

Comparison of Rotavirus RF Strain and HSV-1 Titration by CCID50% and Plaque Assays

Ali Teimoori¹, Hoorieh Soleimanjahi^{2*}, Farzaneh Pourasgari³

1- Ph.D. Candidate, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: soleim_h@modares.ac.ir*

Received: 28/Jan/2012, Accepted: 12/Jun/2012

Abstract

Objective: Titration of viruses is important to determine the quantity of virus in vaccine development, master virus seed stock preparation, viral vector studies and virus replication. In this study, we compared the CCID50% and plaque assay as a standard titration method for rotavirus (RF) and HSV-1.

Methods: The MA104 and Vero cells were inoculated by RF and HSV-1 in 6- and 96-well plates. Following infection and adsorption, the optimal time for the cytopathic effect caused by the viruses was noted and the results compared.

Results: The CPE (Cytopathic Effect) of RF was observed in less than 18 hours, which increased until 72 hours after inoculation. In HSV-1, the CPE was observed 24 and 72 hours after inoculation. The virus titration in the plaque assay was monitored at 96 hours post-infection for RF and at 72 hours post-infection for HSV-1. In both viruses the plaque titer method was lower than the CCID50 method, since the results indicated that 1 CCID50% was equal to 0.7 PFU.

Conclusion: The plaque assay is one of the most accurate methods for viral titration. For the plaque assay, individual lesions may be isolated, which the plaques can be counted. The CCID50% method is not applicable for purification of homogenous viruses, nor is this technique reproducible.

Keywords: CCID50%, Plaque Assay, Rotavirus, HSV-1

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 35-45

مقایسه تیتراسیون روتاویروس گاوی سویه RF و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ با دو روش پلاک و CCID50%

علی تیموری^۱، حوریه سلیمان جاهی^{۲*}، فرزانه پورعسگری^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی

Email: soleim_h@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۰۹

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۳/۲۳

چکیده

هدف: با توجه به اینکه تیتراسیون ویروس در تعیین دوز واکسن، تهیه بذر ویروسی، تکثیر ناقل های ویروسی و مطالعات تکثیری دارای اهمیت است؛ بنابراین در این مطالعه تیترا ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ و روتاویروس با دو روش مرسوم CCID50% و پلاک به عنوان روش استاندارد مقایسه شده است.

مواد و روش ها: سلول های MA104 و Vero به ترتیب برای کشت روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ تهیه و در پلیت ۶ و ۹۶ خانه ای پاساژ داده شدند. بعد از تلقیح و جذب ویروس در سلول زمان بهینه بررسی آثار تخریب سلولی و نتایج محاسبه آن برای هر ویروس در دو روش ثبت شد. نتایج حاصل از دو روش برای هر ویروس به صورت جدا با هم مقایسه شد.

نتایج: شروع آثار تخریب سلولی با روش CCID50% در روتاویروس در کمتر از ۱۸ ساعت شروع و تا ۷۲ ساعت به اوج خود می رسد در حالی که در HSV-1 تغییرات حاصل از تخریب سلول بعد از ۲۴ ساعت شروع و تا ۷۲ ساعت ادامه می یابد. در روش پلاک آثار تخریب به صورت پلاک بعد از ۹۶ ساعت در مورد روتاویروس ظاهر و برای ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ این زمان حدود ۷۲ ساعت است. در هر دو ویروس، پلاک تیتری پایین تر از CCID50% را نشان داد که به صورت « $1\text{CCID50\%} = 0.7\text{ PFU}$ » گزارش می شود.

نتیجه گیری: روش پلاک یکی از دقیق ترین روش ها در تعیین تیترا ویروسی است. در روش پلاک امکان جداسازی یک پلاک و به دست آوردن ویروس خالص ژنتیکی وجود دارد. اما در CCID50% این امکان فراهم نیست. از معایب CCID50% عدم تکرارپذیری در نتایج تیتراسیون ویروسی نسبت به ارزیابی پلاک است.

کلیدواژگان: CCID50%，روش پلاک، روتاویروس، هرپس ویروس

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۳۵-۴۵

مقدمه

زیست شناسی مولکولی و زیست شناسی سلولی تقسیم بندی نمود.

در زمان تکثیر ویروس در سلول، تعدادی از تغییرات بیوشیمیایی و ریخت شناسی ایجاد می شود که این تغییرات در

روش های آزمایشگاهی زیادی برای تشخیص ویروس ها

وجود دارد که می توان آن ها را به روش هایی براساس

تیتراسیون روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱

ویروس می‌تواند به عنوان واحد شکل دهنده پلاک (Plaque Forming Unit: PFU) در هر میلی‌لیتر بر طبق رقت نمونه و تعداد پلاک محاسبه شود. برای جلوگیری از اشتباه در تعیین تیتراژ ویروس از رقت‌های پشت سر هم نمونه ویروسی در آزمون پلاک استفاده می‌شود. در این حالت تنها رقتی که سبب ایجاد ۲۰ تا ۱۰۰ پلاک بر حسب نوع و اندازه فلاسک در کشت سلولی شده باشد قابل ارزیابی است. آزمون پلاک تنها در مورد ویروس‌هایی قابل استفاده است که توانایی ایجاد اثر تخریب سلولی را داشته باشند [۱، ۵].

