

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 پور عسگری^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، کد پستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۶، 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 ناقل‌های ویروسی و مطالعات تکثیری دارای اهمیت است؛ بنابراین در این مطالعه تیتر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ و روتاویروس با دو روش مرسوم CCID50% و پلاک به عنوان روش استاندارد مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های MA104 و Vero به ترتیب برای کشت روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ تهیه و در پلیت ۶ و ۹۶ خانه‌ای 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 می‌رسد در حالی که در HSV-1 تغییرات حاصل از تخریب سلول بعد از ۲۴ ساعت شروع و تا ۷۲ ساعت ادامه می‌یابد. 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 پایین‌تر از CCID50% را نشان داد که به صورت «۰/۷ PFU = ۱CCID50%» گزارش می‌شود.

نتیجه‌گیری: روش پلاک یکی از دقیق‌ترین روش‌ها در تعیین تیتر 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: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۴۵-۳۵

مقدمه

زیست‌شناسی مولکولی و زیست‌شناسی سلولی تقسیم‌بندی نمود.

در زمان تکثیر ویروس در سلول، تعدادی از تغییرات بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی ایجاد می‌شود که این تغییرات در

روش‌های آزمایشگاهی زیادی برای تشخیص ویروس‌ها وجود دارد که می‌توان آن‌ها را به روش‌هایی 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 تیتر 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 سلولی درصد ۵۰) کشت‌های سلولی توسط رقتی از ویروس آلوده می‌شود و میزان تیتر 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 سلولی استفاده شد. در نهایت رقتی از ویروس که توانایی آلوده نمودن ۵۰ درصد از کشت‌های سلولی را داشت با استفاده از فرمول رید-مونش (Reed-Muench Method) محاسبه شد [۶، ۵، ۳].

دو آزمون پلاک و CCID50% از مهم‌ترین روش‌هایی است که برای تعیین تیتر 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 تیتر ویروس عفونی اندازه‌گیری می‌شود اما در روش‌های فیزیکی مثل میکروسکوب الکترونی، هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) و روش‌های ایمونولوژیکی تمام ذرات عفونی و غیر عفونی ویروسی تیتر می‌شود؛ اما بین این دو روش، روش پلاک یکی از دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش‌های تعیین تیتر 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 ریخت‌شناسی درون سلولی حاصل از تکثیر ویروس در کشت سلول است. این تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از آلودگی سلول با ویروس شامل گرد شدن، 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 عفونت‌زاوی 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 روش ن 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 تیتر

مقایسه دو روش CCID50% و پلاک در دو ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) و Herpes Simplex Type1: HSV-1 و روتاویروس گاوی (Bovine Rotavirus) سوش RF است و از این تفاوت بین تیتر 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 ناقلين ویروسی (Viral Vector) به صورت تجاری توسط بسياري از محققين برای انجام مطالعات استفاده می شود که انجام تيتراسيون برای به دست آمدن مقدار مشخص ویروس ضروري است. همچنین دانستن تيتر فاژ که بتواند مقدار مشخصی DNA به ازاي ۱ ميليلتر محيط كشت توليد نماید الزامي است. در اين روش که اول بار برای باكتريوفاژها ابداع شد، نمونه‌ای از باكتريوفاژ را با باكتري ميزبان و آگار ذوب شده مخلوط می‌کنند؛ سپس اين مخلوط را در پليت ريخته تا به صورت يك لایه سفت شود. هر ذره ویروسی يك باكتري را آلوده کرده و در درون آن تکثیر يافته و پس از پاره شدن دیواره باكتري صدها ویروس تازه از آنها رها می‌شود. در رقت‌های مختلف تعداد اين پلاک‌ها و تراكم آنها متفاوت است. با شمارش تعداد پلاک‌ها در سطح ظرف و تقسيم کردن عدد حاصل بر ميزان رقت فاژ، ميزان PFU برای نمونه‌های فاژ محاسبه می‌شود. امروزه از اين روش در دنيا برای سنجش تيتر فاژ لاليك (Lytic Phage) و در فاژ درمانی و نيز بررسی تأثير بيان رونوشت‌های ویروسی و راهاندازی آزمایش‌های ویروس‌شناسی و بالاخره برای بررسی آثار ضد ویروسی (ویروسيدال: Virucidal) عصاره‌های گیاهی استفاده می‌شود؛ بنابراین راهاندازی و دانستن اصول پایه پلاک در تيتراسيون ضروري است [۹، ۱۰].

