JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره اول، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۰: ۴۷-۳۹

بررسی تاثیر مستقیم نانوذره اکسید منیزیوم روی ویروس تب برفکی در شرایط آزمایشگاهی

سولماز رفیعی[۱]، سیده الهام رضاتوفیقی[*۲]، محمد رعایایی اردکانی[۳]، امید مددکار[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استاد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ، ایران

تاریخ دریافت: ۱٤ بهمن ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱ خرداد ۱۳۹۳

چکیده

بیماری تب برفکی که توسط ویروس آن ایجاد می‌شود مسری ترین بیماری در پستانداران است و در زوج سمان مستعد به بیماری باعث صدمات گسترده اقتصادی می‌گردد. با توجه به عدم حضور ایمنی یکسان علیه همه سروتیپ‌های ویروسی کنترل بیماری تب برفکی از راه واکسیناسیون دشوار است. بنابراین برای مهار شیوع ویروس تب برفکی، استفاده از ضدعفونی کننده توسط مقامات بهداشتی توصیه شده است. این مطالعه برای بررسی خصوصیات ضدویروسی نانوذرات اکسید منیزیوم به عنوان ضدعفونی کننده بررسی شد. غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید منیزیوم با کمک محیط کشت سلولی RPMI 1640 تهیه شد و با تیره سلولی کلیه گاو ساخت موسسه رازی مجاور شد. سمیت سلولی با استفاده از روش MTT بررسی شد. غلظت‌های مختلف سروتیپ O ویروس تب برفکی با غلظت غیرسمی نانو ذره مجاور گردید و یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس با سلول مجاور گردید. برای ویروس و همچنین ویروس مجاور شده با نانوذره با استفاده از روش Reed and Munech عیار ویروس که در ۵۰ درصد از کشت سلول‌ها آلودگی ایجاد می‌کند (TCID50%) محاسبه گردید. بر اساس روش MTT نانوذره اکسید منیزیوم در غلظتی برابر ۲۵۰ µg/ ml یا کمتر هیچ سمّیتی برای سلول ندارد. مجاور کردن ویروس با نانوذره باعث کاهش قدرت ویروس به میزان $10^{3.5}$ (۳۱۶۲) برابر گردید. در مجموع نانوذره اکسید منیزیوم دارای اثر ضدویروسی در محیط می‌باشد و می‌توان از آن به عنوان یک ضدعفونی کننده استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *نانوذره، اکسید منیزیوم، ویروس تب برفکی*

*نویسنده مسئول: سیده الهام رضاتوفیقی

آدرس: اگروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن (۳۵۹۴) ۱۹-۰۶۱۱۳۳۳۰۰۱۰