در رابطه با آزمون کمی CCID₅₀% (دوز عفونی کننده کشت سلول ۵۰ درصد: Cell Culture Infectious Dose 50%) کشت‌های سلولی توسط رقتی از ویروس آلوده می‌شود و میزان تیتراژ ویروسی که می‌تواند ۵۰ درصد سلول‌های کشت را آلوده کند توسط این آزمون قابل محاسبه است. در مطالعه حاضر رقت‌های مختلف پشت سر هم (سریال) از نمونه ویروس تهیه شد و سپس از هر رقت برای آلوده نمودن چندین کشت سلول استفاده شد. در نهایت رقتی از ویروس که توانایی آلوده نمودن ۵۰ درصد از کشت‌های سلولی را داشت با استفاده از فرمول رید-مونس (Reed-Muench Method) محاسبه شد [۳، ۵، ۶].

دو آزمون پلاک و CCID₅₀% از مهم‌ترین روش‌هایی است که برای تعیین تیتراژ ویروس استفاده می‌شود. هر دوی این روش‌ها مبتنی بر تغییرات تخریب سلولی ناشی از تکثیر ویروس در سلول حساس است. نکته مهم آن است که در این روش‌ها تیتراژ ویروس عفونی اندازه‌گیری می‌شود اما در روش‌های فیزیکی مثل میکروسکوپ الکترونی، هم‌آگلوتیناسیون (Hemagglutination) و روش‌های ایمونولوژیکی تمام ذرات عفونی و غیر عفونی ویروسی تیتراژ می‌شود؛ اما بین این دو روش، روش پلاک یکی از دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش‌های تعیین تیتراژ ویروس است [۱، ۷]. یکی از مزیت‌های مهم پلاک آن است که می‌توان ویروس را خالص و یک جمعیت مشخص ویروسی را جدا و روی آن جمعیت جدا شده مطالعه کرد. در روش پلاک تعداد پلاک‌ها یا تعداد واحدهای تشکیل دهنده

نهایت با مرگ سلول همراه است [۱]. این تغییرات ریخت‌شناسی به آثار تخریب سلولی (Cytopathic Effect: CPE) ویروس اشاره دارد. دیدن آثار تخریب سلولی به عنوان یک روش اصلی برای شناسایی عفونت برخی از ویروس‌ها در کشت سلول و شامل تغییرات ریخت‌شناختی درون سلولی حاصل از تکثیر ویروس در کشت سلول است. این تغییرات ریخت‌شناختی ناشی از آلودگی سلول با ویروس شامل گرد شدگی، چروکیدگی، تورم، افزایش درخشندگی، ادغام سلول‌ها با یکدیگر، تجمع، از دست رفتگی چسبندگی و کنده شدن از سطح فلاسک و لیز سلولی است. این تغییرات برای یک ویروس تکرارپذیر بوده و در نتیجه از آن می‌توان برای شناسایی ویروس استفاده کرد. اگر چه آثار تخریب سلولی به عنوان نماد تکثیر ویروس در کشت‌های سلولی است ولی این اثر توسط همه ویروس‌ها ایجاد نمی‌شود [۱، ۲].

آزمون‌های کمی ویروس‌شناسی مثل آزمون پلاک از آزمون‌های زیست‌شناسی محسوب شده و بر خلاف آزمون‌های فیزیکی به عنوان آزمون بررسی عفونت‌زایی ویروس در کشت سلول است. در آزمون پلاک کشت تک لایه سلولی با ویروس آلوده و انکوبه شده تا به ویروس اجازه جذب شدن به سلول‌ها داده شود و سپس با یک محیط مغذی شامل آگار پوشانده می‌شود. سلول‌های آلوده شده با ویروس می‌توانند ویروس‌های ذره ویروسی را آزاد کنند که در نتیجه حضور آگار انتشار ویروس‌های جدید تنها به سلول‌های مجاور محدود می‌شود. در نتیجه هر ذره ویروسی تنها یک ناحیه از سلول‌های آلوده به نام پلاک را ایجاد می‌کند [۱، ۳، ۴]. پلاک‌های بزرگ با چشم غیر مسلح قابل مشاهده است. در آزمون پلاک برای دیدن مرز بین پلاک و سلول‌های تک لایه اطراف از رنگ‌های حیاتی مثل نوترال رد (Neutral Red) استفاده می‌شود که در نتیجه آن سلول‌های زنده رنگ را جذب می‌کنند و پلاک‌های روشن حاصل از تکثیر ویروس از زمینه رنگ قرمز یا ارغوانی، شامل سلول‌های زنده و غیر آلوده متمایز می‌شوند [۵]. از آنجایی که یک ذره ویروسی برای ایجاد یک پلاک کافی است بنابراین تیتراژ

