Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵

غیرفعال‌سازی ویروس *Rhabdovirus carpio* (ویروس ویرمی بهاره کپور) با استفاده از نانوذرات نقره در سلول‌های رده EPC

بابک رمضانی عاقله[۱]، محدث قاسمی[۲]*، حجت‌اله زمانی[۳]

تاریخ دریافت: شهریور ۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۹۵

چکیده

در میان عوامل بیماری‌زای آبزیان، نقش ویروس‌ها از همه بارزتر بوده، خسارات وارده به علت درمان‌ناپذیری، سرایت‌پذیری شدید و تشخیص دشوار مهم‌تر از سایر عوامل بیماری‌زا است. در این مطالعه اثر ضدویروسی نانوذرات نقره بر ویروس *Rhabdovirus carpio*، عامل ویرمی بهاره کپور (SVCV)، از طریق مواجه‌سازی سلول‌های EPC آلوده به ویروس با نانوذرات نقره بررسی شد. در ابتدا سمیت سلولی نانوذرات نقره بر روی تیره سلولی تعیین شد و از غلظت‌های پایین‌تر از غلظت نیمه سمی ($۰/۵CC_{50}$) برای مواجه‌سازی استفاده شد. مواجه‌سازی سلول‌های آلوده به ویروس با نانوذرات نقره به دو روش تلقیح همزمان و تلقیح با تاخیر چهار ساعته انجام شد. سلول‌های تلقیح شده، به مدت شش روز، از نظر بروز آثار آسیب سلولی و تغییرات جمعیت سلول‌های زنده بررسی شدند. بر اساس نتایج، غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره در سلول‌های EPC ۶۲mg/L تعیین شد. همچنین، میزان تلفات سلولی در دو تیمار تلقیح همزمان و تاخیری به ترتیب ٪۳۹ و ٪۲۶ بود، در حالی که در این مدت ٪۱۰۰ سلول‌های شاهد آلوده با ویروس خالص تخریب شدند. بر اساس این مطالعه، نانوذرات نقره در غلظت‌های با سمیت کم از قابلیت مناسبی در غیرفعال‌سازی ویروس ویرمی بهاره کپور برخوردار است و می‌تواند به عنوان یک عامل ضدویروسی در مهار عفونت حاصل از SVCV در آبزی‌پروری مدنظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *آبزی‌پروری، عامل ضدویروسی، ویرمی، نانوذره.*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۲- استادیار پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.
۳- استادیارگروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: mohades@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نانوذرات به ذراتی گفته می‌شوند که حداقل یکی از ابعاد آن‌ها در محدوده ۱۰۰-۱ نانومتر باشد. نانوذرات فلزی به دلیل کاهش قطر و در نتیجه افزایش سطح، افزایش تحرک و همچنین برخوردپذیری بیشتر، در مقایسه با ذرات فلزی بزرگ‌تر، خواص جدیدی را از خودشان بروز می‌دهند (Pokharkar et al., 2014). به همین دلیل و با توجه به افزایش دانش و توانایی بشر در تولید و استفاده از آن‌ها، اخیرا نانوذرات توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند. امروزه از نانوذرات در گستره وسیعی از علوم و صنایع استفاده می‌شود. کاربردهای فناوری نانو مانند نانوسنسورها، نانوواکسن‌ها و دارورسانی هوشمندانه، توانایی حل بسیاری از مشکلات مربوط به سلامت و تولیدمثل و پیشگیری و کنترل عفونت را شامل می‌شود (Pokharkar et al., 2014).

ویژگی‌های ضدمیکروبی نقره از دیرباز مورد توجه قرارداشته است. اخیرا نانوذرات نقره به دلیل قابلیت ضدمیکروبی مناسب در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و ترکیبات ضدعفونی‌کننده و گندزدا مورداستفاده وسیعی قرار گرفته‌اند (Ahamed et al., 2010). با این وجود، نانوذرات نقره همچون بسیاری از مواد ضدمیکروبی قادر به ایجاد اثرات سمیت در موجودات زنده در درجات مختلف است. بنابراین تعیین غلظت‌های با سمیت پایین و در عین‌حال با کارایی بهینه برای به کارگیری در صنایع و مصارف گوناگون حائز اهمیت است (Ahamed et al., 2010).

ویرمی بهاره کپور یا SVC (Spring Viraemia of Carp) نام یک بیماری به شدت کشنده و مسری در خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) و بسیاری از گونه‌های دیگر ماهیان است. مهم‌ترین علائم بیماری شامل خونریزی‌های زیرپوستی، تورم شکمی، بیرون‌زدگی چشم‌ها، خونریزی و چسبیدگی تیغه‌های آبششی، عدم تعادل و در نهایت مرگ ماهی است. میزان تلفات گاهی تا ٪۷۰ نیز گزارش شده است (Ahne et al., 2002). بنابراین شیوع این بیماری به میزان بسیار زیادی می‌تواند تاثیرات مخرب اقتصادی و زیست‌محیطی برجای گذارد. عامل این بیماری، *Rhabdovirus carpio* است که به ویروس بیماری ویرمی بهاره کپور (SVCV) نیز معروف است. این ویروس متعلق به خانواده Rhabdoviridae و جنس *Vesiculovirus*

www.SID.ir

Archive of SID

بوده، دارای ظاهری فشنگی شکل و پوشینه لیپیدی است (Ahne et al., 2002). این ویروس انتشار جهانی دارد و بنا بر گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) در زمره خطرناک‌ترین ویروس‌های آبزیان به شمار می‌آید (OIE, 2012).

وقتی عامل این بیماری در منطقه‌ای تثبیت شود، حذف آن بسیار مشکل بوده و نیازمند از بین بردن کلیه اشکال حیات آبی در مناطق آلوده است. انتقال این ویروس بین ماهیان اغلب به صورت افقی (ماهی- ماهی) و از طریق ترشحات و مدفوع ماهی آلوده رخ می‌دهد (OIE, 2012). همچنین برخی از بی‌مهرگان آبزی همچون *Argulus foliaceus* و *Piscicola geometra*، که انگل ماهیان هستند، می‌توانند نقش حامل ویروس را ایفاء کنند (Ahne et al., 2002; Dixon, 2008).

مطالعات متعددی در سالیان گذشته به منظور بررسی قابلیت نانوذرات نقره در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، انجام پذیرفته است که در بسیاری از موارد، کارایی مناسب این نانوذرات در مهار میکروارگانیسم‌ها گزارش شده است. اگرچه اغلب این مطالعات به منظور کنترل و حذف پاتوژن‌های انسانی انجام پذیرفته و اغلب معطوف به گونه‌های باکتریایی و قارچی بوده است، کارایی این نانوذرات در غیرفعال‌سازی ویروس‌ها کمتر مورد بررسی قرارگرفته است. با توجه به قابلیت ضدمیکروبی گسترده نانوذرات نقره، به کارگیری آنان در صنایع آبزی‌پروری برای کنترل پاتوژن‌های آبزیان امری قابل‌انتظار است. با توجه به این که بسیاری از عفونت‌های ویروسی در آبزیان می‌توانند به شکل مخفی و بدون علامت باشند و به راحتی به ماهیان سالم سرایت کنند، استفاده از نانوذرات نقره ب برای غیرفعال‌سازی و حذف این پاتوژن‌های ویروسی از مزارع پرورش ماهی باید مورد توجه قرار گیرد. از این رو، هدف مطالعه حاضر، در ابتدا تعیین غلظت غیرسمی نانوذرات نقره در سلول‌های تیره Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) و سپس استفاده از آن به منظور بررسی قابلیت غیرفعال‌سازی ویروس ویرمی بهاره کپور در سلول‌های آلوده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های EPC

کشت سلول‌های EPC در محیط کشت Eagle’s Minimal Essential) EMEM Medium، Merck، آلمان) و در فلاسک‌های ۲۵cm^2 انجام شد. پس از آماده‌سازی سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

EPC در فلاسک‌های ۲۵cm^2، محیط کشت موجود در فلاسک‌ها با استفاده از پیپت‌های استریل یک‌بار مصرف خارج شد. سپس برای جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک‌ها، ۵mL تریپسین به هر فلاسک اضافه و پس از چند دقیقه از آن‌ها خارج شد. در مرحله بعد حدود ۵۰mL محیط کشت EMEM حاوی بافر تریس به فلاسک‌ها افزوده شد. پس از چندین بار مخلوط کردن محیط کشت با سلول‌ها به کمک پیپت، محتوی فلاسک‌ها به پلیت‌های ۲۴ و ۹۶ خانه انتقال یافت. به هر یک از خانه‌های پلیت‌های ۲۴ خانه ۱/۵mL و به هر یک از خانه‌های پلیت‌های ۹۶ خانه ۱۵۰µL محیط کشت حاوی سلول‌های EPC افزوده شد. پس از بستن درب پلیت‌ها، تمامی پلیت‌ها در یک محفظه مرطوب قرار داده شدند و در دمای ۲۸ ^oC به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از این مدت، پلیت‌ها از لحاظ نحوه رشد سلول‌ها و تشکیل لایه سلولی مورد بررسی قرار گرفتند (OIE, 2012).

تلقیح نانوذرات نقره به تیره سلولی EPC

اندازه متوسط نانوذرات نقره مورد استفاده در این آزمایش (US Research Nanomaterials, Inc.، آمریکا) ۲۰nm بود. در ابتدا سوسپانسیون‌های آبی یکنواختی از نانوذرات نقره با رقت‌های ۷/۷۵، ۱۵/۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰mg/L تهیه شد و به میزان ۱۵۰µL و در شش تکرار به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه حاوی یک‌لایه از سلول‌های EPC منتقل شد. به چاهک‌های شاهد منفی به میزان مشابه محیط کشت استریل اضافه شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۱۵^oC، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تعداد سلول‌های سالم و سلول‌های از بین رفته به روش رنگ‌آمیزی با رنگ تریپان بلو شمارش شد. در این روش سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر بوده و آن را جذب نمی‌کنند در حالی که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌کنند (Tennant, 1964).

با توجه به تغییر شکل سلول‌ها و تعداد سلول‌های شمارش شده در طی ۹۶ ساعت، غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره (CC_{50})[1] بر روی تیره سلولی EPC با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 و به روش Probit Analysis محاسبه شد. بر اساس این محاسبات، محلول نانوذره نقره با غلظت ۰/۵CC_{50} (۳۱ mg/L) برای مواجه‌سازی با SVCV مورد استفاده قرار گرفت.

1- 50% Cytotoxicity Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر آزمایشگاهی و خالص‌سازی ویروس ویرمی بهاره کپور

در این مطالعه از سویه استاندارد ویروس ویرمی بهاره کپور، سویه شماره ۵۶/۷۰ با شماره ثبت ژن Z۳۷۵۰۵/۱(S۳۰) (آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا، دانمارک) استفاده شد (Stone et al., 2003). به منظور تکثیر ویروس، پس از ذوب کردن ویال حاوی نمونه لیوفیلیزهSVCV با استفاده از آب مقطر استریل، محلول آماده ویروسی با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵µm فیلتر شد و به میزان ۱/۵-۲cc به فلاسک‌های حاوی سلول‌های رشد یافته EPC اضافه شد. تمامی فلاسک‌ها در دمای ۱۵°C گرماگذاری شدند و به مدت هفت روز برای مشاهده آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل تلقیح ویروس به سلول‌های EPC با رعایت اصول امنیت زیستی و زیر هود میکروبیولوژی کلاس II انجام پذیرفت.

به منظور خالص‌سازی ویروس، از سلول‌های تیره EPC آلوده به ویروس که دارای میزان زیادی آثار آسیب سلولی (CPE)[1] بودند استفاده شد. پس از جداسازی سلول‌ها از بستر محیط کشت و افزودن EMEM به آن‌ها، محیط کشت حاوی ویروس سه مرتبه منجمد و ذوب شد تا در اثر تخریب مکانیکی سلول‌ها، ویروس‌ها به درون محیط کشت آزاد شوند. سپس محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴°C با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ (5810R، Eppendorf، آلمان) شد و محلول رویی (سوپرناتانت) که حاوی ویروس‌های جداسازی شده بود با استفاده از فیلتر ۰/۴۵µm سر سرنگی فیلتر شد و تا زمان به کارگیری در مواجه‌سازی تجربی، در محیط EMEM استریل و در دمای ۸۰°C- نگهداری شد (Haenen and Davidse, 1993).

تیتراسیون ویروس و تعیین دوز مواجه‌سازی

برای تیتراسیون ویروس، نمونه ویروسی خالص شده، به روش سریالی رقیق شد. به این منظور در یک پلیت ۹۶ خانه خالی، نمونه ویروس خالص شده با استفاده از محیط EMEM به صورت سریالی و با ضریب رقت ۰/۱ از رقت ۱-۱۰ تا ۸-۱۰ رقیق شد. سپس نمونه‌های رقیق شده در شش تکرار به پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی تیره سلولی EPC تلقیح شدند. حجم تلقیح نمونه به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ۲۰ µL بود و خانه‌های تلقیح نشده نیز در هر رقت به عنوان کنترل منفی در

1- Cytopathic Effects

www.SID.ir

Archive of SID

نظر گرفته شدند. پلیت تیتراسیون پس از تلقیح در یک محفظه مرطوب قرار داده شد و به دمای ^{o}۱۵C انتقال یافت. تمامی خانه‌های تلقیح شده به مدت هفت روز و به صورت روزانه از نظر بروز آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن ثبت شد. در پایان روز هفتم، تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed و Muench (۱۹۳۸) و بر اساس رابطه ۱ انجام شد و تیتر ویروسی به صورت $TCID_{50}/mL$ بیان شد. $TCID_{50}/mL$ غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ٪۵۰ از خانه‌های پلیت کشت سلولی شود.

رابطه ۱:

$$TCID_{50}/ml = Anti\ log\ [-1-(\frac{CPE}{100} - 0.5)]$$

CPE: مجموع درصد آسیب سلولی هر یک از رقت‌های مختلف.

مواجه‌سازی نانوذرات نقره با SVCV در سلول‌های EPC

مواجه‌سازی نانوذرات نقره با SVCV به دو روش مواجه‌سازی همزمان و تاخیری انجام شد. در روش همزمان، ۱۰۰µL سوسپانسیون نانوذره نقره با غلظت ۳۱mg/L و ۱۰۰µL از محلول ویروسی با تیتر $۳/۲\times۱۰۵TCID_{50}/mL$ به صورت همزمان در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه حاوی تیره سلولی EPC تلقیح شد در حالی که در روش تاخیری ابتدا محلول نانوذرات و محلول ویروسی با هم به مدت چهار ساعت مجاورسازی شد. سپس به میزان ۲۰۰µL از این ترکیب به چاهک‌های حاوی سلول EPC اضافه شد. آزمایش‌های مواجه‌سازی در شش تکرار انجام شد و شاهدهای مثبت مورد استفاده شامل شاهد ویروس خالص و شاهد نانوذره نقره (با غلظت پایین‌تر از CC_{50}) بود. به منظور شاهد منفی از سلول‌های تلقیح نشده EPC استفاده شد.

همه چاهک‌ها به صورت روزانه و به مدت یک هفته از نظر بروز آثار آسیب سلولی بررسی شدند، شمارش سلول‌های زنده و غیرزنده در هر تکرار از تیترهای ذکر شده انجام گرفت و تغییرات ریختی سلول‌ها و تعداد سلول‌های باقی مانده ملاک ارزیابی تاثیر نانوذرات نقره قرار گرفت.

از نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) در سطح معنی‌داری ٪۹۵ به منظور مقایسه جمعیت سلول‌های تیمارهای مختلف استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

تعیین غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره بر سلول‌های EPC

به منظور تعیین غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره بر سلول‌های EPC، غلظت‌های متعدد نانوذرات نقره با سلول‌های EPC مجاور شد و تغییرات جمعیت سلول‌های زنده به صورت روزانه و به مدت ۹۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت و در پایان این مدت غلظت ۶۲ mg/L به عنوان غلظت نیمه سمی تعیین شد. با توجه به این نتایج، از غلظت کمتر از غلظت نیمه سمی (۳۱ mg/L) برای انجام آزمون مواجه‌سازی SVCV با نانوذرات نقره استفاده شد. جدول ۱ تغییرات جمعیت سلول‌های EPC را در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نشان می‌دهد.

تعیین اثر ضدویروسی نانوذرات نقره بر SVCV

مواجه‌سازی SVCV با نانوذرات نقره در سلول‌های EPC به دو روش مواجه‌سازی همزمان و تاخیری انجام شد. بر اساس نتایج، در تیمار مواجه‌سازی همزمان سلول‌ها با نانوذرات نقره و SVCV آثار آسیب سلولی از روز سوم مواجه سازی قابل رویت بود و در پایان دوره مواجه‌سازی حداقل ٪۵۰ از تک‌لایه سلولی دچار آسیب سلولی شد.

جدول ۱: تغییرات جمعیت سلول‌های EPC در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

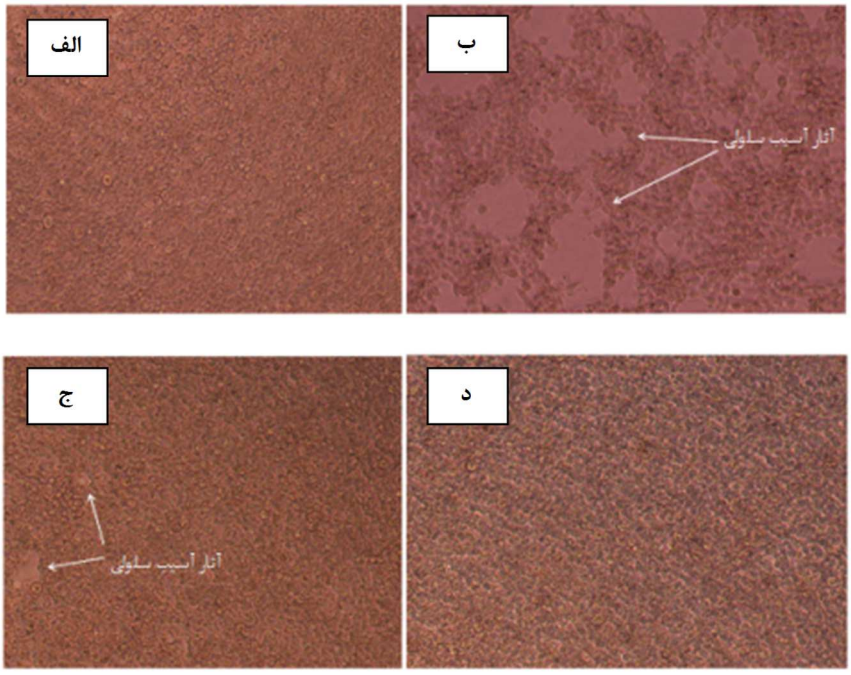
غلظت نانوذرات نقره (mg/L)	تعداد اولیه سلول EPC (Cell/mL)	تعداد سلول‌های مرده (Cell/mL)			
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۱۰۰۰	۶/۵× ۱۰^{۳}	۵/۷× ۱۰^{۳}	۶/۲× ۱۰^{۳}	۶/۵× ۱۰^{۳}	۶/۵× ۱۰^{۳}
۵۰۰	۶/۵× ۱۰^{۳}	۴/۹× ۱۰^{۳}	۵/۴× ۱۰^{۳}	۶/۰× ۱۰^{۳}	۶/۵× ۱۰^{۳}
۲۵۰	۶/۵× ۱۰^{۳}	۴/۵× ۱۰^{۳}	۴/۸× ۱۰^{۳}	۵/۶× ۱۰^{۳}	۵/۹× ۱۰^{۳}
۱۲۵	۶/۵× ۱۰^{۳}	۳/۱× ۱۰^{۳}	۳/۳× ۱۰^{۳}	۳/۹× ۱۰^{۳}	۳/۹× ۱۰^{۳}
۶۲	۶/۵× ۱۰^{۳}	۲/۷× ۱۰^{۳}	۲/۸× ۱۰^{۳}	۲/۹× ۱۰^{۳}	۲/۹× ۱۰^{۳}
۳۱	۶/۵× ۱۰^{۳}	۱/۰× ۱۰^{۳}	۱/۳× ۱۰^{۳}	۱/۳× ۱۰^{۳}	۱/۴× ۱۰^{۳}
۱۵	۶/۵× ۱۰^{۳}	۰/۷× ۱۰^{۳}	۰/۵× ۱۰^{۳}	۰/۲× ۱۰^{۳}	۰/۲× ۱۰^{۳}
۷/۵	۶/۵× ۱۰^{۳}	۰	۰	۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

آسیب‌های سلولی شامل گردشدگی و کشیدگی سلول‌ها و ایجاد پلاک‌های سلولی بود که به دنبال تلفات سلول‌ها و کنده شدن آن‌ها از کف فلاسک رخ می‌داد (شکل ۱).

در تیمار تاخیری بروز علائم آسیب سلولی بسیار کندتر بود و با شدت بسیار کمتری نسبت به تیمار همزمان بروز یافت به طوری‌که در این تیمار آسیب سلولی در روز پایانی مواجه‌سازی و با شدت بسیار کمتر در مقایسه با تیمار همزمان دیده شد. این در حالی است که در تیمار شاهد ویروسی، آسیب سلولی وسیعی از روز دوم آغاز شد و در پایان روز پنجم تمامی سلول‌ها نابود شدند. ضمن این که در تیمارهای شاهد نانوذره نقره و تیمار شاهد منفی آثار آسیب سلولی واضحی مشاهده نشد.

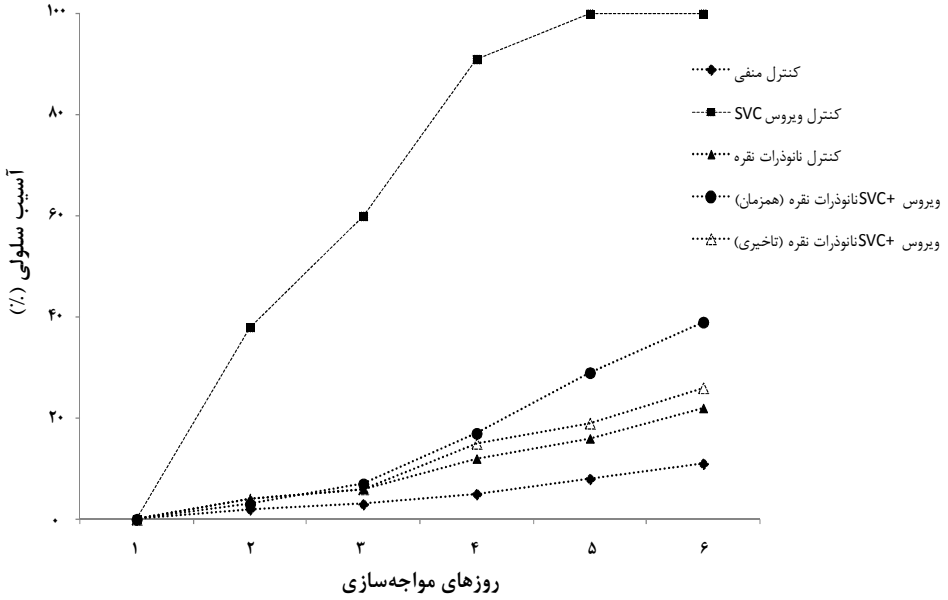


شکل ۱: سلول‌های EPC در روز سوم مواجه‌سازی. الف) تیمار شاهد منفی ب) تیمار شاهد ویروس ج) تیمار مواجه سازی همزمان ویروس و نانوذرات نقره د) تیمار مواجه‌سازی تاخیری ویروس و نانوذرات نقره (بزرگنمایی تصاویر ۱۰۰ برابر).

www.SID.ir

Archive of SID

علاوه بر این، تخریب سلولی در تیمارهای مواجه‌سازی همزمان و تاخیری به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد ویروس کمتر بود. همچنین میزان آسیب سلولی در تیمار تاخیری به طور معنی‌داری کمتر از تیمار مواجه‌سازی همزمان بود. بر اساس نتایج، در پایان دوره مواجه‌سازی سلول‌های EPC با SVCV، در تیمار شاهد ویروس تمامی سلول‌ها از بین رفتند در حالی که میزان تخریب سلولی در تیمارهای مواجه‌سازی همزمان و تاخیری به ترتیب ۳۹ و ۲۶ درصد بود. شکل ۲ تغییرات جمعیت سلول‌های EPC را در تیمارهای مورد مطالعه نمایش می‌دهد.



شکل ۲: میزان تخریب سلول‌های EPC در تیمارهای مورد مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

استفاده از نقره علیه میکروارگانیسم‌ها از دیرباز مورد توجه بشر بوده است. مصریان باستان به منظور نگهداری مواد غذایی از ظروف نقره استفاده می‌کردند و یا با انداختن سکه‌های نقره در آب آشامیدنی خود سعی در از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا داشتند (محمدی و زمانی، ۱۳۹۰). نانوذرات نقره به دلیل قطر کم و اندازه بسیار کوچک خود، دارای سطح وسیع و تحرک‌پذیری و برخوردپذیری بالایی هستند و این امر منجر به افزایش ویژگی‌های ضدمیکروبی آن‌ها در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر نقره می‌شود (Pokharkar et al., 2014).

خواص ضدمیکروبی موثر نقره منجر به استفاده روزافزون آن در صنایع بهداشتی، آرایشی و دارویی شده است. تاکنون پژوهشگران بسیاری به بررسی کارایی ضدمیکروبی نقره علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مختلف پرداخته‌اند که اکثر این مطالعات معطوف به باکتری‌ها و قارچ‌ها بوده است (Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Kim et al., 2007; Chernousova and Epple, 2013). اما از یک‌سو خواص ضدویروسی نانوذرات نقره کمتر مورد بررسی قرار گرفته و از سوی دیگر اغلب مطالعات بر روی ویروس‌های انسانی انجام یافته است (Gaikwad et al., 2013; Mori et al., 2013). صنایع آبزی‌پروری از ارکان اقتصادی مهم در بسیاری از مناطق دنیا است و میکروب‌های بیماری‌زا یکی از مهم‌ترین تهدیدات این صنعت هستند. در این بین، ویروس‌های بیماری‌زا به دلیل سرایت‌پذیری بالا، نرخ بالای تلفات و همچنین وجود فرم‌های ناقل بدون علامت، از اهمیت بسیار ویژه‌ای برخوردار هستند.

در این مطالعه برای نخستین بار به بررسی قابلیت ضدویروسی نانوذرات نقره علیه SVCV پرداخته شد و مشاهده شد که نانوذرات نقره از قابلیت مناسبی در غیرفعالسازی ویروس مذکور برخوردار بود. اگرچه نانوذرات نقره نیز همانند بسیاری دیگر از یون‌های فلزی دارای اثرات سمیت سلولی هستند و بنابراین به منظور به کارگیری آن باید از غلظت‌های با سمیت پایین استفاده کرد. در این مطالعه با انجام آزمایش‌های مواجه‌سازی نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف با سلول‌های EPC غلظت نیمه سمی نانوذرات (۶۲mg/L) محاسبه شد و سپس از غلظت‌های پایین‌تر از غلظت نیمه سمی (۳۱mg/L) به منظور آزمایش‌های غیرفعالسازی ویروس استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره از پتانسیل بسیار بالایی در غیرفعالسازی SVCV برخوردار بود. مقایسه تیمارهای مواجه‌سازی نانوذرات نقره با SVCV با تیمار شاهد ویروس نشان داد که میزان تلفات سلولی و بروز آسیب‌های سلولی به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. این امر نشان دهنده قابلیت ضدویروسی مناسب نانوذرات نقره علیه SVCV است. نانوذرات نقره به دو روش اثرات ضدمیکروبی خود را القا می‌کند. این ذرات از یک‌سو قادر به ایجاد استرس اکسیداتیو در محیط هستند به این معنی که منجر به تولید و آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS[1]) می‌شوند. این رادیکال‌ها مولکول‌های ناپایداری هستند که تمایل بالایی به اتصال به سایر مولکول‌ها به ویژه لیپیدهای غشایی دارند. اتصال این مولکول‌ها به لیپیدهای غشا منجر به بروز منافذ و آسیب‌های غشایی می‌شود و با اختلال در عملکرد غشا از رشد میکروارگانیسم‌ها ممانعت به عمل می‌آید (Moritz and Geszke-Moritz, 2013). از سوی دیگر نانوذرات نقره خود مستقیما قادر هستند به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها به ویژه گروه عاملی SH– اتصال یابند که این امر منجر به تغییراتی در تاخوردگی طبیعی پروتئین‌ها و در نتیجه کاهش و یا از دست رفتن عملکرد طبیعی آن‌ها می‌شود.

Rhabdovirus carpio ویروسی با ظاهر فشنگی شکل است که همانند همه ویروس‌ها دارای کپسیدی پروتئینی است و در داخل آن اسید نوکلئیک، پروتئین‌های ساختاری و آنزیم‌های حیاتی ویروس وجود دارد. علاوه بر این یک غشا دولایه از جنس غشا سلول میزبان، کپسید ویروس را در بر می‌گیرد که ویروس این غشا را حین خروج از سلول‌های میزبان کسب می‌کند و وجود آن نقش بسیار مهمی در عفونت‌زایی SVCV دارد (Dimmock et al., 2016). به نظر می‌رسد که حساسیت بالای SVCV در مواجهه با نانوذرات نقره به دلیل هر دو خاصیت ضدغشایی و ضدپروتئینی نانوذرات نقره باشد. به عبارت دیگر، نانوذرات نقره از یک‌سو به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به آسیب به پوشش لیپیدی ویروس و افزایش نفوذپذیری آن می‌شوند و از سوی دیگر با نفوذ این نانوذرات به داخل کپسید ویروس، عملکرد پروتئین‌های حیاتی ویروس مختل شده که این امر منجر به غیرفعال‌سازی ویروس می‌شود.

1- Reactive Oxygen Species

www.SID.ir

Archive of SID

علاوه بر این، مقایسه میزان تلفات سلولی در دو تیمار مواجه‌سازی همزمان و تاخیری نشان داد که اگر SVCV پیش از ورود به سلول با نانوذرات نقره مواجه‌سازی شود، به میزان بیشتری تحت تاثیر قرار گرفته و غیرفعال می‌شود. در تیمار تاخیری با توجه به دسترسی آسان‌تر نانوذرات نقره به ویروس و همچنین غیرفعال‌سازی آن در مدت زمان چهار ساعت پیش از تلقیح به سلول‌های EPC، تعداد زیادی از ویروس‌ها غیرفعال شده و بنابراین تعداد کمتری ویروس قادر به آلوده کردن سلول‌ها بودند. این امر سبب تلفات پایین‌تر سلولی در تیمار تاخیری نسبت به تیمار مواجه‌سازی همزمان شد. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره نه تنها قادر به از بین بردن SVCV پس از شروع عفونت هستند، بلکه می‌توانند به عنوان ابزاری کمکی به منظور ضدعفونی کردن محیط‌های آبی برای پیشگیری از سرایت ویروس به ماهیان حساس در نظر گرفته شود. علاوه بر این، استفاده از نانوذرات نقره برای پیشگیری از سرایت آلودگی ویروسی به مناطق جدید به دنبال واردات گونه‌های آبزیان به این مناطق، می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

تأثیر نانوذرات نقره بر روی ویروس‌های هپاتیت B، RSV (Respiratory Syncetial Virus)، ویروس هرپس سیمپلکس نوع I، ویروس آبله میمون و ویروس آنفولانزا در مطالعات پیشین نشان داده شده است (Gaikwad et al., 2013; Mori et al., 2013; Khandelwal et al., 2014). علاوه بر این فعالیت ضدمیکروبی مناسب نانوذرات نقره علیه ویروس‌های پوشش‌دار گزارش شده است (Franci et al., 2015). نتایج این مطالعه نیز همسو با یافته‌های اشاره شده است و از آنجایی که ویروس ویرمی بهاره کپور نیز پوشش‌دار است و با توجه به مشاهدات و نتایج مطالعه حاضر این ویروس را هم می‌توان در زمره ویروس‌های حساس به نانوذرات نقره قرار داد.

در این مطالعه قدرت ضدمیکروبی نانوذرات نقره در غلظت‌های غیر سمی آن علیه SVCV به خوبی نشان داده شد. با توجه به سرایت‌پذیری و میزان تلفات بالای ناشی از ابتلا به این ویروس، استفاده از ترکیباتی که از سمیت پایینی برخوردار بوده، دارای قدرت ضدویروسی مناسب باشند در کنترل عفونت ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین نانوذرات نقره

www.SID.ir

Archive of SID

می‌تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب در کنترل عفونت‌های ویروسی در صنایع آبزی‌پروری مدنظر قرار گیرد. اگرچه، استفاده عملی از آن در این صنایع نیازمند بررسی‌های بیشتر از جمله بررسی کارایی آن در شرایط in-vivo است و همچنین توجه به ملاحظات زیست- محیطی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از موسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی به دلیل فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این پژوهش ابراز می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

محمدی ع. و زمانی ح. ۱۳۹۰. مرجع کامل میکروب‌شناسی عمومی. انتشارات آراد. ۵۴۰ص.

Ahamed M., Alsalhi M.S. and Siddiqui M.K.J. 2010. Silver nanoparticle applications and human health. Clinica Chimica Acta, 411(23): 1841–1848.

Ahne W., Bjorklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G. and Winton J.R. 2002. Spring viremia of carp (SVC). Disease of Aquatic Organisms, 52: 261–272.

Chernousova S. and Epple M. 2013. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. Angewandte Chemie, 52(6): 1636–1653.

Dimmock N.J., Easton A.J. and Leppard K.N. 2016. Introduction to Modern Virology. John Wiley and Sons, Australia. 516P.

Dixon P.F. 2008. Virus diseases of cyprinids. P: 87–184. In: Eiras J., Segner H., Wahli T. and Kapoor B.G. (Eds.). Fish Diseases, Vol. 1. Enfield: Science Publishers. England.

Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G. and Galdiero M. 2015. Silver nanoparticles as potential anti-bacterial agents. Molecules, 20(5): 8856–8874.

Gaikwad S., Ingle A., Gade A., Rai M., Falanga A., Incoronato N.,

Russo L., Galdiero S. and Galdiero M. 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. International Journal of Nanomedicine, 8: 4303–4314.

Haenen L.M. and Davidse A. 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viraemia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms, 15: 87–92.

Kawata K., Osawa M. and Okabe S. 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. Environmental Science and Technology, 43(15): 6046–6051.

Khandelwal N., Kaur G., Kumar N. and Tiwari A. 2014. Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A new hope for antivirals. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 9(1): 175–186.

www.SID.ir

Archive of SID

Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y. and Kim Y.K. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1): 95–101.

Mori Y., Ono T., Miyahira Y., Nguyen V.Q., Matsui T. and Ishihara M. 2013. Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. Nanoscale Research Letters, 8(1): 1–6.

Moritz M. and Geszke-Moritz M. 2013. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. Chemical Engineering Journal, 228: 596–613.

OIE (Office International des Epizooties) 2012. Spring viraemia of carp. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. P: 257–273.

Pokharkar V.B., Dhapte V.V. and Kadam S.S. 2014. Metallic nanoparticulate drug delivery systems. P: 278–294. In: Arias J.L. (Ed.). Nanotechnology and Drug Delivery: Nanoplatforms in Drug Delivery, Vol. 1. CRC Press, England. 380P.

Reed L.J. and Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. American Journal of Hygiene, 27: 493–497.

Sondi I. and Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as anti-microbial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science, 275(1): 177–182.

Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T., Sheppard A.M., Taylor G.R. and Way K. 2003. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Diseases of Aquatic Organisms, 53: 203–210.

Tennant J.R. 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. Transplantation, 2(6): 685–694.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 4, Winter 2017

Inactivation of *Rhabdovirus carpio* (spring viraemia of carp virus) in an EPC cell line by silver nanoparticles

Babak Ramezani Agheleh[1], Mohades Ghasemi[2]*, Hojjatolah Zamani[3]

Received: August 2016 Accepted: October 2016

Abstract

Among aquatic animal pathogens, viruses have the most sensible role and cause higher mortalities than other pathogens due to the high infectivity, difficult diagnosis and high severity. In this study, antiviral activity of silver nanoparticles (Ag-NPs) against *Rhabdovirus carpio*, the etiological agent of spring viraemia of carp (SVCV), in epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line was monitored. Cytotoxic concentration 50% (CC_{50}) of Ag-NPs in EPC cells was determined and the concentration 0.5 CC_{50} was used. Viral exposure to Ag-NPs was performed using simultaneous and delayed inoculation of the virus and Ag-NPs onto EPC cells. The inoculated cells were monitored for six days for any cytopathic effects and mortalities. According to the results, the CC_{50} of Ag-NPs was determined 62mg/L. In addition, mortalities of simultaneous and delayed inoculated cells were recorded 39% and 26% respectively, while in the meantime 100% of the cells inoculated with pure SVCV were died. Thus, it could be concluded that Ag-NPs have an appropriate antiviral activity against SVCV in their less toxic concentrations and could be employed as an antiviral agent in aquaculture.

Key words: *Aquaculture, Antiviral Agent, Viraemia, Nanoparticle.*

1- M.Sc. Student in Microbiology, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor, Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Anzali, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding Author: mohades@yahoo.com

www.SID.ir