ORIGINAL ARTICLE

Design and Development of a Pseudotyped-lentivirus for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

Hadi Hassannia[1,2],
Seyed Ehsan Enderami[3],
Reyhaneh Nassiri Mansour[4],
Mohamad Eftekhary[5],
Mohamadfoad Abazari[6],
Reza salarinia[7]

[1] Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Paramedicine, Amol Faculty of Paramedical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medical Sciences, Mazandarn University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Ph.D. Student in Tissue Engineering, Department of Tissue Engineering, Student Research Committee, School of Advanced Technologies in Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[6] Ph.D. Candidate of Neurosciences, Division of Medical Sciences, Island Medical Program, University of British Columbia, Victoria, BC, Canada
[7] Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

(Received October 15, 2023; Accepted November 4, 2023)

Abstract

Background and purpose: Pseudoviruses, due to their immunity and adaptability, are valuable tools for developing vaccines and therapeutic drugs, particularly for emerging viruses. SARS-CoV-2, due to its high mortality rate and ease of transmission, should be handled under Biosafety Level 3 conditions, making the development of vaccines and therapeutic drugs challenging in many research centers. The present study aimed to produce a lentivirus pseudotype that can be used in neutralization assays based on pseudovirus under Biosafety Level 2 conditions.

Materials and methods: The SARS-CoV-2 Spike protein gene was inserted into the HIV-1 genome. Confirmation of entry was obtained through flow cytometry, electron microscopy, and immunofluorescence. Finally, the neutralization capacity of convalescent COVID-19 patients' sera was measured using the pseudovirus-based neutralization assay.

Results: The results of flow cytometry, electron microscopy, and immunofluorescence confirmed the entry of the Spike gene. Furthermore, the sera of convalescent patients showed significantly higher neutralizing capacity compared to the control group that had not been exposed to SARS-CoV-2.

Conclusion: The results of this study demonstrated that the use of the produced lentivirus pseudotype can measure the neutralizing capacity of patients' sera, and the pseudovirus-based neutralization assay serves as a suitable alternative for assessing the neutralization of live SARS-CoV-2. Moreover, this test can effectively evaluate vaccines or therapeutic drugs for combating this deadly virus.

Keywords: COVID-19, Lenti-SARS-CoV-2, Pseudovirus, SARS-CoV-2

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 1):77-85 (Persian).

Corresponding Author: Seyed Ehsan Enderami- Faculty of Advanced Technologies in Medical Sciences, Mazandarn University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: ehsan.enderami@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ویژه نامه ۱ آبان سال ۱۴۰۲ (۸۵-۷۷)

طراحی و توسعه‌ی سودوتایپ لنتی ویروس برای کروناویروس سندرم حاد تنفسی ۲ [SARS-CoV-2]

هادی حسن نیا[۱،۲]
سید احسان اندرامی[۳]
ریحانه نصیری منصور[۴]
محمد افتخاری[۵]
محمدفواد اباذری[۶]
رضا سالاری نیا[۷]

چکیده

سابقه و هدف: شبه‌ویروس‌ها به‌دلیل ایمنی و تطبیق‌پذیری، ابزار مفیدی برای ساخت واکسن‌ها و داروهای درمانی، به‌ویژه برای ویروس‌های نوظهور هستند. SARS-CoV-2 به‌دلیل مرگ‌ومیر بالا و انتقال راحت، باید تحت شرایط ایمنی‌زیستی سطح سه قرار گیرد که همین موضوع روند ساخت واکسن‌ها و داروهای درمانی را در بسیاری از مراکز تحقیقاتی، دشوار کرده است. هدف از این مطالعه تولید سودوتایپ لنتی ویروس است که در تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای شبه‌ویروس در شرایط سطح ایمنی‌زیستی دو، بتوان از آن استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: روی ژنوم HIV-1، ژن پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 قرار داده شد. برای تأیید ورود از تست‌های فلوسایتومتری، میکروسکوپ الکترونی و ایمونوفلورسانس استفاده شد. در نهایت، قدرت خنثی‌سازی سرم بیماران بهبودیافته از کووید۱۹ با استفاده از تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای شبه‌ویروس اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج تست‌های فلوسایتومتری، میکروسکوپ الکترونی و ایمونوفلورسانس ورود ژن اسپایک را تأیید کرد. همچنین، سرم بیماران بهبودیافته قدرت خنثی‌کنندگی بسیار بالاتری را نسبت به سرم گروه کنترل مواجه‌نشده با SARS-CoV-2 نشان داد.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از سودوتایپ لنتی ویروس تولید شده می‌توان قدرت خنثی‌کنندگی سرم بیماران را اندازه‌گیری کرد و تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای شبه‌ویروس، جایگزین مناسبی برای تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای ویروس زنده SARS-CoV-2 است. همچنین، این تست می‌تواند در مطالعات ارزیابی واکسن‌ها یا داروهای درمانی برای مبارزه با این ویروس کشنده کارآمد باشد.