پلاک یا PFU در هر سوسپانسیون ویروسی یکسان است. بر خلاف روش پلاک، در روش CCID50% ویروس به سلول کشت داده شده در محیط مایع در پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه می‌شود. بنابراین هر چاهک بیانگر یک سلول تک در مقایسه با روش پلاک است. هدف این روش پیدا کردن مقداری از تیترو ویروس است که باعث پاسخ ۵۰ درصدی در چاهک‌ها می‌شود. در روش کشت سلول این مقدار به عنوان CCID50% در نظر گرفته می‌شود. در تعریف دوز ۵۰ درصدی مثل دوز عفونی کننده کشت سلول ۵۰ درصد (CCID50%) یا دوز کشنده ۵۰ درصد (Lethal Dose 50%:LD50%) و غیره اندازه‌گیری می‌شود، در واقع میزانی از دارو یا ویروس که باعث تغییرات مرگ یا تخریب سلولی در ۵۰ درصد موارد می‌شود را بیان می‌کند. در حالت ۵۰ درصدی تغییرات یا مرگ با تغییرات اندک در دوز یا مقدار دارو یا ویروس، تغییرات قابل توجهی در پاسخ دیده می‌شود در حالی که در تغییرات مرگ یا تخریب سلولی ۱۰ یا ۹۰ درصدی این تغییر دوز تأثیر اندکی در پاسخ دارد؛ بنابراین زمانی که نمودار دوز/پاسخ رسم می‌شود به صورت سیگموییدی در می‌آید که در آن نمودار تغییرات ۵۰ درصد بهترین نتایج را نشان می‌دهد. به همین دلیل از روش ۵۰ درصدی استفاده می‌شود [۷، ۸]. در روش CCID50% برای محاسبه تیترو ویروسی در نمونه اصلی (رقیق نشده) از روش Reed-Muench استفاده می‌شود [۶]. نکته مهم آن‌که خیلی از محققین از روش CCID50% برای تیتراسیون ویروس استفاده می‌کنند غافل از آن که مقادیر گزارش شده براساس آن تا حدودی بالاتر از تیترو ویروسی براساس روش پلاک است. در منابع معتبر این تفاوت را به صورت «۰/۷ PFU = 1CCID50%» گزارش می‌کنند که ناشی از توزیع پواسن (Poisson) در CCID50% است [۵]. در تعدادی از مطالعات که برای این هدف انجام شده نتایج از آنچه که فرض شده متفاوت بوده است که ناشی از ویژگی محاسباتی در روش CCID50% و خطای ناشی از مشاهدات محققین مختلف در مشاهده آثار تخریب سلولی است. هدف از بررسی حاضر

مقایسه دو روش CCID50% و پلاک در دو ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (Herpes Simplex Type1: HSV-1) و روتاویروس گاوی (Bovine Rotavirus) سوش RF است و ارایه تفاوت بین تیترو گزارش شده براساس این دو روش مورد بحث قرار گرفته است. همچنین در این مطالعه تفاوت آن با استاندارد گفته شده در مقالات نیز نشان داده شده است. امروزه ناقلین ویروسی (Viral Vector) به صورت تجاری توسط بسیاری از محققین برای انجام مطالعات استفاده می‌شود که انجام تیتراسیون برای به دست آمدن مقدار مشخص ویروس ضروری است. همچنین دانستن تیترو فاژ که بتواند مقدار مشخصی DNA به ازای ۱ میلی‌لیتر محیط کشت تولید نماید الزامی است. در این روش که اول بار برای باکتریوفاژها ابداع شد، نمونه‌ای از باکتریوفاژ را با باکتری میزبان و آگار ذوب شده مخلوط می‌کنند؛ سپس این مخلوط را در پلیت ریخته تا به صورت یک لایه سفت شود. هر ذره ویروسی یک باکتری را آلوده کرده و در درون آن تکثیر یافته و پس از پاره شدن دیواره باکتری صدها ویروس تازه از آن‌ها رها می‌شود. در رقت‌های مختلف تعداد این پلاک‌ها و تراکم آن‌ها متفاوت است. با شمارش تعداد پلاک‌ها در سطح ظرف و تقسیم کردن عدد حاصل بر میزان رقت فاژ، میزان PFU برای نمونه‌های فاژ محاسبه می‌شود. امروزه از این روش در دنیا برای سنجش تیترو فاژ لایتیک (Lytic Phage) و در فاژ درمانی و نیز بررسی تأثیر بیان رونوشت‌های ویروسی و راه‌اندازی آزمایش‌های ویروس‌شناسی و بالاخره برای بررسی آثار ضد ویروسی (Virucidal) عصاره‌های گیاهی استفاده می‌شود؛ بنابراین راه‌اندازی و دانستن اصول پایه پلاک در تیتراسیون ضروری است [۹، ۱۰].

مواد و روش‌ها

کشت سلول

در مطالعه حاضر سلول MA-104 برای کشت روتاویروس

تیتراسیون روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱

ویروس اضافه شد و برای هر رقت ۸ تکرار گذاشته شد. برای جذب ویروس به سلول، پلیت‌ها یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. بعد از گذشت زمان لازم، مایع حاوی ویروس از روی سلول‌ها برداشت و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها در گرمخانه نگهداری شد.