مواد و روش‌ها

كشت سلول

در مطالعه حاضر سلول MA-104 برای کشت روتاویروس

پلاک يا PFU در هر سوسپانسيون ویروسی يکسان است. بر خلاف روش پلاک، در روش CCID50% ویروس به سلول کشت داده شده در محيط مایع در پليت ۹۶ خانه‌اي اضافه می‌شود. بنابراین هر چاهک بيانگر يك سلول تک در مقایسه با روش پلاک است. هدف اين روش پيدا کردن مقداری از تيتر ویروس است که باعث پاسخ ۵۰ درصدی در چاهک‌ها می‌شود. در روش کشت سلول اين مقدار به عنوان CCID50% در نظر گرفته می‌شود. در تعریف دوز ۵۰ درصدی مثل دوز عفنونی کنده کشت سلول ۵۰ درصد (CCID50%) یا دوز کشنده ۵۰ درصد (Lethal Dose 50%:LD50%) و غيره اندازه‌گيری می‌شود، در واقع میزانی از دارو یا ویروس که باعث تغييرات مرگ یا تخريب سلولی در ۵۰ درصد موارد می‌شود را بيان می‌کند. در حالت ۵۰ درصدی تغييرات یا مرگ با تغييرات اندک در دوز یا مقدار دارو یا ویروس، تغييرات قابل توجهی در پاسخ دیده می‌شود در حالی که در تغييرات مرگ یا تخريب سلولی ۱۰ یا ۹۰ درصدی اين تغيير دوز تأثير اندکی در پاسخ دارد؛ بنابراین زمانی که نمودار دوز/پاسخ رسم می‌شود به صورت سيمگومويدي در می‌آيد که در آن نمودار تغييرات ۵۰ درصد بهترین نتایج را نشان می‌دهد. به همين دليل از روش ۵۰ درصدی استفاده می‌شود [۷، ۸]. در روش CCID50% برای محاسبه تيتر ویروسی در نمونه اصلی (رقیق نشده) از روش Reed-Muench استفاده می‌شود [۶]. نکته مهم آن که خیلی از محققین از روش CCID50% برای تيتراسيون ویروس استفاده می‌کنند غافل از آن که مقادير گزارش شده براساس آن تا حدودی بالاتر از تيتر ویروسی براساس روش پلاک است. در منابع معتبر اين تفاوت را به صورت «۰/۷ PFU = ۱CCID50%» گزارش می‌کنند که ناشی از توزيع پواسن در CCID50% است [۵]. در تعدادی از مطالعات که برای اين 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 تخريب سلولی است. هدف از بررسی حاضر

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 گرمانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 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 گرمانه 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 این که 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 گرمانه 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 معجزاً تشکیل شود. بعد از یک ساعت ویروس تلقیح شده برداشت شد و آگار ۲ درصد ذوب شده با یک حجم محیط کشت 2X DMEM 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

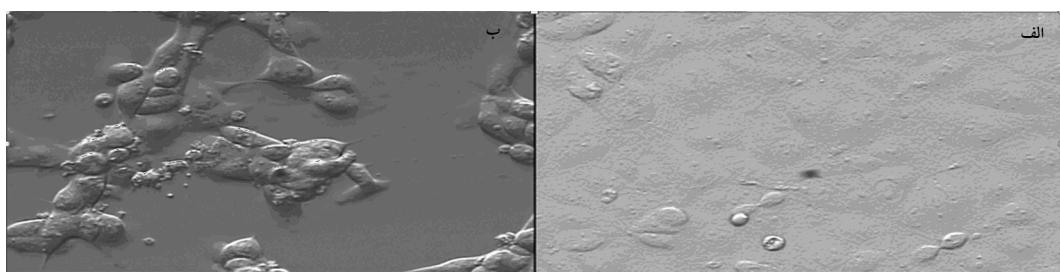
سویه گاوی RF استفاده شد. این سلول از کلیه میمون رزوس ماکاک (*Rhesus macaque*) گرفته شده و از نوع سلول‌های پوششی است. این سلول از بانک سلول انسنتیتو پاستور ایران دریافت شد (شکل ۱ الف) و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپтомایسین (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 4×10^5 سلول در هر میلی‌لیتر (۱۰۰ میکرولیتر) از محیط کشت پاساژ داده شدند و در گرمانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 قرار داده شدند. بعد از مدت ۴۸ ساعت سلول‌ها به ۱۰۰ درصد تلاقی (Confluence) رسیدند و برای کشت ویروس آماده شدند. سلول Vero مورد استفاده در مطالعه حاضر از بانک سلول انسنتیتو 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 سیز افریقایی گرفته شده و از نوع سلول‌های فیبروبلاستی است.