پست الکترونیک: e.tofighi@scu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری تب‌برفکی یک بیماری حاد و شدید واگیردار است که توسط ویروس آن در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی نظیر گاو، گوسفند، بز، گوزن و خوک ایجاد بیماری می‌شود. بیماری تب‌برفکی از نظر خسارت‌های اقتصادی که به صنعت دام وارد می‌سازد بسیار حائز اهمیت است. شدت واگیری در دام‌های حساس بسیار بالا بوده ولی میزان مرگ ومیر پایین و عمدتا دام های جوان را دربر می‌گیرد (۲ و۵). این بیماری بیشتر در جمعیت‌های دامی مطرح بوده و خسارات اقتصادی بسیار زیادی را به همراه دارد و به دلیل عواملی همچون سرعت انتشار و شدت عفونت‌زایی، جزء مهمترین بیماری‌های ویروسی دام محسوب می‌گردد به طوری که در رده‌بندی بیماریهای دام در گروه A (طبقه‌بندی بیماری‌های دفتر بین‌المللی بیماری‌های واگیر دام) قرار گرفته است. در کشور ما نیز این بیماری مهمترین عامل تهدیدکننده‌ی سرمایه و تولیدات دامی و اولین بیماری دامی در جدول مبارزه با بیماری‌های دام محسوب می‌گردد (۲ و۱۰). ویروس تب‌برفکی از خانواده‌ی *پیکورناویریده*، جنس *آفتوویروس* است که دارای ۷ سروتیپ مشخص و بیش از ۶۰ تحت تیپ از نظر ایمونولوژی می‌باشد. تیپ‌های تب‌برفکی عبارتند از: SAT2 ، Asia1،C ، O، A، SAT1 و SAT3. تیپ‌های مذکور از نظر خواص آنتی‌ژنی با هم متفاوت بوده و واکسن ساخته شده برای یک تیپ قادر به ایجاد ایمنی در مقابل سایر تیپ‌ها نمی‌باشد (۵،۲ و۷). درمان اختصاصی برای این بیماری وجود ندارد و معمولا بهترین وسیله پیشگیری است (۲). نانوذرات از زمان های بسیار دور مورد استفاده قرار می‌گرفتند. شاید اولین استفاده‌ی آنها در لعاب‌های چینی سلسله‌های ابتدایی چین بوده است. همچنین بطور گسترده‌ای بعنوان یک عامل ضدباکتریایی در لوازم جراحی و دندانپزشکی و سوختگی‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند (۴ و ۱۱). نانوذرات دارای ویژگی‌های بسیار خاص شیمیایی و فیزیکی از نظر اندازه، شکل و نسبت بالای سطح به حجم می‌باشند که این صفات کاربرد آنها را در بسیاری از موارد پزشکی و بیولوژیک مناسب ساخته است. گاهی اندازه‌ی آنها کوچکتر و یا در حد ساختارهای سلولی، ویروس و پروتئین می‌باشد. این مواد پس از تزریق به جانوران به سرعت در اکثر اندام‌ها و بافت‌ها توزیع شده و پدیده‌ی جذب سلولی آنها بسیار شدید می‌باشد (۱). بهره بردن از نانوذرات در زمینه‌های پزشکی و داروسازی به سرعت در حال توسعه است. نانوذرات مغناطیسی در حال حاضر در زمینه‌های مربوط به زیست شناسی مولکولی بسیار استفاده می‌شوند. نانومواد شامل نانوذرات در خالص سازی آب‌ها، برای کاهش غلظت ترکیبات سمی (یون‌های فلزی، ترکیبات آلی و معدنی، باکتری‌ها و ویروس‌ها) استفاده می‌شود (۳). یکی از نانوذرات کاربردی در صنعت و پزشکی، نانو ذره‌ی اکسید منیزیم (MgO) می‌باشد. مطالعات نشان داده که می‌توان از نانوذره اکسید منیزیم به تنهایی یا به صورت توأم با دیگر گروه‌های ضدمیکروبی و به عنوان یک عامل بالقوه مؤثر ضدباکتریایی جهت افزایش ایمنی مواد غذایی استفاده کرد (۱۶). با توجه به گستردگی کاربرد نانو ذرات تا کنون مطالعات گوناگونی در خصوص اثرات مختلف نانو ذرات از جمله اکسید منیزیم بر روی سلول‌ها انجام شده است. اثرات نانوذره اکسید منیزیم بر سلول‌های اپیتلیال آلوئولار (۱۱)، سلول‌های عصبی و فیبروبلاست (۱۲) و سلول‌های تک هسته‌ای خون (۶) بررسی شده است. علی رغم این موضوع تاکنون مطالعات کمی روی اثر این نانوذرات بر عوامل ویروسی انجام گرفته است.

Archive of SID

www.SID.ir

هدف از این مطالعه بررسی اثر خنثی سازی ویروس تب برفکی توسط نانوذره منیزیوم و استفاده از این نانوذره به عنوان یک ضدعفونی کننده محیطی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و ویروس