انجام روش پلاک

سلول‌های کشت داده شده در پلیت ۶ خانه‌ای بعد از ۲ روز به ۱۰۰ درصد تلاقی رسیدند. سلول‌ها ۲ بار با PBS گرم شستشو داده شدند و به هر چاهک یک رقت از ویروس اضافه شد. رقت‌های ویروسی به صورت ۱۰ برابری در محیط کشت بدون سرم تهیه شدند. نکته مهم این‌که هر استوک ویروسی از یک شماره پاساژ یکسان برداشت شده و شرایط تیتراسیون در دو روش از نظر پاساژ ویروسی یکسان بود. بعد از اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از هر رقت ویروسی، سلول‌ها به گرمخانه منتقل شد و تا اتمام زمان جذب ویروس هر ۱۵ دقیقه یک بار پلیت‌ها جلو و عقب شده تا ویروس در سراسر سلول توزیع شود و پلاک‌های مجزا تشکیل شود. بعد از یک ساعت ویروس تلقیح شده برداشت شد و آگار ۲ درصد ذوب شده با یک حجم محیط کشت DMEM 2X گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) مخلوط و روی سلول‌ها ریخته شد. در مورد روتاویروس تریپسین به میزان ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به این مخلوط اضافه شد. برای بسته شدن آگار سلول‌ها ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس سلول‌ها به انکوباتور منتقل شد و تا ۷۲ ساعت در مورد هرپس ویروس و ۹۶ ساعت در مورد روتاویروس انکوباسیون ادامه یافت.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها برای مشاهده پلاک با

استفاده از نوترال رد

شرایط بهینه رنگ‌آمیزی برای مشاهده پلاک استفاده از

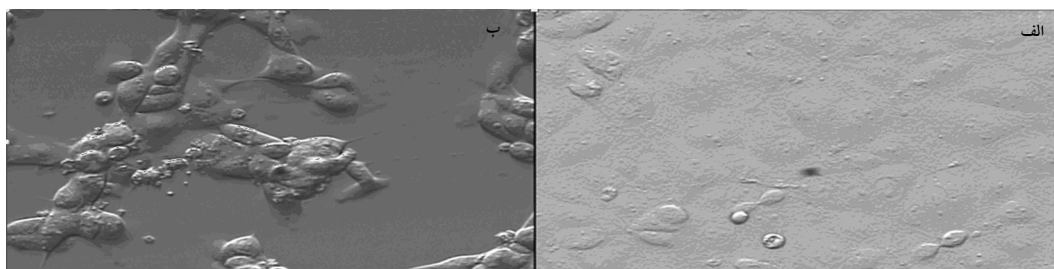
سویه گاوی RF استفاده شد. این سلول از کلیه میمون رزوس ماکاک (*Rhesus macaque*) گرفته شده و از نوع سلول‌های پوششی است. این سلول از بانک سلول انستیتو پاستور ایران دریافت شد (شکل ۱ الف) و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco، آمریکا) حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسن (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و FBS (Fetal Bovine Serum) (۱۰ درصد کشت داده شد. برای انجام CCID50% سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای و برای روش پلاک در پلیت کشت سلول ۶ خانه‌ای (Falcon) به میزان 5×10^4 سلول در هر میلی‌لیتر (۱۰۰ میکرولیتر) از محیط کشت پاساژ داده شدند و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO₂ قرار داده شدند. بعد از مدت ۴۸ ساعت سلول‌ها به ۱۰۰ درصد تلاقی (Confluency) رسیدند و برای کشت ویروس آماده شدند. سلول Vero مورد استفاده در مطالعه حاضر از بانک سلول انستیتو پاستور ایران تهیه شد (شکل ۲ الف). شرایط کشت این سلول نیز مانند سلول MA-104 بود. این سلول برای رشد HSV-1 مناسب است. ویروس در این سلول‌ها آثار تخریب سلولی خوبی ایجاد می‌کند. سلول Vero از کلیه میمون سبز افریقایی گرفته شده و از نوع سلول‌های فیروبلاستی است.

انجام روش CCID50%

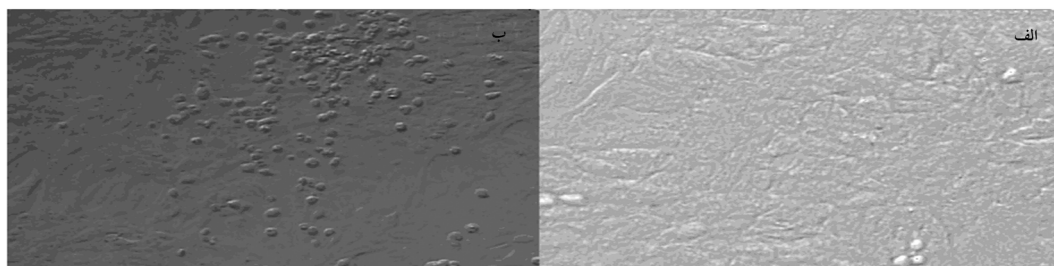
بعد از ذوب کردن بذر ویروس RF و HSV-1 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، رقت‌های ۱۰ برابری از ویروس با محیط کشت تهیه شد. برای فعال کردن روتاویروس از تریپسین (Pancreatic Trypsin Porcine Type IX) (Sigma، آلمان) با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس برای هر یک از ویروس‌ها تا 10^{-9} رقت‌سازی انجام شد [۱۱]. سلول‌ها با PBS ۳۷ درجه سانتی‌گراد دو بار شستشو داده شدند و سپس به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ۵۰ میکرولیتر از هر رقت

روی لایه اول آگار، لایه دوم آگار ریخته شد. سپس بعد از ۱۵ دقیقه پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شد. هر چند بعد از ۸ ساعت پلاک‌ها ظاهر می‌شود اما این پلاک‌ها در صورتی که در مجاورت نور قرار نگیرند تا ۴۸ ساعت قابل مشاهده هستند.

