v20.i35.12485] [PMID] []
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. J Med virol. 2003; 70(2): 205-11. [DOI:10.1002/jmv.10379] [PMID]
3- Quint WG, Heijtink RA, Schirm J, Gerlich WH, Niesters HG. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection. J Cli Microbiol. 1995; 33(1): 225-8. [DOI:10.1128/jcm.33.1.225-228.1995] [PMID] []
4- Elikaei A, Hosseini SM, Sharifi Z, Latifi H, Nikbakht H, Mirshafiee H, et al. Methylene blue based device for pathogen reduction in human plasma. Iran J Ped Hematol Oncol. 2013; 3(3): 97-102.
5- Ryan KJ, Ray CG. Medical microbiology: An introduction to infectious diseases: McGraw-Hill; Medical Publishing Division.2004.4th edition.
6- Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(4): 423-9. [DOI:10.1016/j.mib.2006.06.013] [PMID]
7- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. Virus research. 2006; 117(1): 90-104. [DOI:10.1016/j.virusres.2006.01.002] [PMID]
8- Clarke RW. Forces and Structures of the Herpes Simplex Virus (HSV) Entry Mechanism. ACS Infectious Diseases. 2015; 1(9): 403-15. [DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00059] [PMID]
9- Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. FEBS J. 2009; 276(24): 7228-36. [DOI:10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x] [PMID] []
10- Gustafsson RK Engdahl E, Fogdell-Hahn A. Development and validation of aQ-PCR based TCID50 method for human herpesvirus 6. Virol J. 2012; 9: 311. [DOI:10.1186/1743-422X-9-311] [PMID] []
11- Brandolini M, Taddei F , Marino MM , Grumiro L , Scalcione A , Turba ME, 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 ; 13(6):1022. [DOI:10.3390/v13061022] [PMID] []
12- Elikaei A, Sharifi Z, Hosseini SM, Latifi H, Musavi Hosseini MK. Inactivation of model viruses suspended

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]
[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]

in fresh frozen plasma using novel methylene blue based device. Iran J Microbiol. 2014; 6: 41-5.
13- Reed LJ, Muench H. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. Am J Epidemiol. 1938: 27, 493-7. [DOI:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408] []
14- Lei C ,Yang J , Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity. Virol Sin. 2021: 36(1), 141- 4. [DOI:10.1007/s12250-020-00230-5] [PMID] []
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. Antivir Ther. 2021; 26(1-2): 43-8. [DOI:10.1177/13596535211039907] [PMID]
16- Stelzer-Braid S, Walker GJ, Aggarwal A, Isaacs SR, 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: 760-3. [DOI:10.1016/j.pathol.2020.09.012] [PMID] []
17- Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity. Virol Sin. 2021; 36: 141-4. [DOI:10.1007/s12250-020-00230-5] [PMID] []
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(10): e108. [DOI:10.1002/cpmc.108] [PMID] []
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(47): 7090- 9. [DOI:10.1016/j.vaccine.2019.02.059] [PMID]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.12]