برای تکثیر ویروس از تیره سلولی کلیه گاو Iran-Razi-Khedmati Bovine (IRKHBK) Kidney که تحت عنوان RBK شناخته می‌شود، استفاده شد. سلول ها در محیط کشت (Bio Idea, RPMI1640 (Scotland حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (GIBCO) و آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰unit/ml)- استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml)، (Penestrep) (Bio Idea, Scotland) کشت داده شد. محیط‌های کشت در انکوباتور CO2 (Heraeus, Germany) در دمای ۳۷°C، CO2 ۵٪ انکوبه شد. پس از تشکیل لایه کامل و یک دست سلول، ویروس تب برفکی (موسسه واکسن وسرم سازی رازی) (FMDV Type O IRN/1/2007) به کشت سلول اضافه شد. ابتدا محیط کشت سلول خارج شد. ۳۰۰ میکرولیتر از ویروس به فلاسک ۵۰ میلی لیتری سلول اضافه شد. کشت سلول حاوی ویروس به مدت ۱ ساعت در انکوباتور نگهداری شد تا ویروس به سلول متصل شود. سپس ویروس خارج شده و سلول‌ها به آرامی با PBS شستشو داده شد و پس از آن محیط کشت جدید حاوی ۲٪ سرم اضافه شد. سلول‌ها تا زمان تشکیل Cytopathic effect (CPE) ناشی از ویروس در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از ظاهر شدن CPE از مایع رویی سلول به عنوان منبع ویروس برای مراحل بعدی آزمایش استفاده شد.

نانوذره اکسید منیزیم

نانو ذره اکسید منیزیم استفاده شده در این مطالعه از شرکت لولیتک آلمان (Lolitech, Germany) دارای ویژگی‌های وزن مولکولی 40.30، قطر 40nm و شکل تقریبا کروی تهیه گردید.

آزمایش بررسی سمیت نانوذره منیزیوم در کشت سلول

در مرحله اول سمیّت (Cytotoxicity) نانوذره بررسی شد تا از غلظتی استفاده شود که اثر سمی روی سلول نداشته باشد. برای ارزیابی سمیت نانوذره از روش MTT assay استفاده شد (۱۳).

MTT (3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) به صورت محلول در آب و به رنگ زرد است. به راحتی توسط دهیدروژنازهای موجود در میتوکندری سلول‌های زنده احیا می‌شود و به رنگ ارغوانی در می‌آید. این امر به دلیل تشکیل نمک‌های فورمازان است که درآب به صورت نامحلول هستند ولی به راحتی در DMSO و یا ایزوپروپانول حل می‌شوند و می‌توان جذب نوری آنها را با دستگاه الیزا ریدر در طول موج۵۸۰nm اندازه گیری کرد (۱۳). برای انجام این آزمایش ابتدا سلول‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول کشت داده شد. به هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی 1×10^5 سلول RBK همراه با محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی افزوده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C و ۵٪ CO2 برای بررسی سمیت نانوذره استفاده شد. از نانوذره غلظت‌های ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ µg/ml در محیط کشت سلولی فاقد سرم تهیه شد. محیط کشت سلول خارج و از هر غلظت ۱۰۰ میکرولیتر به هر گوده اضافه شد. برای هر غلظت سه گوده در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

به سه گوده محیط کشت سلول فاقد نانوذره به عنوان شاهد اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گذاری شدند. برای بررسی اثر سمیت نانوذره پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط کشت حاوی نانوذره خارج و سلول‌ها با PBS شتشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از MTT با غلظت ۵mg/ml به هر گوده اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوبه‌گذاری شد.سپس به هر گوده ۱۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید.

پس از شیک کردن و حل شدن کریستال های فورمازان محلول رویی به پلیت الیزا منتقل گردید و جذب آن در ۵۸۰nm با کمک دستگاه الیزا ریدر(Bio Rad) اندازه گیری شد.

تعیین عیار ویروس با استفاده از تست TCID50٪

به مقدار ویروس در واحد میلی لیتر که توان ایجاد CPE در ۵۰٪ از سلول‌های تلقیح شده را دارا باشد ٪ TCID50 گفته می‌شود که با روش Reed &Meunch محاسبه می‌گردد. برای انجام این تست از میکروپلیتهای ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول استفاده شد. به این ترتیب که در هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱×۱۰^{۵} سلول RBK همراه با محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی افزوده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C و ۵٪ CO2 و تشکیل تک لایه سلولی، محیط کشت خارج شده و پس از ۲ بار شستشو با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های۱ تا $۱۰^{-۶}$ ویروس به هر چاهک اضافه گردید به مدت یک ساعت در مجاورت سلول قرار گرفت. برای هر رقت ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت علائم سیتوپاتیک در چاهک ها بررسی ونتایج یادداشت شد. سپس با استفاده از روش Reed & Meunch عیار ویروسی تعیین گردید (۱۵).