انجام روش CCID50%

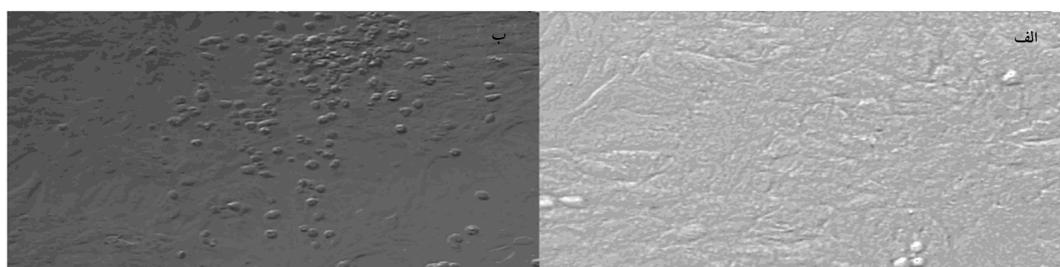
بعد از ذوب کردن بذر ویروس RF و HSV-1 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، رقت‌های ۱۰ برابری از ویروس با محیط کشت تهیه شد. برای فعل کردن روتاویروس از تریپسین (Pancreatic Trypsin Porcine Type IX، Sigma) با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس برای هر یک از ویروس‌ها تا 10^{-9} رقت‌سازی انجام شد [۱۱]. سلول‌ها با 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 انکوپاتور 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.

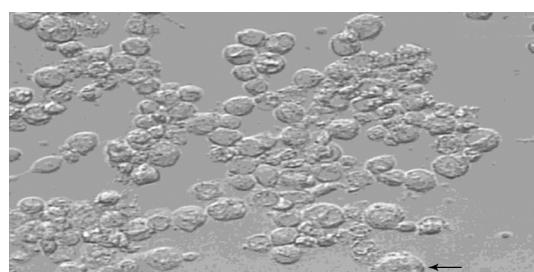
مخلوط محیط کشت 2X DMEM، آگار کشت سلول ۲ درصد و رنگ نوتراال رد است. برای استفاده از رنگ از رقت ۱/۱۵۰۰۰ نوتراال رد با غلظت ۱/۰ درصد استفاده شد. این میزان رنگ با استفاده از چند رقت بهینه شد و بهترین نتیجه در این رقت مشاهده شد. بعد از ساخت این ترکیب



شکل ۱ (الف) وضعیت طبیعی سلول MA104 با تلاقی کامل را نشان می‌دهد. این وضعیت سلول برای آنوده کردن آن با ویروس برای روش‌های CCID50% و پلاک مناسب است. (ب) وضعیت سلول با ضریب آنودگی بیشتر ناشی از رشد روتوایروس گاوی را نشان می‌دهد سلول چروکیده شده و بعضی مناطق کنده از سطح فلاسک دیده می‌شود (بزرگنمایی: $\times 200$).



شکل ۲ (الف) وضعیت طبیعی سلول Vero را نشان می‌دهد. این سلول‌ها با تلاقی ۱۰۰ درصد نشان داده می‌شود. این وضعیت سلول برای آنوده کردن آن با ویروس HSV-1 برای روش‌های CCID50% و پلاک مناسب است. (ب) وضعیت سلول آنوده به HSV-1 را نشان می‌دهد. این شکل سلول با ضریب آنودگی (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: $\times 100$).



شکل ۳ وضعیت سلول آنوده به HSV-1 با ضریب آنودگی 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 انتهايی تکثیر ویروس را نشان می‌دهد (بزرگنمایی $\times 100$).

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

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

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

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) [۱۲، ۶].

نتایج

نتایج مربوط به 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) ($MOI < 1$) آلوده شده‌اند به صورت چروکیده شدن سلولی است (شکل ۱ الف) اما در سلول‌هایی که با ضربی آلودگی ($MOI > 1$) آلوده شدند این تغییرات به صورت کنده بیشتر

$$\text{CCID}50\% = \frac{1}{\text{لگاریتم}} \times \frac{1}{\text{رقت بالای } 50 \text{ درصد}} \times \frac{1}{\text{میلی لیتر از ماده تلقیح شده}} \quad \text{فرمول ۱:}$$

$$X = \frac{\text{درصد عفونت در بالای } 50 \text{ درصد}}{\text{درصد عفونت در پایین } 50 \text{ درصد} - \text{درصد عفونت در بالای } 50 \text{ درصد}} \quad \text{فرمول ۲:}$$

$$\text{CCID}50\% = \frac{1}{\text{لگاریتم}} = 2 \times \frac{1}{10^{-4}} \times \frac{1}{0.05} = 4 \times 10^0 \quad \text{فرمول ۳:}$$

صورت استفاده از محیط بدون فل رد (Phenol Red) تفاوت بین پلاک و زمینه بیشتر و پلاک‌ها با واضح بیشتری دیده می‌شود. در پلیتی شمارش انجام می‌شود که حداقل تعداد پلاک‌ها ۵ تا ۱۰ و حداقل 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 بدست آمد.