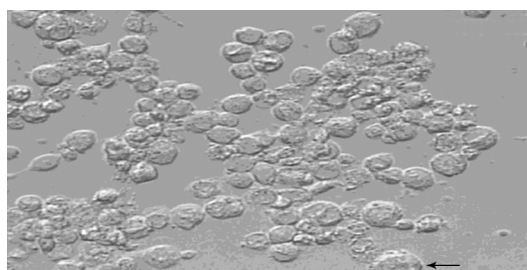
مخلوط محیط کشت DMEM 2X، آگار کشت سلول ۲ درصد و رنگ نوترال رد است. برای استفاده از رنگ از رقت ۱/۱۵۰۰۰ نوترال رد با غلظت ۰/۱ درصد استفاده شد. این میزان رنگ با استفاده از چند رقت بهینه شد و بهترین نتیجه در این رقت مشاهده شد. بعد از ساخت این ترکیب



شکل ۱ الف) وضعیت طبیعی سلول MA104 با تلاقی کامل را نشان می‌دهد. این وضعیت سلول برای آلوده کردن آن با ویروس برای روش‌های ۵۰٪ CCID و پلاک مناسب است. **ب)** وضعیت سلول با ضریب آلودگی بیشتر ناشی از رشد روتاویروس گاوی را نشان می‌دهد سلول چروکیده شده و بعضی مناطق کنده شده از سطح فلاسک دیده می‌شود (بزرگنمایی: ۲۰۰×).



شکل ۲ الف) وضعیت طبیعی سلول Vero را نشان می‌دهد. این سلول‌ها با تلاقی ۱۰۰ درصد نشان داده می‌شود. این وضعیت سلول برای آلوده کردن آن با ویروس HSV-1 برای روش‌های ۵۰٪ CCID و پلاک مناسب است. **ب)** وضعیت سلول آلوده به HSV-1 را نشان می‌دهد. این شکل سلول با ضریب آلودگی (MOI) کم را نشان می‌دهد و سلول‌ها گرد شده‌اند. هسته بزرگ شده سلول در نمای نزدیک مشاهده می‌شود. تفاوت تغییرات در آثار تخریب سلولی در دو ویروس قابل مشاهده است (بزرگنمایی: ۱۰۰×).



شکل ۳ وضعیت سلول آلوده به HSV-1 با ضریب آلودگی بیشتر را نشان می‌دهد که سلول‌ها از سطح کنده شده‌اند. در نمای نزدیک بزرگ شدن هسته با فلش نشان داده شده است. این تصویر تحلیل (Degeneration) سلولی در مراحل انتهایی تکثیر ویروس را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۱۰۰×).

تیتراسیون روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱

جدول ۱ روش Reed-Muench برای محاسبه CCID50% ویروس HSV-1

رقت ویروسی	تلقیح شده/ عفونی شده	مقادیر مشاهده شده مثبت	مقادیر مشاهده شده منفی	مقادیر تجمعی مثبت	مقادیر تجمعی منفی	میزان عفونت	درصد عفونت
10^{-1}	۸/۸	۸	۰	۳۰	۰	۳۰/۳۰	۱۰۰
10^{-2}	۸/۸	۸	۰	۲۲	۰	۲۲/۲۲	۱۰۰
10^{-3}	۷/۸	۷	۱	۱۴	۱	۱۴/۱۵	۹۳
10^{-4}	۵/۸	۵	۳	۷	۴	۷/۱۱	۶۳
10^{-5}	۲/۸	۲	۶	۲	۱۰	۲/۱۲	۱۷
10^{-6}	۰/۸	۰	۸	۰	۱۸	۰/۱۸	۰

جدول ۲ روش Reed-Muench برای محاسبه CCID50% روتاویروس RF

رقت ویروسی	تلقیح شده/ عفونی شده	مقادیر مشاهده شده مثبت	مقادیر مشاهده شده منفی	مقادیر تجمعی مثبت	مقادیر تجمعی منفی	میزان عفونت	درصد عفونت
10^{-1}	۸/۸	۸	۰	۵۲	۰	۵۲/۵۲	۱۰۰
10^{-2}	۸/۸	۸	۰	۴۴	۰	۴۴/۴۴	۱۰۰
10^{-3}	۸/۸	۸	۰	۳۶	۰	۳۶/۳۶	۱۰۰
10^{-4}	۸/۸	۸	۰	۲۸	۰	۲۸/۲۸	۱۰۰
10^{-5}	۸/۸	۸	۰	۲۰	۰	۲۰/۲۰	۱۰۰
10^{-6}	۶/۸	۶	۲	۱۲	۲	۱۲/۱۴	۸۶
10^{-7}	۴/۸	۴	۴	۶	۶	۶/۱۲	۵۰
10^{-8}	۲/۸	۲	۶	۲	۱۲	۲/۱۴	۱۴
10^{-9}	۰/۸	۰	۸	۰	۲۰	۰/۲۰	۰

میزان عفونت بیانگر مقادیر تجمعی مثبت به کل موارد تجمعی است. قبل از محاسبه CCID50% تمام این محاسبات انجام و درصد عفونت تعیین می‌شود و سپس رقتی که ۵۰ درصد CCID50% را ایجاد می‌کند به عنوان یک CCID50% در نظر گرفته می‌شود.