واژه های کلیدی: SARS-CoV-2، Lenti-SARS-Cov2، کووید۱۹، سودوویروس

مقدمه

کروناویروس عضوی از زیرخانواده‌ی کروناویریده است که میزبان آن گسترده و متنوع است. ویروس کرونا علاوه بر انسان، می‌تواند بسیاری از پستانداران و پرندگان را مبتلا کند(۱).

مولف مسئول: سید احسان اندرامی- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین E-mail: ehsan.enderami@gmail.com
۱. استادیار، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. گروه پیراپزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌فناوری پزشکی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی بافت، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه زیست‌فناوری پزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۶. دانشجوی دکتری تخصصی علوم اعصاب، شاخه علوم پزشکی، برنامه پزشکی جزیره ونکور، دانشگاه بریتیش کلمبیا، ویکتوریا، کانادا
۷. استادیار، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۷/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۸/۶ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۸/۱۳

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

قبل از سال ۲۰۱۹، دو ویروس کرونای انسانی شناخته‌شده متعلق به جنس بتاکرونا ویروس (کروناویروس سندرم تنفسی حاد شدید (SARS-CoV) و کروناویروس سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) باعث بیماری‌های تنفسی بسیار شدند(۲).

در دسامبر ۲۰۱۹، بیماری COVID-19 در ووهان واقع در چین، شیوع یافت. بیمار اولیه مربوط به بازار عمده‌فروشی غذاهای دریایی در ووهان بود. نوع جدیدی از ویروس کرونا از سلول‌های اپیتلیال تنفسی انسان جدا شد که متعلق به جنس بتاکروناویروس بود. این ویروس با MERS-CoV و SARS-CoV که قبلاً شناسایی شده بودند، متفاوت بود و SARS-CoV-2 نامیده شد(۲). SARS-CoV-2 ویروسی پوشش‌دار با RNA تک‌رشته‌ای مثبت و متعلق به خانواده‌ی کروناویریده است. ژنوم ویروس SARS-CoV-2 به طول ۲۹/۸ کیلوباز دارای ۱۴ قالب خواندن باز (ORF) است که ۲۷ پروتئین را کد می‌کند. در انتهای ۳' ژنوم، چهار پروتئین ساختمانی، شامل پروتئین سطحی Spike (S)، Envelope (E)، Membrane(M) و Nucleocapsid (N) کد می‌شود. پروتئین S در اتصال ویروس و ورود ویروس به سلول میزبان نقش دارد، پروتئین N ژنوم ویروس را در ریبونوکلئوکپسید مارپیچی بسته‌بند می‌کند، پروتئین M نقش اساسی در شکل‌دهی و مونتاژ ویروس دارد و پروتئین E نیز با ایجاد منفذ، در انتقال یون‌ها و ایجاد ویریون نقش دارد(۳).