تعیین میزان خنثی‌سازی ویروس توسط نانوذره

برای این منظور ابتدا غلظت غیرسمی نانوذره (۲۵۰µg/ml) با رقت های مختلف ویروس۱ تا $۱۰^{-۶}$ مجاور گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه افزوده شد و برای هر رقت سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۲ بار شستشو با PBS به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۲ درصد سرم افزوده شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نتایج مشاهده و یادداشت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و میانگین±SEM محاسبه گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقادیر $P<0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

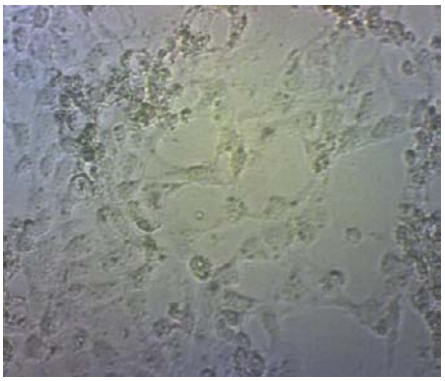
نتایج

کشت ویروس و محاسبه TCID50٪

پس از رشد سلول‌ها و تشکیل تک لایه سلولی ویروس تب برفکی به سلول‌ها اضافه شد. ویروس پس از ۷۲ ساعت در محیط کشت سلول CPEهای کاملا مشخص ایجاد کرد. ویروس تب برفکی در سلول RBK باعث گردشدن، جمع شدن، کندن و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شد و در محیط کشت پلاک‌های ناشی از ویروس مشاهده می‌شد (تصویر ۱). برای محاسبهTCID50٪ ویروس از روش Reed &Meunch استفاده شد. براین اساس غلظت ویروس در هر میلی لیتر برابر $۱۰^{-۳.۵}$ محاسبه گردید.

Archive of SID

www.SID.ir



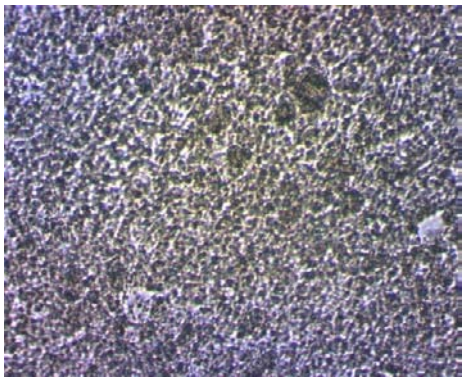
تصویر ۱: اثر ویروس تب برفکی بر سلول‌های RBK پس از ۷۲ ساعت. ظهور CPE و تغییر شکل سلول‌ها در اثر ویروس