نتایج

نتایج مربوط به CCID50% در HSV-1 و

روتاویروس گاوی سوش RF

در مورد روتاویروس گاوی تغییرات آثار تخریب سلولی کمتر از ۱۸ ساعت شروع شد اما تا ۷۲ ساعت ادامه داشت. تغییرات تخریب سلولی در چاهک‌هایی که با MOI (Multiplicity of Infection) (ضریب آلودگی) کمتری ($MOI < 1$) آلوده شده‌اند به صورت چروکیده شدن سلولی است (شکل ۱ الف) اما در سلول‌هایی که با ضریب آلودگی بیشتر ($MOI > 1$) آلوده شدند این تغییرات به صورت کنده

شدن کامل سلول (Detachment) از سطح و تخریب سلولی است. در مورد HSV-1 تغییرات تخریب سلولی بعد از ۲۴ (شکل ۲ ب) ساعت شروع می‌شود اما بعد از ۷۲ ساعت به اوج خود می‌رسد (شکل ۳). در این مرحله در چاهک‌هایی که منفی بوده‌اند آثار تخریب سلولی دیده نمی‌شود. تمام رقت‌ها (هر رقت حاوی ۸ تکرار است) خوانده شد و محاسبات براساس روش Reed-Muench انجام شد؛ برای اطلاعات بیشتر به منابع ۳ و ۶ مراجعه شود (جدول ۱ و ۲).

بنابراین بعد از محاسبه انجام شده براساس جدول، رقتی از ویروس که باعث یک CCID50% می‌شود بین رقت 10^{-4} و 10^{-5} قرار دارد (فرمول ۱) [۶، ۱۲].

$$\text{فرمول ۱:} \quad \text{CCID50\%} \times \frac{1}{\text{میلی لیتر}} = X \times \frac{1}{\text{رقت بالای ۵۰ درصد}} \times \frac{1}{\text{میلی لیتر از ماده تلقیح شده}}$$

$$\text{فرمول ۲:} \quad X = \text{لگاریتم ۱۰ فاکتور رقت} \times \frac{50 - \text{درصد عفونت در بالای ۵۰ درصد}}{\text{درصد عفونت در پایین ۵۰ درصد} - \text{درصد عفونت در بالای ۵۰ درصد}}$$

$$\text{CCID50\%} \times \frac{1}{\text{میلی لیتر}} = 2 \times \frac{1}{10^{-4}} \times \frac{1}{0.05} = 4 \times 10^9$$

صورت استفاده از محیط بدون فنل رد (Phenol Red) تفاوت بین پلاک و زمینه بیشتر و پلاک‌ها با وضوح بیشتری دیده می‌شود. در پلیتی شمارش انجام می‌شود که حداقل تعداد پلاک‌ها ۵ تا ۱۰ و حداکثر ۵۰ پلاک باشد؛ در غیر این صورت در شمارش آن‌ها مشکل ایجاد خواهد شد. در شکل ۴ الف و ب اشکال پلاک روتاویروس گاوی RF و HSV-1 به صورت نمونه آورده شده است و تیتراسیون براساس فرمول ۳ محاسبه شده است.

در فرمول ۳ ابتدا تعداد پلاک در رقت مشخص شمارش و عکس همان رقت و عکس میزان ویروس تلقیح شده در همان رقت (به میلی لیتر) بر حسب فرمول محاسبه شده ضرب شد و میزان ویروس به صورت PFU در میلی لیتر به دست آمد.

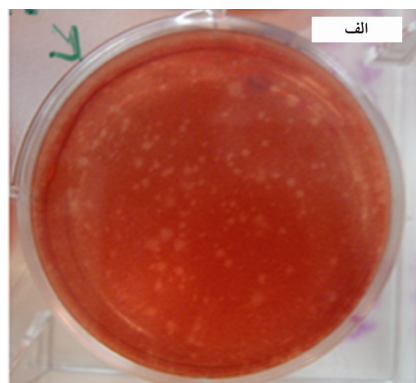
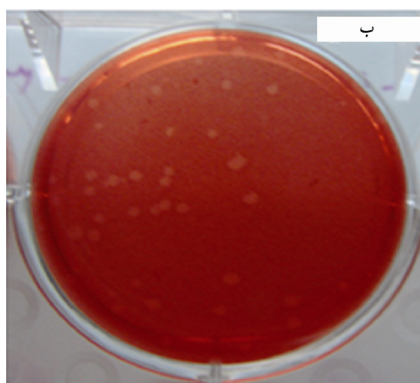
براساس فرمول شماره یک $X=0.3$ است. بنابراین عکس لگاریتم 0.3 برابر است با ۲، که تیترو ویروس براساس فرمول شماره دو محاسبه می‌شود [۱۲].