پروتئین S مسئول اتصال ویروس و وارد شدن آن به سلول‌های هدف است. هم‌چنین، این پروتئین نقش کلیدی در القای ایمنی هومورال و سلولی محافظ در طول عفونت SARS-CoV-2 ایفا می‌کند؛ در نتیجه، پروتئین S جذاب‌ترین هدف برای واکسن SARS-CoV-2 و توسعه‌ی درمانی در نظر گرفته شد(۳). در مواجهه با پاندمی COVID-19، رویکردهای مختلفی برای توسعه‌ی اقدامات پیشگیرانه و درمانی به کار گرفته شده است؛ از جمله واکسن غیرفعال کامل، واکسن زیرواحد، واکسن مبتنی بر RNA، واکسن‌های ناقل ویروسی، پلاسماتراپی، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده مونوکلونال و مهارکننده‌های اختصاصی که بیش‌تر آن‌ها برای هدف قرار دادن پروتئین S طراحی شده است(۴). SARS-CoV-2 به‌دلیل مرگ‌ومیر بالا و انتقال راحت، باید تحت شرایط ایمنی‌زیستی سطح سه قرار گیرد و همین موضوع روند ساخت واکسن‌ها و داروهای درمانی را در بسیاری از مراکز تحقیقاتی، دشوار کرده است(۵). برای جلوگیری از مواجهه با ویروس عفونی زنده، تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای شبه‌ویروس برای ویروس‌های متعددی از جمله MERS-CoV(۶)، ویروس هاری(۷)، ویروس ابولا(۸)، ویروس ماربورگ(۹)، ویروس لاسا(۱۰)، چیکونگونیاویروس(۱۱)، ویروس نیپا(۱۲)، ویروس دره‌ریفت(۱۳) و ویروس تب خون‌ریزی‌دهنده‌ی کریمه‌کنگو(۱۴) توسعه یافته است. بر همین اساس، در این مطالعه، تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای سودوتایپ لنتی ویروس SARS-CoV-2 طراحی شد و به‌منظور تأیید کارایی آن، قدرت خنثی‌سازی سرم بیماران بهبودیافته از کووید۱۹ با استفاده از این تست اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و تهیه‌ی نمونه‌های سرم بهبودیافته از کووید۱۹

از رده‌ی سلولی Lenti-X 293T (کلیه‌ی جنینی انسان) در این مطالعه استفاده شد و تمام رده‌های سلولی از مرکز منابع زیستی ایران (IBRC، ایران) یا انستیتو پاستور ایران خریداری شد. تمام سلول‌ها در محیط DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS؛ Gibco، ایالات متحده)، ۱ درصد ال‌گلوتامین (Gibco، ایالات متحده)، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین در میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و CO2 با غلظت ۵ درصد کشت داده شدند. نمونه‌های سرم بیماران بهبودیافته از SARS-CoV-2 از بیمارستان پیامبران تهران تهیه شد و از همه‌ی داوطلبان رضایت‌نامه‌ی کتبی آگاهانه اخذ شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

پلاسمیدها

برای ساخت شبه‌ویروس، ژن پروتئین S از سویه‌ی SARS-CoV2 (GenBank:MN908947) Wuhan-Hu-1 توسط EcoRI و XbaI آنزیم‌های محدودکننده (Bimatiko sites) در پلاسمید یوکاریوتی بیانی pcDNA3.1 کلون شدند تا پلاسمیدهای نوترکیب پوششی pcDNA3.1.S تولید شود. مطابق با مطالعات قبلی(۱۵)، برای افزایش کارایی بیان، یک توالی GCCGCCATGG قبل از کدون شروع درج شد. علاوه بر این، pLOX-CWgfp (پلاسمید Addgene 12241، UK)، پلاسمید پوششی بیان‌کننده‌ی VSV-G pMD2.G (پلاسمید Addgene 12259، کمبریج، MA، ایالات متحده‌ی امریکا)، ناقل بسته‌بندی لنتی ویروس psPAX2 و کدکننده‌ی HIV-Pol-1 (Addgene 12260 plasmid, Cambridge, MA, USA) خریداری شد. همه‌ی پلاسمیدها با هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شدند (داده‌ها نشان داده نشده است). پلاسمیدها به سویه‌ی اشرشیاکلی DH5α وارد شدند. پلاسمیدهای استفاده‌شده برای ترانسفکشن با استفاده از کیت (NucleoBond® Xtra Maxi MN، آلمان) مطابق دستورالعمل سازنده، استخراج شدند.