محاسبه سمیت نانوذره منیزیوم روی کشت سلول

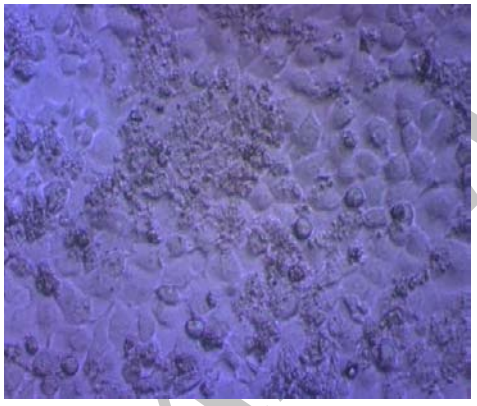
مشاهده شد که سلول‌ها پس از مجاورت با غلظت‌های بالای نانوذره به تدریج دچار تغییرات می‌شوند. در غلظت ۸۰۰ µg/ml از نانوذره منیزیوم پس از گذشت ۲۴ ساعت به تدریج نشانه‌هایی از ریز شدن، جمع‌شدن و سپس مرگ سلول‌ها مشاهده شد (تصویر۲). پس از گذشت ۴۸ ساعت در غلظت ۵۰۰ نیز به تدریج علائم مرگ سلولی ظاهر شد (تصویر۳) ولی در بقیه گودها حتی پس از گذشت ۷۲ ساعت هیچ علامتی دال بر آسیب یا مرگ سلولی مشاهده نشد (تصویر۴). همانگونه که در تصویر ۱ و ۲ مشاهده می‌شود مرگ سلول‌ها ناشی از سمیت نانوذره کاملا با الگوی مرگ سلول‌ها ناشی از عفونت ویروسی متفاوت است. برای اندازه گیری میزان سمیت نانوذره از روش MTT assay استفاده شد. میزان مرگ سلولی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (۱۸).

$$\text{Cytotoxicity \%} = 100 - \left(100 \times \frac{Sample\ absorbance}{Control\ absorbance}\right)$$

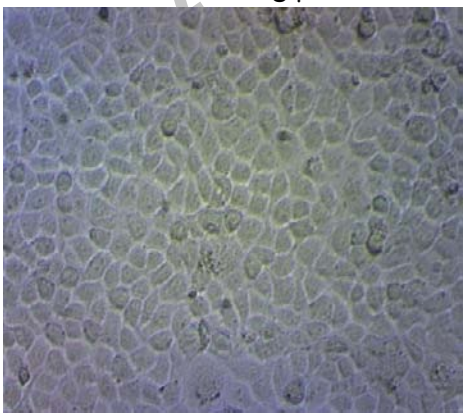
نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر این اساس CC50 (Cell Cytotoxicity 50%) برابر با غلظت حدود ۴۰۰µg/ml بدست آمد. نانوذره در غلظت ۲۵۰µg/ml هیچ گونه سمیتی برای سلول‌ها نداشت. میزان‌زنده ماندن سلول‌ها در غلظت ۲۵۰µg/ml و پایین‌تر از آن از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). در حالی که این اختلاف بین غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰µg/ml از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0.05$).



تصویر ۲: اثر نانوذره منیزیوم با غلظت ۸۰۰µg/ml بر سلول‌های RBK پس از ۲٤ ساعت



شکل ۳: اثر نانو ذره منیزیوم با غلظت ۵۰۰µg/ml بر سلول‌های RBK پس از ۲٤ ساعت



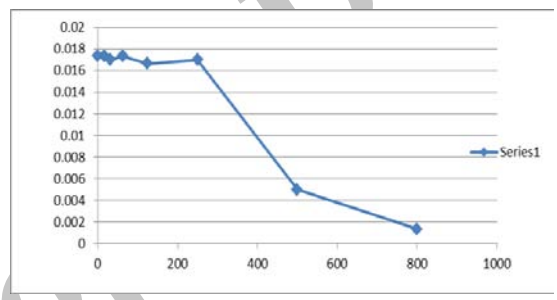
تصویر٤: سلول‌های RBK مجاور با ۲۵۰ µg/ml از نانوذره اکسید منیزیوم پس از گذشت ۷۲ ساعت

Archive of SID

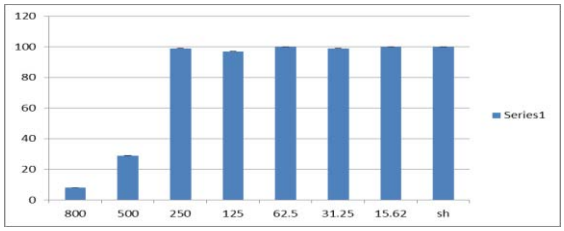
www.SID.ir

میزان خنثی سازی ویروس با نانوذره

در این مطالعه TCID50 ویروس بدون نانوذره برابر با $10^{-3.5}$ در هر میلی لیتر بدست آمد. پس از مجاور کردن ویروس و نانوذره در هیچ یک از گودهها CPE ناشی از ویروس مشاهده نشد. در این مرحله TCID50 ویروس برابر با صفر محاسبه گردید. بنابراین توان خنثی سازی ویروس توسط نانوذره برابر با $10^{3.5}$ بدست آمد. بدین ترتیب نانوذره ۳۱۶۲.۲۸ مرتبه از قدرت ویروس کاسته است.