با توجه به فرمول شماره ۲ تیترو HSV-1 4×10^9 است. برای روتاویروس گاوی RF نیز محاسبه‌ها به همین صورت انجام گرفت و تیترو ویروسی به صورت 2×10^8 به دست آمد که در جدول ۲ آمده است.

نتایج مربوط به پلاک روتاویروس گاوی سوش RF و HSV-1

بعد از مدت زمان‌های گفته شده پلاک‌ها شمارش شد. در

$$\frac{\text{PFU}}{\text{میلی لیتر}} = \text{تعداد پلاک} \times \frac{1}{\text{فاکتور رقت}} \times \frac{1}{\text{میلی لیتر از ماده تلقیح شده}}$$



شکل ۴ الف) پلاک‌های مربوط به روتاویروس RF است که بعد از ۹۶ ساعت ظاهر می‌شود. پلاک‌ها به صورت مناطق روشن و واضح در زمینه قرمز مشاهده شدند که این مناطق روشن مربوط به لیز سلولی است که توانایی جذب رنگ را ندارد. در روتاویروس قبل از رنگ‌آمیزی نیز پلاک‌ها دیده می‌شود اما وضوح بالایی ندارد. شکل ب عکس مربوط به پلاک HSV است که بعد از ۷۲ ساعت ظاهر می‌شود. اندازه پلاک در HSV-1 بزرگ‌تر از روتاویروس RF است.

تیتراسیون روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱

میلی لیتر است. با توجه به فرمول ۳ محاسبه به صورت زیر انجام شد.

در رقت 10^{-6} از چاهک مربوط به روتاویروس تعداد ۵۰ پلاک مشاهده شد که تیترا روتاویروس گاوی 10^8 PFU در

$$\frac{\text{PFU}}{\text{میلی لیتر}} = 50 \times \frac{1}{10^{-6}} \times \frac{1}{0.5} = 10^8 \frac{\text{PFU}}{\text{میلی لیتر (روتاویروس)}}$$

HSV-1 1×10^4 است. در محاسبه فرمول ۳ برای HSV-1 میزان ۴۰۰ میکرو لیتر ویروس به هر چاهک اضافه شده است.

در رقت 10^{-2} از چاهک مربوط به HSV-1 تعداد ۴۰ پلاک مشاهده شد که با توجه به فرمول ۳ تیترا ویروس

$$\frac{\text{PFU}}{\text{میلی لیتر}} = 40 \times \frac{1}{10^{-2}} \times \frac{1}{0.4} = 10^4 \frac{\text{PFU}}{\text{میلی لیتر (HSV-1)}}$$

جدول ۳ نتایج تیتراسیون هر ویروس با دو روش پلاک و CCID50%

ویروس	CCID50%	روش پلاک	نسبت روش پلاک به CCID50% (لگاریتم)
روتاویروس (سویه RF)	2×10^8	1×10^8	۰/۵
HSV-1	4×10^5	1×10^4	۱/۲۵

نسبت نتایج پلاک به CCID50% ویروس HSV-1 و روتاویروس در ستون آخر سمت چپ نشان داده شده که به ترتیب ۰/۵ و ۱/۲۵ است. این نسبت در هر بار تکرار به دلیل تفاوت در نتایج CCID50% تا حدودی متفاوت بود.

واکسن از روش های دقیقی مثل روش پلاک استفاده می شود [۱۳]؛ زیرا در این روش خطای تفسیر نتایج آثار تخریب سلولی ناشی از تغییرات غیر ویروسی در حین انجام آزمون وجود ندارد و تعداد پلاک ها به صورت دیدن یا ندیدن است و حالت حد واسطی وجود ندارد. به طور کل در آزمون پلاک اگر چه حضور یک ذره ویروسی برای ایجاد تنها یک پلاک کافی است ولی نسبت ذره به واحد شکل دهنده می تواند از یک تا ۱۰۰۰۰ وابسته به نوع ویروس فرق کند [۵]. نسبت بالا در بعضی از ویروس ها نشان می دهد که همه ویرونها به طور موفق آلوده کننده یک سلول نیستند و ممکن است بر حضور ویروس های غیر عفونی دلالت داشته باشد که در ژنوم خود جهش های مرگبار داشته باشند یا این که ویروس ها طی رشد و تخلیص آسیب دیده باشند و توضیح دیگر این که اگر چه همه ویروس ها ممکن است بتوانند عفونت را آغاز کنند ولی همه آنها نمی توانند مراحل چرخه تکثیر را به اتمام برسانند. در حالی که

این پلیت ها بعد از شمارش تا ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا در صورت مشاهده پلاک بیشتر شمارش مجدد انجام شود یا ویروسی که هنوز آثار تخریب سلولی را ایجاد نکرده است مشاهده شود. از آنجا که در این روش هر پلاک نماینده یک ویروس است بنابراین احتمال این که پلاک جدیدی ظاهر شود کم است اما اگر جمعیت ویروسی از نظر ژنتیکی تفاوت داشته باشند یا همگن نباشند زمان تشکیل پلاک می تواند متفاوت باشد. نتایج مربوط به پلاک و CCID50% در یک نما در جدول ۳ نشان داده شده است.