تولید و تیتراسیون سودولنتی ویروس SARS-CoV-2

برای تولید سودولنتی ویروس Lenti SARS-CoV2-S، سلول‌های Lenti-X 293T رشدیافته در صفحات کشت ۱۰ سانتی‌متری با ۱۲ میکروگرم pLOX-CW، ۶ میکروگرم psPAX2 و ۶ میکروگرم pcDNA3.1.S، با استفاده از لیپوفکتامین LTX (اینویتروژن، ایالات متحده‌ی امریکا) ترانسفکت شدند. وکتور pMD2.G هم‌چنین، با سودولنتی ویروس و psPAX2، برای تولید شبه VSV-G به‌عنوان یک کنترل، ترانسفکت شد. پس از چهار ساعت، محیط کشت با محیط کشت تازه جایگزین شد. سوپرناتانت‌ها در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، برداشت شدند و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری، فیلتر شدند. برای تیتراسیون ذرات Lenti SARS-CoV2--S، ۱۰۰ میکرولیتر از یک رقت سریال ده‌برابری از مایع رویی کشت برای انتقال رده‌های سلولی Lenti-X 293T، از سلول‌های HeLa استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند، تریپسینه شدند، در ۱ درصد پارافورمالدئید (PFA) معلق شدند و با استفاده از فلوسیتومتری، تیتر شدند. برای محاسبه‌ی تیتر عفونی از فرمول زیر استفاده شد:

Transducing units (TU)/mL= [(percentage of GFP − positive cells/100) × number of cells infected × vector dilution factor]/supernatant volume (mL).

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس

برای تأیید بیان pcDNA3.1.S در سلول‌های Lenti-X 293T، روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم اجرا شد که مطابق با مطالعات قبلی بود(۱۷،۱۶). ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌ها با تیمار متانول به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای محیط ثابت شدند. سپس، با آنتی‌بادی ضداسپایک به مدت یک ساعت، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، انکوبه شدند و به‌دنبال آن، سه مرحله شست‌وشو با PBS انجام شد و سپس، با آنتی بادی پلی‌کلونال بزی ضد IgG کونژوگه با FITC (Fluorescein isothiocyanate) با رقت ۱:۲۰ انکوبه شدند. سپس، اسلایدها با رقت ۱:۱۰۰۰ DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindole) (سیگما، ایالات متحده‌ی امریکا) رنگ‌آمیزی شدند و زیر میکروسکوپ فلورسانس (زایس، آلمان) مشاهده شدند. از سلول‌های T293 ترانسفکت‌نشده و سلول‌های ترانسفکت‌شده با وکتور خالی pcDNA3.1 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

میکروسکوپ الکترونی (TEM)

از میکروسکوپ الکترونی برای تأیید بیان پروتئین S روی سطح لنتی ویروس نوترکیب استفاده شد. گریدها با ۱۵ میکرولیتر Lenti SARS-CoV2—S به مدت ۳۰ دقیقه، پوشانده شدند و سپس، با آنتی‌بادی ضد S به مدت دو ساعت، انکوبه شدند. پس از شست‌وشو با PBS، گریدها با آنتی‌بادی ضد IgG کونژوگه‌ی طلا

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

(رقت ۱:۱۰۰۰) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، انکوبه شدند. پس از شست‌وشو، توری‌ها با اورانیل‌استات ۱ درصد (سیگما، ایالات متحده‌ی امریکا) به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای محیط، به‌طور منفی، رنگ‌آمیزی شدند. سپس، شبکه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی LEO 906(Zeiss، آلمان) بررسی شدند.

سنجش خنثی‌سازی مبتنی بر شبه‌ویروس در سرم بیماران بهبودیافته از کووید۱۹

تعداد ۴۵ سرم جمع‌آوری‌شده از افراد بهبودیافته از کووید۱۹، برای سنجش خنثی‌سازی استفاده شد. قبل از تعیین میزان خنثی‌سازی سرم‌ها، آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی علیه پروتئین اسپایک با استفاده از کیت الیزا اندازه‌گیری شد. برای سنجش خنثی‌سازی، یک رقت سریال دوبرابری از هر سرم تهیه شد و با ۱۰۰۰۰۰ TU/mL ذرات Lenti SARS-CoV2-S مخلوط شد. پس از انکوباسیون به مدت یک ساعت، مخلوط‌های سرم-ویروس کاذب به سلول‌های Lenti-X 293T در صفحات ۹۶چاهی (۱×۱۰^5 سلول در چاهک) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با استفاده از فلوسیتومتری بررسی شدند. میزان سطح خنثی‌سازی نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

1−(GFP expression activity in the experimental well/ GFP expression in a virus − infected well without serum) × 100%

رقتی که به‌کاهش ۵۰ درصدی عفونت‌کاذب درمقابل ویروس بدون سرم منجر شد، به‌عنوان تیتر خنثی‌کننده‌ی ۵۰ درصد(NT50) ثبت شد. در هر ارزیابی، از سرم فردی که تاکنون با SARS-CoV-2 مواجه نشده بود و ذرات Lenti-VSV-G به‌عنوان کنترل منفی، استفاده شد.

تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (ورژن ۹) گراف مقاله طراحی شد. داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شدند. میانگین داده‌های گروه کنترل به‌علاوه‌ی دو برابر انحراف معیار، cut-off در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی بیان پروتئین اسپایک و تعیین خصوصیات ذره‌ی سودوویروس

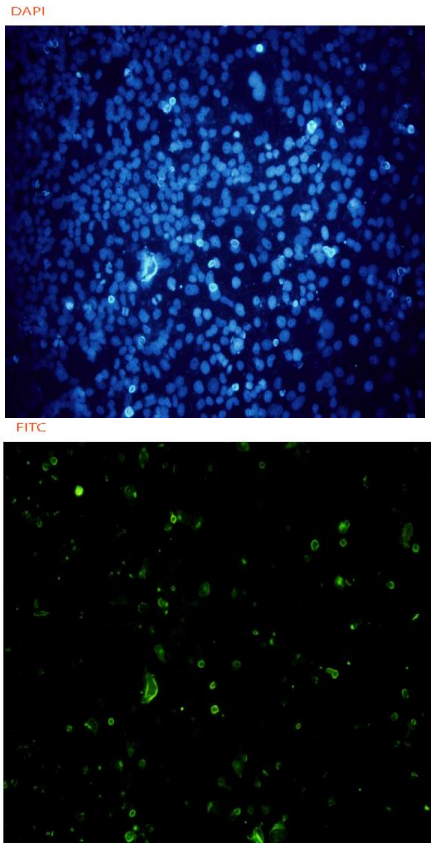
سنجش ایمونوفلورسانس برای ارزیابی بیان پروتئین اسپایک در رده‌ی سلولی Lenti-X 293T انجام شد. برای این منظور، سلول‌های Lenti-X 293T با pcDNA3.1.S یا ناقل خالی به‌تنهایی، ترانسفکت شدند. در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها با آنتی‌بادی ضدپروتئین اسپایک انکوبه شدند و با آنتی‌بادی کونژوگه با FITC ضد IgG رنگ‌آمیزی شدند تا بیان پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 تشخیص داده شود (تصویر شماره ۱). این روش بیان قوی پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 در شرایط آزمایشگاهی را نشان داد که نمودی از بیان این پروتئین در رده‌ی سلولی تولیدکننده‌ی ذرات Lenti-SARS-Cov2 S است.

نتایج TEM بیان پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 روی سطح ذرات Lenti-SARS-CoV2 S را تأیید کرد. هم‌چنین، نتایج نشان داد که این ذرات کروی هستند و قطری به اندازه‌ی ۸۰ تا ۱۲۰ نانومتر دارند (تصویر شماره۲).

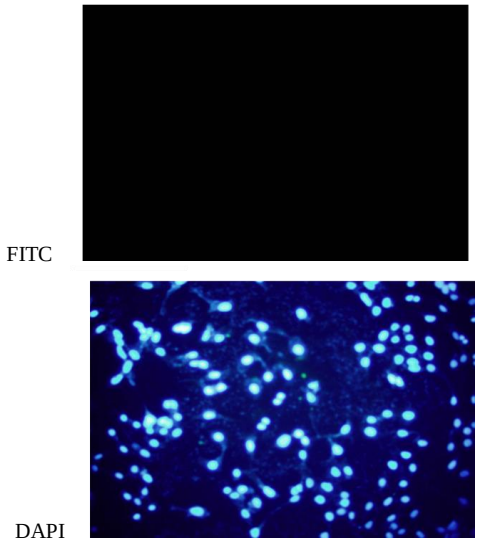
سطح خنثی‌سازی سرم بیماران بهبودیافته از کووید۱۹