نمودار ۱: اندازه گیری میزان جذب نوری مایع رویی کشت سلول در طول موج ۵۸۰ nm پس از مجاور شدن سلول با غلظت‌های مختلف نانوذره منیزیوم براساس روش MTT (محور افقی مقدار نانوذره بر اساس µg/ml و محور عمودی میزان جذب نوری)



نمودار ۲: درصد سلول‌های زنده پس از مجاور شدن با غلظت‌های مختلف نانوذره بعد از گذشت ۷۲ ساعت. (محور افقی میزان نانوذره برحسب µg/ml و محور عمودی درصد سلول‌های زنده)

بحث

ویروس تب برفکی ویروسی بسیار مسری است. به راحتی در محیط منتشر می‌شود و می‌تواند از دامی به دام دیگر منتقل شود. در مناطق پاک از نظر ویروس در صورت مشاهده بیماری کل دامها تا شعاع معینی از منطقه ظهور بیماری معدوم می‌گردد. ولی در مناطقی که بیماری به صورت اندمیک است معمولا برای پیشگیری از واکسیناسیون علیه ویروس و راهکارهای دیگر از جمله ضدعفونی کردن محیط دامداری، وسایل و تجهیزات استفاده می‌شود (۲). ضدعفونی کننده مناسب علاوه بر این که باید قدرت ویروس کشی مناسب داشته باشد باید از لحاظ اقتصادی به صرفه بوده و ضرری برای انسان و یا دام نداشته باشد. در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات منیزیوم علی رغم نیاز به میزان کم آنها توانایی ویروس کشی بسیار مناسبی دارند به طوری که نانوذره توانست در غلظت بسیار پایین (۲۵۰µg/ml) تا بیش از ۳۱۶۲ بار از قدرت ویروس بکاهد. از آنجایی که ویروس تب برفکی ویروسی بدون غشا است می‌تواند در سایه و در دمای پایین تا مدت زیادی پایدار بماند. در این مطالعه مشخص شد که مجاورت حدود یک ساعت ویروس با نانوذره کافی است تا ویروس به طور کامل ازبین برود. در عین حال این غلظت از نانوذره هیچ گونه سمیّتی در سلول نشان نداد. بنابراین می‌توان از نانوذره منیزیوم بخصوص برای ضدعفونی کردن وسایلی که قابل استریل نیستند استفاده کرد و یا از آن در حوضچه‌های ضدعفونی در دامداری استفاده کرد. البته لازم به ذکر است که ویروس پس از این که در محیط قرار گرفت ممکن است در کنار محافظت کننده‌های محیطی قرار گیرد و قاعدتا در چنین شرایطی دسترسی ماده ضدعفونی کننده به ویروس دشوار می‌گردد که این امر نیاز به مطالعات بیشتری دارد. نانوذرات اکسید منیزیوم تمایل به جذب هالوژن‌ها در سطح خود دارند بنابراین دارای بار منفی هستند (۱۴). ویروس تب برفکی فاقد غشا و دارای کپسید پروتئینی اطراف اسید نوکلئیک می‌باشد. اکسید منیزیوم تمال به حمله به پیوندهای پپتیدی دارد (۹) که این امر باعث تماس مستقیم نانوذره با ویروس و اثر بر آن می‌شود. البته مکانیسم دقیق اثر ضدویروسی نانوذره نیاز به مطالعات گسترده تری دارد. تا کنون مطالعه‌ای در