بحث

روش پلاک یکی از دقیق ترین روش ها در تعیین تیترا ویروسی است [۲]. امروزه در شرکت های تهیه واکسن زنده تخفیف حدت یافته برای تیتراسیون میزان ویروس در ظرف

پلاک را شکل می‌دهد شمارش شده و نیاز به محاسبه ۵۰ درصدی نیست [۱۳]. همچنین در صورت استفاده از روش پلاک و بهینه کردن آن می‌توان یک جمعیت ویروسی را از هر پلاک جدا کرد و ویروس خالص شده به دست آورد که از نظر ژنوتیپی یکسان است بنابراین مطالعات روی آن جمعیت جدا شده انجام می‌شود؛ در صورتی که در یک ویروس خالص نشده امکان وجود ویروس‌های هترولوگ حتی در صورت جهش اندک در یک جمعیت وجود دارد و بنابراین مطالعه حاضر قابل تعمیم به کل جمعیت نیست [۱۴]. از آنجایی که در روش پلاک تغییرات آزمایشگاهی مثل تغییر کاربر تأثیری در نتایج نخواهد گذاشت به عنوان یک روش جایگزین و دقیق برای CCID50% مناسب است و باید در مطالعات مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه براساس رساله دکتری مصوب دانشگاه تربیت مدرس و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی آن دانشگاه انجام شده است. نویسندگان از راهنمایی‌های دکتر یاسوتاکا هوشینو از NIH در روش پلاک روتاویروس سپاسگزاری می‌کنند.

این خطاها در CCID50% وجود دارد. در صورتی که خطاهای ناشی از توزیع ویروس در رقت‌سازی اتفاق نیافتد یک ارتباط بین CCID50% و پلاک وجود دارد که به صورت « $1\text{CCID50\%} = 0.7\text{ PFU}$ » است. بنابراین در CCID50% به عنوان یک روش نقطه پایانی (End-Point) توزیع ذرات ویروسی در میزبان (در CCID50% هر چاهک به طور مجزا یک میزبان است) از توزیع پواسن پیروی می‌کند [۱]. در CCID50% ممکن است ۵۰ درصد از میزبان‌ها ویروس دریافت نکنند اما نیمی از آن‌ها با بیش از یک ویروس (متوسط ۱/۳۸ ذره ویروس) آلوده شوند. بنابراین هر میزبان (چاهک) ۰/۶۹ یا ۰/۷ ویروس دریافت می‌کنند و در صورتی که حساسیت دو روش یکسان باشد یک CCID50% معادل ۰/۷ PFU است. اما با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بعد از انجام CCID50% و روش پلاک به طور مجزا برای هر ویروس نشان داده شد که در روش CCID50% آنچه که به عنوان نسبت ثابت ریاضی بیان می‌شود ثابت نیست. به نظر می‌آید که درباره CCID50% در هر بار تکرار در یک ویروس نتایج به همان صورت نباشد همچنان که در تحقیق حاضر این تکرارپذیری مشاهده نشد [۱۳]؛ اما نتایج پلاک که به صورت دوتایی انجام شد دقیقاً تکرارپذیر بود زیرا در روش پلاک ذره ویروسی که

منابع

- [1] Condit RC. Principles of Virology. In: Knipe DM, Howley PM, (Eds). Fields Virology, 5th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; p: 27-57.
- [2] Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantitation. In: Mahy BWJ, (Eds). Virology methods manual. Academic Press, 1996; p: 26-46.
- [3] Carter JB, Saunders VA. Virology: principles and applications. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007; p: 10-29.
- [4] Cooper PD. The plaque assay of animal viruses. Adv Virus Res 1961; 8: 319-78.
- [5] Virus cultivation, Detection and Genetics. In: Enquist L, Krug R, Racaniello V, Skalka A, Flint S, (Eds). Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control. Washington: ASM Press, 2004; p: 27-62.
- [6] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Epidemiol 1938; 27(3): 493-7.
- [7] Schmidt NJ. Cell Culture Procedures for

- Diagnostic Virology. In: Schmidt NJ, Emmons RW, (Eds). Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 6th ed, Washington: American Public Health Association, 1989; p: 51-98.
- [8] Flanagan TD, Barron AL. Plaque Formation by Mumps Virus and Inhibition by Antiserum. *Appl Microbiol* 1970; 19(2): 360–6.
- [9] Purnell SE, Ebdon JE, Taylor HD. Bacteriophage lysis of *Enterococcus* host strains: a tool for microbial source tracking? *Environ Sci Technol* 2011; 45(24): 10699-705.
- [10] Kenzaka T, Tani K, Nasu M. High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level. *ISME J* 2010; 4(5): 648-59.
- [11] Matsuno S, Inouye S, Kono R. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J Clin Microbiol* 1977; 5(1): 1-4.
- [12] Arnold M, Patton JT, McDonald SM. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol* 2009; Chapter 15: Unit 15C. 3.
- [13] Forcic D, Kosutić-Gulija T, Santak M, Jug R, Ivancic-Jelecki J, Markusic M, Mazuran R. Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay. *Vaccine* 2010; 28(7): 1887-92.
- [14] Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol* 2010; 84(19): 9733-48.