نتایج تست خنثی‌سازی نشان داد که سرم‌های پولدشده‌ی افراد بهبودیافته می‌تواند نسبت به سرم‌های افرد کنترل بدون سابقه‌ی بیماری، در حداکثر تیتر ۱:۶۴، باعث نوترالیزه شدن ذرات سودوویروس سالم تحت تریتمنت شود. علاوه بر این، سطح تیتر NT50 در سرم بیماران بهبودیافته از کووید۱۹، ۱:۱۶ به دست آمد. همچنین، با رقیق‌سازی سرم، میزان خنثی‌سازی کاهش یافت و زمانی که ذرات سودوویروس با سرم افراد سالم تحت تریتمنت قرار گرفت، هیچ‌گونه خنثی‌کنندگی مشاهده نشد و این امر صحت تست را تأیید می‌کند (تصویر شماره ۳).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

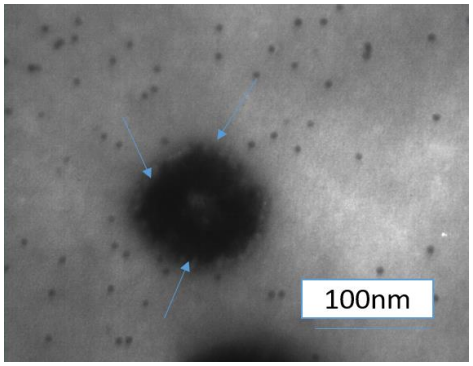


A) سلول‌ها با آنتی‌بادی ضداسپایک SARS-CoV-2 تیمار شدند و سپس، با آنتی‌بادی ثانویه‌ی ضد IgG کونژوگه با FITC و DAPI رنگ‌آمیزی شدند.

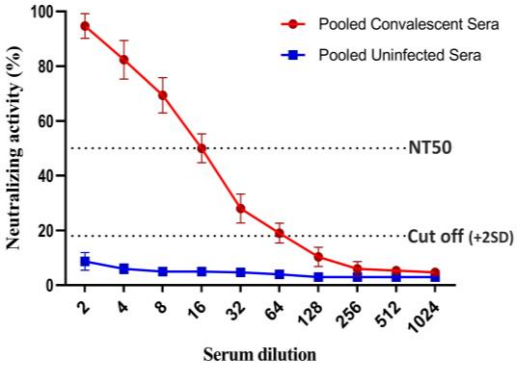


B) سلول‌های ترانسفکت‌نشده به‌عنوان کنترل منفی با آنتی‌بادی ضداسپایک SARS-CoV-2 انکوبه شدند و سپس، آنتی‌بادی‌های کونژوگه اضافه شدند.

تصویر شماره ۱: رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای تشخیص بیان پروتئین اسپایک SARS-CoV-2



تصویر شماره ۲: میکروگراف میکروسکوپ الکترونیکی انتقال ذرات Lenti-SARS-CoV2 S با فلش‌های آبی که نشان‌دهنده‌ی ذرات هستند. بزرگ‌نمایی: ۱۰۰۰۰۰×. نوار: ۱۰۰ نانومتر.



تصویر شماره ۳: پروتئین اسپایکSARS-Cov2 توسط سرم بیماران بهبودیافته و سرم افرادی که هرگز با ویروس مواجه نشده بودند (به‌عنوان کنترل منفی)، در تست pVNT اندازه‌گیری شد. پولد سرمی افراد بهبودیافته از کووید۱۹ و سرم‌های کنترل منفی به‌صورت سریالی، دو بار با DMEM رقیق شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از ذراتLenti-SARS-Cov2 S با سرم افراد بهبودیافته و افرادی که هرگز با ویروس مواجه نشده بودند، مخلوط شد.

بحث

به‌طور معمول، ارزیابی واکسن‌ها و روش‌های درمانی ویروس‌های نوظهور به استفاده از ویروس زنده‌ی جداشده نیاز دارد که باید از آن در شرایط کنترل زیستی سطح سه استفاده شود. علاوه بر این، کشت ویروس زنده به حدود سه روز زمان نیاز دارد و بسیار گران‌قیمت است(۱۸). واضح است که یافتن روش‌های جایگزین تست خنثی‌سازی ویروسی می‌تواند موجب تسهیل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

مطالعات، توسعه و ارزیابی واکسن‌ها و روش‌های درمانی SARS-CoV-2 شود. تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای شبه‌ویروس (pVNT) مزیت‌های زیادی نسبت به تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای ویروس زنده (cVNT) دارد(۱۹،۲۰). وجود پروتئین‌های پوششی ویروس روی شبه‌ویروس موجب تقلید ورود شبه‌ویروس به سلول یوکاریوتی مدنظر می‌شود. شبه‌ویروس بسیار ایمن‌تر است؛ زیرا اساساً فاقد اجزای ویروسی خطرناک است. pVNT نوعی روش خنثی‌سازی اختصاصی، حساس، دقیق و تکرارپذیر است. در مقایسه با cVNT، pVNT دارای خطای کم‌تری است و به اپراتور وابستگی ندارد؛ زیرا داده‌ها به‌طور خودکار، از طریق خواندن نور فلورسانت به دست می‌آیند، درحالی‌که اپراتور سنجش ویروس زنده باید نتایج را به‌صورت دستی زیر میکروسکوپ بخواند(۲۱). نتیجه مطالعه ما نشان داد که تیتر سودوویروس حاصل بسیار پائین است ($10^{3.5}$ TU/mL) و عوامل زیادی بر کارایی تولید ذرات شبه‌ویروسی تأثیرگذارند. از جمله این عوامل می‌توان به نسبت ترکیبات پلاسمیدهای بسته‌بندی، کارایی ترانسفکشن پلاسمید، وضعیت رشد سلول‌های HEK293T قبل از ترانسفکشن و زمان جمع‌آوری سوپرناتانت‌های شبه‌ویروس اشاره کرد(۲۲،۲۳).

در مطالعه حاضر، از نمونه‌های سرمی با فواصل زمانی مختلف بین اتمام بیماری و نمونه‌برداری، برای سنجش خنثی‌سازی استفاده شد. نتایج تست خنثی‌سازی نشان داد که سرم‌های پولدشده‌ی افراد بهبودیافته می‌توانند نسبت به سرم‌های افرد کنترل بدون سابقه بیماری، در حداکثر تیتر ۱:۶۴، باعث نوترالیزه شدن ذرات سودوویروس سالم تحت تریتمنت شود. علاوه بر این، سطح تیتر NT50 در سرم بیماران بهبودیافته از کووید ۱۹، ۱:۱۶ به دست آمد. هم‌چنین، با رقیق‌سازی سرم، میزان خنثی‌سازی کاهش یافت و زمانی که ذرات سودوویروس با سرم افراد سالم تحت تریتمنت قرار گرفت، هیچ‌گونه خنثی‌کنندگی مشاهده نشد و این امر صحت تست را تأیید می‌کند (تصویر شماره ۳). مطالعات گزارش داده‌اند که سطح آنتی‌بادی خنثی‌کننده که ۵۰ درصد از عفونت مجدد محافظت می‌کند، تقریباً ۲۰ درصد میانگین سطح آنتی‌بادی موجود در سرم افراد بهبودیافته است. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده می‌توانند از چهار تا شش ماه پس از بهبود، در بدن فرد باقی بمانند(۲۴-۲۶).

در نتیجه، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ذرات Lenti-SARS-CoV-2 S جایگزینی مناسب برای تست خنثی‌سازی ویروس بر مبنای ویروس زنده است و این تست به‌راحتی در آزمایشگاه‌های BSL-2 اجراشدنی است. این روش به‌طور بالقوه، می‌تواند برای مطالعاتی که درباره‌ی پیوستگی و همجوشی ویروس است نیز مفید باشد.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران برای حمایت از این تحقیق، با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.341، تشکر می‌کنیم.

References

1. Peck KM, Burch CL, Heise MT, Baric RS. Coronavirus host range expansion and Middle East respiratory syndrome coronavirus emergence: biochemical mechanisms and evolutionary perspectives. Annual review of virology 2015; 2(1): 95-117.
2. Mohammadi H, Ehteshaminia Y, Mahdavi SA. A Review on Prevention, Transmission and Symptoms of the COVID-19. Tabari Biomed Stu Res J 2020; 2(4).
3. Habibi A, Azizan A, Ehteshaminia Y, Jadidi-Niaragh F, Enderami E, Akbari E, et al. Design of a multi-epitope peptide vaccine against SARS-CoV-2 based on immune-

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

informatics data. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(190): 126-32 (Persian).

4. Ehteshaminia Y, Jalali SF, Jadidi-Niaragh F, Enderami SE, Pagheh AS, Akbari E, et al. Enhancement of immunogenicity and neutralizing responses against SARS-CoV-2 spike protein using the Fc fusion fragment. Life Sci 2023; 320: 121525.
5. Kaufer AM, Theis T, Lau KA, Gray JL, Rawlinson WD. Laboratory biosafety measures involving SARS-CoV-2 and the classification as a Risk Group 3 biological agent. Pathology 2020; 52(7): 790-5.
6. Fan C, Wu X, Liu Q, Li Q, Liu S, Lu J, et al. A human DPP4-knockin mouse's susceptibility to infection by authentic and pseudotyped MERS-CoV. Viruses 2018; 10(9): 448.
7. Nie J, Wu X, Ma J, Cao S, Huang W, Liu Q, et al. Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system. Scientific Reports 2017; 7(1): 42769.
8. Liu Q, Fan C, Li Q, Zhou S, Huang W, Wang L, et al. Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity-inducing antibodies significantly affect the post-exposure treatment of Ebola virus infection. Scientific Reports 2017; 7(1): 45552.
9. Zhang L, Li Q, Liu Q, Huang W, Nie J, Wang Y. A bioluminescent imaging mouse model for Marburg virus based on a pseudovirus system. Hum Vaccin Immunother 2017; 13(8): 1811-1817.
10. Li Q, Liu Q, Huang W, Wu J, Nie J, Wang M, et al. An LASV GPC pseudotyped virus based reporter system enables evaluation of vaccines in mice under non-BSL-4 conditions. Vaccine 2017; 35(38): 5172-5178.
11. Wu J, Zhao C, Liu Q, Huang W, Wang Y. Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system. Vaccine 2017; 35(47): 6387-6394.
12. Nie J, Liu L, Wang Q, Chen R, Ning T, Liu Q, et al. Nipah pseudovirus system enables evaluation of vaccines in vitro and in vivo using non-BSL-4 facilities. Emerg Microbes Infect 2019; 8(1): 272-281.
13. Ma J, Chen R, Huang W, Nie J, Liu Q, Wang Y, et al. In vitro and in vivo efficacy of a Rift Valley fever virus vaccine based on pseudovirus. Hum Vaccin Immunother 2019; 15(10): 2286-2294.
14. Vasmehjani AA, Salehi-Vaziri M, Azadmanesh K, Nejati A, Pouriayevali MH, Gouya MM, et al. Efficient production of a lentiviral system for displaying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoproteins reveals a broad range of cellular susceptibility and neutralization ability. Arch Virol 2020; 165(5): 1109-1120.
15. Pagheh AS, Sarvi S, Gholami S, Asgarian-Omran H, Valadan R, Hassannia H, et al. Protective efficacy induced by DNA prime and recombinant protein boost vaccination with Toxoplasma gondii GRA14 in mice. Microbial Pathogenesis 2019; 134: 103601.
16. Budi HS, Izadi S, Timoshin A, Asl SH, Beyzai B, Ghaderpour A, et al. Blockade of HIF-1α and STAT3 by hyaluronate-conjugated TAT-chitosan-SPION nanoparticles loaded with siRNA molecules prevents tumor growth. Nanomedicine 2021; 34: 102373.
17. Rahmani F, Ehteshaminia Y, Mohammadi H, Mahdavi SA. A Review on Diagnostic Methods for Trichomonas Vaginalis. Tabari Biomed Stu Res J 2021; 3(4): 35-43.
18. Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, Chen JI-P, et al. Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): a systematic review.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

J Clin Med 2020; 9(3): 623.

19. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MI-C, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. Nature biotechnology 2020; 38(9): 1073-1078.
20. Kolesov DE, Sinegubova MV, Dayanova LK, Dolzhikova IV, Vorobiev II, Orlova NA. Fast and accurate surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blocking of the interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 spike protein RBD. Diagnostics 2022; 12(2): 393.
21. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. Emerg Microbes Infect 2020; 9(1): 680-686.
22. Fu X, Tao L, Zhang X. Comprehensive and systemic optimization for improving the yield of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus. Mol Ther Methods Clin Dev 2021; 20: 350-356.
23. Li Q, Liu Q, Huang W, Li X, Wang Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. Rev Med Virol 2018; 28(1): e1963.
24. Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, Selva KJ, Reynaldi A, Tan H-X, et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. Nat Commun 2021; 12(1): 1162.
25. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. Science 2021; 371(6529): eabf4063.
26. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. Nature 2021; 591(7851): 639-644.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]