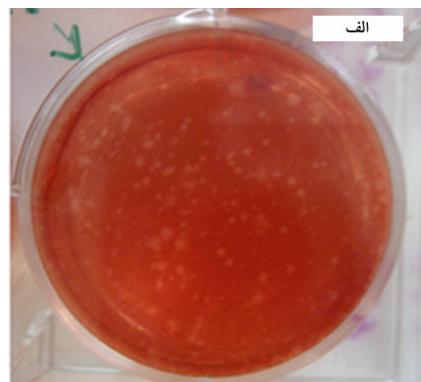
براساس فرمول شماره یک $x=0.73$ است. بنابراین عکس لگاریتم 0.73 برابر است با ۲، که تیتر ویروس براساس فرمول شماره دو محاسبه می‌شود [۱۲].

با توجه به فرمول شماره ۲ تیتر 4×10^0 HSV-1 است. برای روتاویروس گاوی RF نیز محاسبه‌ها به همین صورت انجام گرفت و تیتر ویروسی به صورت 2×10^8 بدست 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

$$\text{PFU} = \frac{1}{\text{تعداد پلاک}} \times \frac{1}{\text{میلی لیتر از ماده تلقیح شده}} \times \frac{1}{\text{فاکتور رقت}} \quad \text{فرمول ۴:}$$



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 واضح بالای ندارد. شکل ب عکس مربوط به پلاک HSV است که بعد از ۷۲ ساعت ظاهر می‌شود. اندازه پلاک در HSV 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 تیتر روتاویروس گاوی 10^8 PFU در

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

$\text{HSV-1} \times 10^4$ است. در محاسبه فرمول ۳ برای HSV-1 میزان ۴۰۰ میکرولیتر ویروس به هر چاهک اضافه شده است.

در رقت 10^{-2} از چاهک مربوط به HSV-1 تعداد ۴ پلاک مشاهده شد که با به توجه به فرمول ۳ تیتر 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	4×10^6	1×10^4	۱/۲۵

نسبت نتایج پلاک به % CCID50 در 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 روش‌های دقیقی مثل روش پلاک استفاده می‌شود [۱۳]; زیرا در این روش خطای تفسیر نتایج آثار تخریب سلولی ناشی از تغییرات غیر ویروسی در حین انجام آزمون وجود ندارد و تعداد پلاک‌ها 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 می‌تواند از یک تا ۱۰۰۰۰ وابسته به نوع ویروس فرق کند [۵]. نسبت بالا در بعضی از ویروس‌ها نشان می‌دهد که همه ویروس‌ها به طور موفق آلووده کننده یک سلول نیستند و ممکن است بر حضور ویروس‌های غیر عفونی دلالت داشته باشد که در ژنوم خود جهش‌های مرگبار داشته باشند یا این‌که ویروس‌ها طی رشد و تخلیص آسیب دیده باشند و توضیح دیگر این‌که اگر چه همه ویروس‌ها ممکن است بتوانند عفونت را آغاز کنند ولی همه آن‌ها نمی‌توانند مراحل چرخه تکثیر را به اتمام برسانند. در حالی که

این پلیت‌ها 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 این‌که پلاک جدیدی ظاهر شود کم است اما اگر جمعیت ویروسی از نظر ژنتیکی تفاوت داشته باشند یا همگن نباشند زمان تشکیل پلاک می‌تواند متفاوت باشد. نتایج مربوط به پلاک و % CCID50 در یک نما در جدول ۳ نشان داده شده است.

بحث

روش پلاک یکی از دقیق‌ترین روش‌ها در تعیین تیتر ویروسی است [۲]. امروزه در شرکت‌های 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 ژنتیکی 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. نویسنده‌گان از راهنمایی‌های دکتر یاسوتاکا هوشینو از NIH در روش پلاک روتاویروس سپاسگزاری می‌کنند.

این خطاهای 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 $CCID50\% = 0.7 PFU$ است. بنابراین در «ICCID50%» به عنوان یک روش نقطه پایانی (End-Point) توزیع ذرات ویروسی در میزان (در %) CCID50% هر چاهک به طور مجزا یک میزان است) از توزیع پواسن پیروی می‌کند [۱]. در CCID50% ممکن است ۵۰ درصد از میزان‌ها ویروس دریافت نکنند اما نیمی از آن‌ها با بیش از یک ویروس (متوسط ۱/۳۸ ذره ویروس) آلوده شوند. بنابراین هر میزان (چاهک) ۰/۷ یا ۰/۶۹ 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 تکرار پذیری مشاهده نشد [۱۳]؛ اما نتایج پلاک که به صورت دوتایی انجام شد دقیقاً تکرار پذیر 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

تیتراسیون روتاویروس و ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱

- 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.