Archive of SID
www.SID.ir

خصوص بررسی اثر ضدویروسی نانوذره‌ی منیزیم بر روی ویروس تب برفکی صورت نگرفته و یا نتایج آن تا کنون چاپ نشده است. فقط در مطالعاتی که توسط کوپر و همکاران (۲۰۰۲)، استوایمنو و همکاران (۲۰۰۲) و ساوای (۲۰۰۳) صورت گرفته مشخص شده است که اکسید منیزیم دارای اثرات مهارکنندگی علیه اسپورها، قارچ‌ها و ویروس‌ها می‌باشد (۱۷). همچنین اثرات سمی این نانوذره بر روی سلول‌های RBK بررسی نشده است لذا مقایسه نتایج این مطالعه صرفا با اثرات این نانوذره بر روی سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های عصبی و همچنین اثرات ضدویروسی نانوذره نقره میسر می‌باشد. در این مطالعه مشخص شد که غلظت‌های ۵۰۰ µg/ml به بالا دارای اثرات سمی بر روی سلول‌های RBK بعد از ۲۴ ساعت می‌باشد ولی در غلظت‌های ۲۵۰ µg/ml و پایین تر فاقد اثر سمی هستند که این نتایج با نتایج Geو همکاران همخوانی دارد (۸). در سایر بررسی‌ها در مورد اثر سمیّت نانوذره اکسید منیزیوم روی کشت سلول هیچ گونه سمیتّی در غلظت بالاتر از ۲۰۰ µg/ml مشاهده نشد (۶،۱۱و۱۲). در مطالعه‌ای که توسط Elechiguerra و همکاران (۷) صورت گرفت مشخص شد که نانوذره‌ی نقره با اثر برgp120 ویروس HIV-1 باعث مهار ویروس می گردد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه شهید چمران اهواز کلیه منابع مالی این پژوهش از محل پژوهانه شماره ۸۶۷۶۱۵ تامین شده است.

منابع

۱. آقابابا، ح.، کریمی، ف.، نوری، ع. (۱۳۹۱). تغییرات آنزیمی و بافتی کبد موش سوری در اثر تزریق نانوذرات اکسید روی. اولین همایش ملی استاندارد و ایمنی در فناوری نانو.

۲. پورتقی، غ.، توکلی، ر.، توکلی، ح.، رفعتی، ح.، عامریون، الف.، کریمی، الف.، معصوم بیگی، ح.، سنایی نسب، ه. (۱۳۸۹). تب برفکی. *فصلنامه‌ی علمی و آموزشی دفتر توسعه‌ی آموزش دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)*، دوره ۱۰، شماره ۳۷، صفحات ۲۵-۱۶.

۳. جعفری، س.، حسندخت، م. ر.، سعادتی، م. و جعفری، ف. ۱۳۹۱. کاربردها، مضرات و مدیریت اثرات نانوذرات بر محیط زیست. اولین همایش ملی استاندارد و ایمنی در فناوری نانو.

۴. خسروی اقبال، ر.، اخوان سپهی، ع. و خنافری، الف. ۱۳۸۹. بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره و مس و مقایسه با هیپوکلریت سدیم بر روی سلول رویشی و اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس*. *مجله‌ی علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی*، دوره ۲، شماره ۷، صفحات ۴۴-۳۷.

۵. معتمدی سده، ف.، سلیمان جاهی، ح.، جلیلیان، الف.، مهروانی، ه. (۱۳۹۰). ساخت ناقل بیانی حاوی ژن VP1 ویروس تب برفکی سویه‌ی O(FMDV typeO/IRN/1/2007)، تأیید پروتئین تولید شده در سلول‌های کلیه‌ی بچه هامستر (BHKT7) و ارزیابی پاسخ ایمنی در مدل موشی. *مجله‌ی علوم پزشکی مدرس، آسیب شناسی زیستی*، دوره ۱۴، شماره ۳، صفحات ۷۹-۶۹.

6. Barkhordari, A., Barzegar, S., HekmatiMoghadam, H., Jebali, A., Fallahzadeh, H. (2012). The cytotoxicity effects of MgO nanoparticles on human blood mononuclear cells. *Occupational Medicine Quarterly Journal* **3**: 9-14.

7. Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., Yacaman, M.J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with

Archive of SID

www.SID.ir

HIV-1 virus. *Journal of Nanobiotechnology* **29**: 3-6.
8. Ge, S., Wang, G., Shen, Y., Zhang, Q., Jia, D., Wang, H. (2011). Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Nanobiotechnology* **5**: 36-40.
9. Huang, L., Li, D-Q., Lin, Y-J., Wei, M., Evans, D.G., Duan, X. (2005). Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**: 986-93.
10. Jeirani, F., Ahmadi, A., Azimi, M., Mahravani, H. (2012). Rapid and accurate diagnosis of Foot and Mouth Disease virus by Real-time PCR in field samples. *Razi Vaccine and Research Institue* **67**: 101-7.
11. Lu, S., Duffin, R., Poland, C., Daly, P., Murphy, F., Drost, E. (2009). Efficacy of simple short-term *in vitro* assay for predicting the potential of metal oxide nanoparticles for cause pulmonary inflammation. *Environmental Health Perspectives* **117**: 241-5.
12. Lai, J.C.K., Lai, M.B., Jandhyam, S., Dukhande, V.V., Bhushan, A., Daniels, C.K. (2008). Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International Journal of Nanomedicine* **3**: 533.
13. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63.
14. Pelgrift, R.Y., Friedman, A.J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**: 1803-15.
15. Reed, L.J., Muench, H. (1932). A simple method for estimating 50% endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**: 493-7.
16. Shi, L.E., Xing, L., Hou, B., Ge, H., Guo, X., Tang, Z. (2010). Inorganic nano mental oxides used as anti-microorganism agents for pathogen control. *Current Research Education Technology Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* **2**: 361-8.
17. Tony, J., Yiping, H. (2011). Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Nanoparticle Research* **13**: 6877-85.
18. Vahabpour, R., Sadat, S.M., Zabihollahi, R., Ahmadi, A., Keivani, H., Amini, S., Siadat, S.D., Aghasadeghi, M.R. (2012). *In vitro* inhibitory effects of the herbal-marine compound HESA-A against replication of human immunodeficiency virus-1. *Jundishapur Journal of Microbiology* **5**: 315-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 1, 2015

In Vitro Study on the Direct Effect of Magnesium Oxide Nanoparticles on Foot and Mouth Disease Virus

Rafiei, S.[1], Rezatofighi, S.E.[2*], Roayaei-Ardakani, M.[3], Madadkar, O.[4]

1- Student of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received date: 3 February 2013 *Acceptance date: 22 May 2014*

Abstract: *Foot and mouth disease (FMD) caused by FMD virus is the most contagious disease of mammals and has a great potential for causing severe economic loss in susceptible cloven-hoofed animals. According to the absence of reciprocal protection among all the serotypes it is difficult to control FMD through vaccination. Therefore in order to prevent spread of FMDV, antiseptics are considered by world health authorities. This study was designed to investigate the antiviral properties of MgO nanoparticles as a disinfectant. Different concentrations of MgO nanoparticles were prepared in RPMI 1640 media and exposed to cell culture (Iran-Razi-Khedmati Bovine Kidney cell line). Cell toxicity was determined by MTT assay. Different concentrations of FMDV (O serotype) were treated with non cytotoxic concentration of MgO nanoparticles and incubated in 4˚C for 1hour and then added to cell culture. TCID50% (50% Tissue Culture Infectious Dose) of the virus as well as treated viruses was assayed by Reed and Munech method. Based on MTT assay, MgO nanoparticles had not any cytotoxic effect on cell culture in concentrations ≤ 250 µg/ ml. Treatment with MgO nanoparticles reduced the titers of viruses about $10^{3.5}$ (3162) fold compared to those of the controls. In conclusion, MgO nanopaticles have environmental antiviral effect on FMDV and could be used as disinfectant agent.*

Keywords*: Nanoparticle, MgO, Foot and mouth disease virus*

[*]Corresponding author: Rezatofighi, S.E.
Address: Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Tel: 06112230010-19 (3594).
Email: e.tofighi@scu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir