فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال یازدهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

بررسی میزان حساسیت کشت سلولی اولیه از باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) به ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV)

سید ابوالفضل علایی[۱]، سمیه حقیقی کارسیدانی[۲]*، محدث قاسمی[۳]

DOI: 10.22124/japb.2022.21587.1456
تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

در این مطالعه برای اولین بار میزان حساسیت کشت سلولی اولیه از باله دمی ماهی سفید دریا ی خزر به عنوان گونه بومی شاخص و نیز مهم‌ترین ماهی تجاری در جنوب این حوضه، به ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV)، عامل عفونی حاد، خونریزی دهنده و مسری به صورت درون آزمایشگاهی (In vitro) مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور، کشت سلولی اولیه از باله دمی بچه ماهیان سفید با استفاده از روش کشت بافت و تیمار با آنزیم تریپسین انجام شد. پس از تکثیر آزمایشگاهی سویه استاندارد ویروس ویرمی بهاره کپور، ویروس در رقت‌های مختلف، در شش تکرار به پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی تک لایه سلولی باله ماهی سفید پس از پنج بار کشت مجدد و نیز تیره سلولی EPC تلقیح و سپس آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس به روش غیرمستقیم برای تشخیص ماهیت ویروس به کار گرفته شد. ایجاد آثار آسیب سلولی در کشت سلولی اولیه باله دمی همزمان با مشاهده این آثار تخریب سلول در رده EPC و نیز حضور آنتی‌ژن SVCV روی کشت سلولی باله دمی ماهی سفید دریای خزر به صورت نقاط درخشان، به وضوح تاییدی بر حساسیت کشت سلولی اولیه باله دمی ماهی سفید به ویروس ویرمی بهاره کپور است.

واژگان کلیدی: *آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس غیرمستقیم، اثر سیتوپاتیک، کشت سلولی اولیه، ماهی سفید دریای خزر*، Rhabdovirus carpio.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، واحد بندرانزلی، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر انزلی، ایران.
۲- استادیارگروه شیلات، واحد بندرانزلی، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر انزلی، ایران.
۳- استادیار پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران.
* نویسنده مسئول: haghighikarsidani@yahoo.com

مقدمه

ماهی سفید دریای خزر (Rutilus kutum) که با نام کوتوم خزری (Caspian Kutum) نیز شناخته می‌شود، متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) بوده و مهم‌ترین ماهی تجاری در جنوب دریای خزر است، به گونه‌ای که در گزارش سالانه سازمان شیلات ایران ، رتبه اول تولید و رهاسازی بچه ماهی برای بازسازی ذخایر را کسب کرده است (Iranian Fisheries Organization, 2019). با توجه به گستردگی پراکنش خانواده کپورماهیان در این منطقه، ماهی سفید دریای خزر بیش از ۶۰ درصد ترکیب صید ماهیان استخوانی را در آب‌های شمال ایران و بیشترین میزان صید در واحد تلاش را به خود اختصاص می‌دهد (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷؛ Fazli et al., 2012). علاوه بر این، طبق نتایج یک پایش بلند مدت *R. kutum* گونه‌ای با بیشترین فراوانی صید در طول ۱۶ سال صید پره و نیز به عنوان گونه شاخص در اکوسیستم دریای خزر شناخته می‌شود (Fazli and Parafkandeh Haghighy, 2016). با این وجود، به دلیل عوامل متعددی شامل صید بی‌رویه، افزایش آلودگی دریا بویژه آلودگی میکروپلاستیکی و بهره‌برداری بیش از حد از ماسه‌ها و رسوبات دریا، ذخایر ماهی سفید خزری در سراسر محدوده بومی خود در جنوب دریای خزر با کاهش روزافزون و چشمگیری مواجه است (Emadi, 1979; Abadi et al., 2021).

عوامل عفونی، بویژه ویروس‌ها، از دیگر علل عمده کاهش جمعیت در میان گونه‌های ماهی هستند. با توجه به اهمیت تجاری و تغذیه‌ای گونه ارزشمند ماهی سفید دریای خزر، اهمیت درک حساسیت ویروسی در این گونه بیش از هر زمان دیگری آشکار می‌شود.

ویروس ویرمی بهاره کپور (Spring Viremia of Carp Virus: SVCV) به عنوان عامل بیماری کشنده‌ای به نام ویرمی بهاره کپور، متعلق به جنس *Vesiculovirus* از خانواده Rhabdoviridae است. تمامی اعضای خانواده کپورماهیان، بویژه گونه *Cyprinus carpio* (کپور معمولی)، در شمار گونه‌های حساس و آسیب‌پذیر نسبت به ویروس ویرمی بهاره کپور قرار دارند (Ahne et al., 2002). علاوه بر این، مطالعات اخیر انجام شده توسط آزمایش‌های درون‌تنی (In vivo)، ماهی سفید دریای خزر را به عنوان میزبانی جدید برای این ویروس معرفی کرده‌اند (Ghasemi et al., 2014; Zamani et al., 2014). به طور معمول، بیماری ویرمی

بهاره کپور در دمای زیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد، بویژه در فصل بهار موجب مرگ و میر این گونه از ماهیان می‌شود. علایم ظاهری در ماهیان رو به مرگ که به راحتی صید می‌شوند شامل خونریزی‌هایی در پوست، آبشش‌های رنگ پریده، آماس و احتباس مایع در ناحیه شکمی است که متعاقبا کالبدشکافی و نمونه‌برداری بیشتر از ماهی برای بررسی‌های آزمایشگاهی دیگر ضرورت می‌یابد (Petty et al., 2002; Ashraf et al., 2016).

کشت سلول و بافت، به عنوان ابزاری کارآمد در انواع زمینه‌های مطالعات زیست‌شناسی بویژه در ویروس‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد که با توجه به پیشرفت تکنولوژی بر اهمیت استفاده از آنها روزبه‌روز افزوده می‌شود.

در این مهم عدم قربانی شدن تعداد زیادی از موجودات زنده، برخلاف آنچه که در مطالعات درون‌تنی انجام می‌شود و نیز ایجاد ارتباط مستقیم و بی‌واسطه میان علت و معمول (میزبان و ویروس در این مطالعه) و حذف دیگر عوامل فیزیولوژیکی تاثیرگذار و برهم زننده احتمالی مکانسیم مورد نظر، از جمله مزایایی است که پژوهشگران را به استفاده از روش‌های کشت سلولی و بافتی ترغیب می‌کند (Gardell et al., 2014).

به همین ترتیب با توجه به اهمیت حفاظت از گونه‌های آبزی به عنوان ذخایر مهم زیستی و اقتصادی، استفاده از روش‌های کشت سلول و بافت در انواع گونه‌های آبزیان و بویژه ماهیان بومی و یا تحت خطر انقراض جایگاه ویژه‌ای می‌یابد. علاوه بر کاربرد این تکنیک در ارزیابی عوامل تاثیرگذار بر فیزیولوژی ماهیان، در علم ویروس‌شناسی ماهیان نیز از کشت سلولی بافت‌های مختلف آن برای تکثیر ویروس‌های بیماری‌زا در ماهی استفاده می‌شود. به گونه‌ای که این روش آزمایشگاهی پتانسیل ارائه یک سیستم مناسب به پژوهشگران را برای جداسازی و آزمایش کارایی عوامل بیماری‌زا (حساسیت ویروسی در این مطالعه) و نیز دیگر شاخص‌های محیطی مرتبط با مدیریت آبزی‌پروری گونه‌های ماهی دارا است (Lakra et al., 2011). از این رو، در صورت ارزیابی کارایی کشت سلولی مورد مطالعه، می‌توان از آن به عنوان جایگزینی بومی در کشور برای رده‌های سلولی استاندارد دیگر، همچون Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) استفاده کرد. همچنین مزیت دیگر روش درون آزمایشگاهی نسبت به روش درون‌تنی، قابلیت مطالعه دقیق‌تر برهم‌کنش ویروس و میزبان و دستیابی به میزان دقیق

متوسط مقدار عفونی در هر میلی‌لیتر از کشت بافت ($TCID_{50}$/mL) است.

با نظر به این که پژوهش حاضر، اولین تلاش برای بررسی حساسیت ماهی سفید دریای خزر نسبت به ویروس ویرمی بهاره کپور به صورت In vitro بر روی کشت سلولی اولیه از باله دمی این گونه ارزشمند دریای خزر است، امید است نتایج این مطالعه درک ما را از این موضوع افزایش داده و به نوبه خود، در توسعه آبزی‌پروری پایدار یاری دهد.

مواد و روش‌ها

نگهداری نمونه‌های ماهیان

تعداد ۱۰۰ قطعه بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) با میانگین وزنی ۲±۰/۰۰۵ گرم از مرکز بازسازی و تکثیر ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری (رشت، گیلان) به صورت زنده تهیه و به آزمایشگاه ویروس‌شناسی پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور منتقل شدند. بچه ماهیان به مدت ۲۰ روز در آب با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در آکواریوم دارای هواده با تراکم ۱۰ ماهی در هر ۱۰ لیتر، به منظور انطباق (Adaptation) نگهداری شدند. دوره نوری در چرخه ثابت ۱۴ ساعت روشنایی- ۱۰ ساعت تاریکی حفظ شد. همچنین بچه ماهیان روزانه با غذای تجاری ماهی (BioMar، فرانسه) تغذیه شده و آکواریوم‌ها روزانه با سیفون ۳۰ درصد آب، پاکسازی می‌شدند. نمونه‌برداری از ماهی برای تهیه کشت سلولی اولیه از باله دمی بر اساس دستور العمل‌های اخلاقی شناخته شده بین المللی انجام شد (Volpato et al., 2007).

کشت سلولی اولیه

در این مطالعه از کشت سلولی اولیه باله دمی ماهی سفید دریای خزر تا پنج پاساژ که در آزمایشگاه ویروس‌شناسی آبزیان پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور تهیه شده بود، استفاده شد (Hadifar et al., 2019). بچه ماهیان در محلول آب سرد و یخ بیهوش شدند. مراحل بعدی با مایعات هم دما شده با محیط، انجام شد. قبل از تهیه ریزنمونه، شست و شو و ضدعفونی سطح بدن ماهی در چهار مرحله انجام شد: غوطه‌وری ماهیان به ترتیب به مدت ۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵ درصد، ۱۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۵ ثانیه در آب. مراحل ذکر شده، تکرار و در نهایت مرحله چهارم زیر هود لامینار به منظور ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد انجام شد.

باله دمی بچه ماهیان جدا شده و توسط یک چاقوی جراحی به صورت ریزنمونه‌های ۲-۱ میلی‌متر مکعبی خرد شد. بافت‌های باله دمی در یک ظرف پتری استریل حاوی محلول تریپسین- EDTA 1X نگهداری شدند و برای تاثیر بیشتر آنزیم و جداسازی مکانیکی به مدت ۱۵ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. برای غیرفعال شدن تریپسین، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 (Leibovitz's L-15 Medium) همراه با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) بدون آنتی‌بیوتیک با استفاده از پیپت استریل به داخل لوله مخروطی (Conical Tube) ۱۵ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس با سرعت ۱۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (5810، Eppendorf، آلمان) شد. سپس مایع رویی خارج شد و یک میلی‌لیتر محیط کشت L-15 به پلت به دست آمده اضافه شد تا دوباره معلق شود. سوسپانسیون سلولی، در فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 همراه با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی، آنتی‌بیوتیک (۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین) و ضدقارچ آمفوتریپسین B (۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار داده شد. پس از مدتی قطعات بافت به سطح فلاسک چسبیدند. فلاسک‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فلاسک‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و نیمی از محیط کشت در فاصله زمانی ۴۸ ساعت تعویض می‌شد.

نگهداری و تکثیر تیره سلولی EPC

در این مطالعه از رده سلولی EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini)، تیره سلولی پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت جانوران به منظور تکثیر و تیتراسیون ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) استفاده شد که یک تیره سلولی اپیتلیالی است و از آزمایشگاه مرجع ویروس‌شناسی آبزیان اتحادیه اروپا واقع در دانمارک تهیه شد. به منظور تهیه کشت سلولی تک لایه، از فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی استفاده شد. پس از انتقال سلول‌ها از فلاسک‌های قدیمی به فلاسک‌های جدید ۲۰-۱۵ میلی‌لیتری محیط آماده شده و استریل EMEM همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک (۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین) به همراه آب دیونیزه به فلاسک‌ها افزوده شد (این رده سلولی پیش‌تر در

آزمایشگاه از محیط L-15 به محیط ارزان‌تر و در دسترس‌تر EMEM آداپته (منطبق) شده بود). مواد مصرفی دیگر همانند آنچه که برای کشت سلول‌های باله دمی ماهی سفید ذکر شد، استفاده شد. سپس فلاسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور یخچال‌دار گرماگذاری شد. پس از این مدت رشد سلول‌ها و تشکیل تک لایه، زیر میکروسکوپ معکوس (Inverted Microscope، TS100، Nikon، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. پس از کسب اطمینان از رشد مناسب سلول‌ها، همه فلاسک‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تکثیر آزمایشگاهی ویروس

در این مطالعه از سویه استاندارد ویروس ویرمی بهاره کپور، سویه شماره ۵۶/۷۰ با شماره ثبت ژن (S۳۰)Z۳۷۵۰۵/۱ (Stone et al., 2003) که از آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا واقع در کشور دانمارک تهیه شد، استفاده شد. به منظور تکثیر ویروس، پس از ذوب کردن ویال حاوی نمونه لیوفیلیزه SVCV با استفاده از آب مقطر استریل، محلول آماده ویروسی با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شد و به میزان ۲-۱/۵ میلی‌لیتر به فلاسک‌های حاوی سلول‌های رشد یافته EPC اضافه شد. تمامی فلاسک‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و به مدت هفت روز برای مشاهده آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

تلقیح ویروس

برای آماده‌سازی پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه، پس از آماده‌سازی سلول‌های EPC و باله در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی، محیط کشت موجود در فلاسک‌ها با استفاده از پیپت‌های استریل یکبار مصرف خارج شد. سپس ۵ میلی‌لیتر تریپسین حاوی EDTA به منظور جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک، به هر فلاسک اضافه شد و پس از چند دقیقه تریپسین حاوی EDTA از فلاسک‌ها خارج شد. در مرحله بعد حدود میلی‌لیتر 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 پلیت ۹۶ خانه انتقال یافت. به هر یک از خانه‌های پلیت‌های ۹۶ خانه ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول‌های EPC افزوده شد. پلیت پس از بستن درب، در یک محفظه مرطوب قرار داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد

به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از این مدت پلیت از لحاظ نحوه رشد سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مراحل تلقیح ویروس به سلول‌های EPC با رعایت اصول ایمنی زیستی و در زیر هود میکروبیولوژی کلاس II انجام پذیرفت.

تیتراسیون ویروس

به منظور تیتراسیون ویروس، ویروس استاندارد به روش سریالی رقیق‌سازی شد. به این منظور در یک پلیت ۹۶ خانه خالی، نمونه ویروس خالص‌سازی شده با استفاده از محیط EMEM به صورت سریالی و با ضریب رقت ۰/۱ از $۱۰^{-۰}$ تا $۱۰^{-۷}$ رقیق شد. سپس نمونه‌های رقیق شده در شش تکرار به پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی کشت سلولی باله دمی ماهی سفید تلقیح شدند. به منظور ارزیابی تاییدی، نمونه‌های ویروسی با همان رقت‌های یاد شده روی تیره سلولی استاندارد EPC نیز تلقیح شدند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، حجم تلقیح نمونه به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ۲۰ میکرولیتر بود. در ضمن خانه‌های تلقیح نشده نیز در هر رقت به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. پلیت تیتراسیون پس از تلقیح در یک محفظه مرطوب قرار داده شد و به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. تمامی خانه‌های تلقیح شده به مدت هفت روز و به صورت روزانه از نظر بروز آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آنها ثبت شد. در پایان روز هفتم تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed و Muench (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتر ویروسی به صورت $TCID_{50}$ (The Median Tissue Culture Infectious Dose) در میلی‌لیتر بیان شد. برای تعیین $TCID_{50}$ در میلی‌لیتر، تعداد موارد بروز آثار آسیب سلولی در هر یک از رقت‌های ویروسی در پلیت ۹۶ خانه بررسی و به صورت درصد بیان شد.

مشاهدات میکروسکوپی

به مدت ۷ روز، تغییرات ریختی و آثار آسیب سلولی (Cytopathic Effect: CPE) سلول‌هایی که در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بودند، روزانه با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس معکوس (TS100، Nikon، ژاپن) مشاهده شد. سلول تلقیح شده با ویروس با استفاده از میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی‌های مختلف با سلول‌های غیرآلوده (شاهد منفی) مقایسه شد و تصاویر با استفاده از دوربین دیجیتال (D-70، Nikon، ژاپن) ثبت شد.

در صورت مشاهده آسیب سلولی، پلیت‌ها برای تشخیص ماهیت ویروس و انجام آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس به روش غیرمستقیم (Immunofluorescence Antibody Test: IFAT) مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل با استفاده از آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس غیرمستقیم

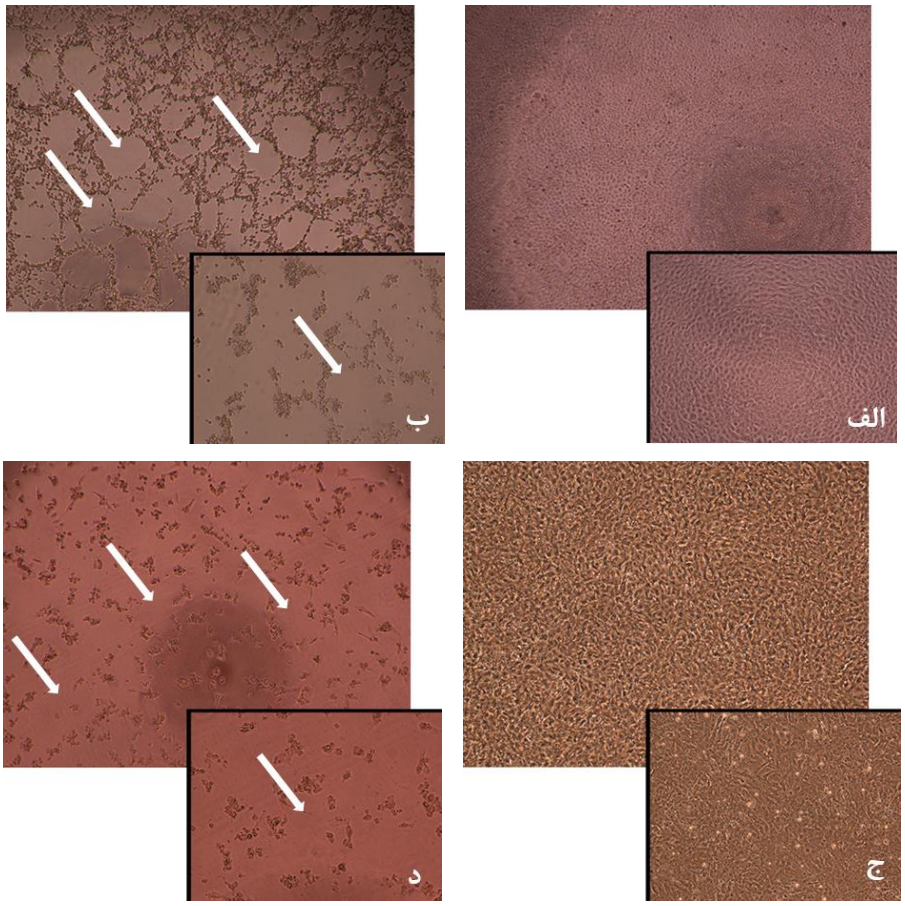
برای تایید حساسیت ویروسی، از آزمایش آنتی‌بادی ایمونوفلورسانس برای رده سلولی EPC و نیز کشت سلولی اولیه باله دمی ماهی سفید، مشابه روشی که توسط Qin و همکاران (۲۰۰۶) توصیف شده بود، استفاده شد. محلول آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد SVCV (Pab Anti SVCV– F77) به نسبت ۱۰۰ :۱ با PBS رقیق شد و بر روی تک لایه سلولی که قبلا ویروس مذکور تلقیح شده بود، قرار داده شد. آنتی‌بادی‌های ضدایمونوگلوبولین IgG خرگوشی کونژوگه شده با فلوئورسین ایزوتیوسیانات (Razi Biotech، ایران) بر روی تک لایه سلولی قرار داده شد. سپس پلیت‌ها پس از قرارگیری در محفظه مرطوبی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس شستشو، در زیر میکروسکوپ معکوس فلورسانس مشاهده شدند.

نتایج

رده سلولی EPC و کشت سلولی باله ماهی سفید قبل و بعد از تلقیح SVCV

تلقیح نمونه ویروسی خالص شده در رقت‌های مختلف بر روی تیره سلولی استاندارد EPC در طول دوره هفت روزه موجب بروز آثار آسیب سلولی (CPE) شد که به عنوان شاهد مثبت در مقایسه با سلول باله دمی استفاده شد (شکل ۱- ب). این در حالی است که در شاهد منفی کشت سلولی EPC هیچگونه آسیب سلولی دیده نشد (شکل ۱- ج). اما تلقیح نمونه ویروسی خالص شده در رقت‌های مختلف به پاساژ پنجم از کشت سلولی اولیه از ماهی سفید دریای خزر (که حاوی سلول‌های شبه اپیتلیال بود) منجر به بروز آثار آسیب سلولی از روز دوم تا هفتم پس از تلقیح شد. آسیب‌های سلولی مشاهده شده شامل گرد شدن سلول‌ها و بروز لیزهای سلولی کانونی در تمامی نمونه‌های آلوده به SVCV بود (شکل ۱- د). بر این اساس تیتراسیون SVCV روی کشت سلولی اولیه محاسبه شد و حساسیت آن با تیره سلولی استاندارد EPC مقایسه شد. هنگامی که CPE مشاهده شد، تیتر به صورت $TCID_{50}$ میلی‌لیتر بیان شد، به همان ترتیبی که این حساسیت در رده سلولی EPC مشاهده شد، کشت سلولی

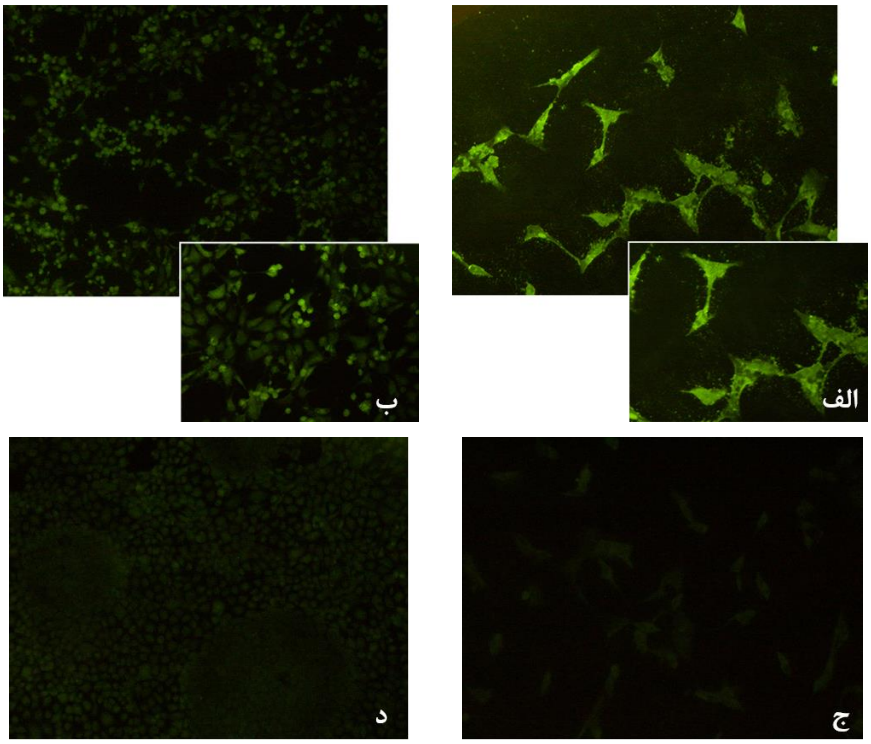
اولیه نیز حساسیت مطلوبی به SVCV نشان داد به طوری که برای رده EPC عدد تیتراسیون ۴×۱۰^{۹} و نیز برای کشت اولیه باله دمی ماهی سفید ۴×۱۰^{۷} به دست آمد.



شکل ۱: آثار آسیب سلولی ناشی از SVCV بر روی سلول‌های EPC و باله دمی ماهی سفید. الف) تصویر میکروسکوپ نوری معکوس از رده سلولی EPC به عنوان شاهد منفی در روز هفتم. ب) آثار تخریب سلولی توسط SVCV در رده سلولی EPC پس از روز هفتم. ج) باله دمی ماهی سفید دریای خزر در پاساژ پنجم. د) آثار تخریب سلول‌ها توسط SVCV پس از تلقیح نمونه ویروسی خالص‌سازی شده به کشت سلولی اولیه باله دمی. نمای چاهک مانند در اثر تخریب سلول‌ها با فلش در هر دو گروه مشخص شده است. تصاویر بزرگتر با عدسی شیئی 40X و تصاویر کوچکتر با عدسی شیئی 100X تهیه شده است.

آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس غیرمستقیم (IFAT)

نتایج این آزمایش روی کشت سلولی اولیه باله دمی ماهی سفید آلوده به ویروس مورد نظر، به وضوح حضور آنتی‌ژن SVCV را به صورت نقاط سبز رنگ درخشان نشان داد (شکل ۲- الف). در نتیجه با مشاهده حضور آنتی‌ژن SVCV در تیره سلولی EPC (شکل ۲-ب) می‌توان ماهیت ویروس‌های جداسازی شده به عنوان عامل ایجاد بیماری و بروز تلفات را در نمونه تکثیر یافته از سلول‌های باله ماهی سفید تایید کرد. این در حالی است که در نمونه شاهد منفی که روی کشت سلولی اولیه سالم باله دمی ماهی سفید (شکل ۲-ج) و نیز تیره سلولی EPC (شکل ۲- د) پس از تلقیح محلول آنتی‌بادی مونوکلونال ضدSVCV (در عدم حضور ویروس SVCV) انجام شد، حضور آنتی‌ژن‌ها مشاهده نشد.



شکل ۲: آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس غیرمستقیم بر روی کشت سلولی باله دمی ماهی سفید دریای خزر و رده سلولی EPC. الف) بروز واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در کشت سلولی باله دمی ماهی سفید دریای خزر

پس از تلقیح SVCV. ب) بروز واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در کشت سلولی EPC پس از تلقیح SVCV. نقاط درخشان نشان دهنده حضور آنتی‌ژن ویروس است (تصاویر بزرگتر با عدسی شیئی 100X و تصاویر کوچکتر با عدسی شیئی 200X). ج) آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس غیرمستقیم در گروه شاهد منفی بر روی سلول‌های سالم کشت سلولی باله دمی ماهی سفید دریای خزر. د) آزمایش آنتی‌بادی فلورسانس غیرمستقیم بر روی رده سلولی EPC پس از تلقیح محلول آنتی‌بادی مونوکلونال ضدSVCV. عدم حضور نقاط درخشان نشان دهنده عدم حضور آنتی‌ژن ویروس است (عدسی شیئی 100X).

بحث

در مطالعه حاضر، با استفاده از کشت سلولی اولیه تولید شده از باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) در مطالعات پیشین (Hadifar et al., 2019) که به عنوان اولین کشت سلولی تولید شده از ماهیان بومی دریای خزر شناخته می‌شود، حساسیت ویروسی نسبت به ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) از طریق مطالعات درون آزمایشگاهی (In vitro) تحت سنجش قرار گرفته است.

هضم آنزیمی، کشت چند ریزنمونه (بافت خرد شده) و کشت سلول‌ها و تکه‌های بافتی که با استفاده از روش‌های مکانیکی ساده به دست می‌آیند، سه روش کلی هستند که می‌توان در کشت اولیه سلول‌ها و بافت‌های ماهی استفاده کرد (Wolf and Ahne, 1982). با توجه به این نکته که کشت ریزنمونه‌ها در مقایسه با کشت‌های به دست آمده با استفاده از سوسپانسیون‌های سلولی، از نظر ساختاری قرابت بیشتری به آزمایش‌های درون‌تنی (In vivo) دارد (Sobhana et al., 2009)، در مطالعه حاضر برای تولید کشت سلولی اولیه از روش کشت ریزنمونه بافتی جداسازی شده از نمونه‌های باله دمی استفاده شد. روش کشت ریزنمونه نسبت به تکنیک‌های دیگر مزایای بسیاری مانند سرعت، سهولت، حفظ برهمکنش‌های سلولی و اجتناب از هضم آنزیمی که می‌تواند به سطح غشای سلول آسیب برساند، دارد (Avella et al., 1994; Freshney and Freshney, 2004).

ایده‌آل‌ترین شرایط رشدی برای رده سلولی جانوران خونسرد بویژه ماهی‌ها، در نتیجه استفاده از محیط کشت L-15 غنی شده با سرم جنین گاوی به دست می‌آید (Leibovitz, 1963) که از رشد کشت سلولی اولیه در مطالعه حاضر نیز به خوبی پشتیبانی می‌کند، اما در ادامه به دلیل ارزان و در دسترس بودن محیط کشت EMEM نسبت به L-15 در طول زمان،

در این مطالعه، این کشت سلول به محیط جدید آداپته (منطبق) شد.

تعامل بین ویروس‌ها و سلول‌های حساس در کشت بافت اغلب منجر به تغییرات سلولی می‌شود که به عنوان اثرات سایتوپاتیک (CPE) شناخته می‌شود. این اثرات و آسیب‌ها شامل تغییرات ریختی و فیزیولوژیکی است که منجر به تغییر متابولیسم سلولی و توقف یا تحریک تکثیر سلولی می‌شود. همچنین این اثر سیتوپاتیک به ربودن منابع سلولی توسط ویروس‌ها برای برآوردن نیازهای ویروسی نسبت داده می‌شود. تعامل ویروس- سلول منجر به نکروز، آپوپتوز، و احتمالا انواع دیگر مرگ سلولی می‌شود (Pereira, 1962; Agol, 2012). در مطالعه حاضر نیز اثرات آسیب سلولی (CPE) در طی پایش هفت روزه و در پایان روز هفتم به وضوح قابل مشاهده بود و طبق نتایج این آزمون، کشت سلولی مورد مطالعه، نسبت به ویروس ویرمی بهاره کپور (SVCV) حساس شناخته شد.

در نتیجه‌ی CPE ناشی از SVCV در رده سلولی EPC، شکل سلول‌ها به صورت سلول‌های گرد و دانه‌ای، خوشه‌های انگور مانند و به شکل Syncytium (سیتوپلاسم شامل تعداد زیادی هسته)های پلاک مانند تغییر یافت که فاصله تجمعات سلولی از یکدیگر نمای چاهک مانند را در زیر میکروسکوپ ایجاد کرد که با انقباض و تجمع سلول‌ها، تشکیل پلاک‌های شفاف و بزرگ و جدا شدن تک لایه سلولی مشخص می‌شود. مجموعه این تغییرات ریختی مشاهده شده درکشت سلولی باله دمی ماهی سفید به دلیل تفاوت در ریخت‌شناسی سلولی‌ها با یکدیگر (بیشتر بودن ابعاد سلول‌ها در باله دمی ماهی سفید)، بسیار متفاوت بودند، تجمعات سلولی کمتر بود و نیز سلول‌ها از یکدیگر فاصله بیشتری گرفته بودند.

مهم‌ترین خاصیت یک ویروس، عفونت‌زایی آن است. برای اندازه‌گیری میزان دقیق عفونت‌پذیری یک رده سلولی نسبت به گونه‌های متفاوتی از ویروس‌ها، می‌توان تکثیر ویروس مورد نظر را در رده سلولی اندازه‌گیری کرد تا یک تیتر معین برای یک استوک مشخص از ویروس به دست آورد. یک تیتر به عنوان تعداد معینی از واحدهای ویروسی عفونی در واحد حجم تعریف می‌شود و یک واحد عفونی کوچک‌ترین مقدار ویروسی است که اثرات تخریبی قابل تشخیصی ایجاد می‌کند. متوسط مقدار عفونی کشت بافت ($TCID_{50}$) به عنوان رقتی از ویروس تعریف می‌شود که برای آلوده کردن ۵۰ درصد از یک کشت سلولی مورد نیاز

است (Lei et al., 2021). میزان $TCID_{50}$ برای ویروس ویرمی بهاره کپور روی رده سلولی تولید شده از باله ماهی سفید، $۴×۱۰^{۷}$ در میلی‌لیتر به دست آمد. که در مقایسه با تیتر آن روی رده سلولی EPC که به میزان $۴×۱۰^{۹}$ در میلی‌لیتر ارزیابی شد، اندکی کمتر است. دلیل این امر ممکن است این باشد که کشت سلولی مشتق شده از باله دمی در برابر تهاجم رابدوویروس میزانی مقاومت از خود نشان می‌دهد و نیز ممکن است به سبب تفاوت در ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول‌های باله با سلول‌های احشایی باشد، چنانکه در مطالعات اخیر که تیتر ویرمی بهار کپور روی رده‌های سلولی تولید شده از انواع گونه‌های ماهیان آزموده شد، به ترتیب روی رده سلولی قلب گونه *Micropterus salmoides* برابر با $۱۰^{۷/۹۶}$ $TCID_{50}$ در میلی‌لیتر (Zeng et al., 2022)، روی رده سلولی پوست گونه *Epinephelus akaara* برابر با $۱۰^{۵}$ $TCID_{50}$ در میلی‌لیتر (Lei et al., 2012) و روی رده سلولی باله دمی گونه Carassius auratus برابر با $۱۰^{۸/۵}$ $TCID_{50}$ در میلی‌لیتر (Yan et al., 2011) به دست آمد.

با توجه به این که مطالعات حساسیت کشت سلولی به ویروس در گونه منحصر به فرد ماهی سفید دریای خزر برای اولین بار در دنیا مورد بررسی قرار گرفته است، مطالعات بیشتر بر روی انواع بافت‌های مختلف از این گونه، می‌تواند راهگشا باشد، همچنان که تلاش برای تولید کشت سلولی اولیه از بافت کلیه همین گونه انجام شده است (نیک‌قربان و همکاران، ۱۳۹۸). بویژه انجام بررسی‌های ترنسکریپتوم که می‌توانند تاثیرات و تغییرات مختص به هر بافت در پاسخ به ویروس را سنجیده و اطلاعات بیشتری برای درک روابط پیچیده بین SVCV و میزبان آن را در اختیار قرار دهند (Wang et al., 2017).

سنجش آنتی‌بادی ایمونوفلورسانس (IFAT) یک روش استاندارد ویروس‌شناسی برای شناسایی حضور آنتی‌بادی‌ها از طریق توانایی خاص آنها در واکنش با آنتی‌ژن‌های ویروسی بیان شده در سلول‌های آلوده است. سنجش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم به طور گسترده به عنوان یک سنجش تاییدی در تشخیص انواع بیماری‌های ویروسی استفاده می‌شود. از آنجایی که این روش یک آزمون اختصاصی است، وجود عوامل بیماری‌زای دیگر را تشخیص نمی‌دهد. در نهایت، تخصص فنی برای تفسیر سنجش‌های IFA مورد نیاز است. خواننده باید با الگوی فلورسانس آشنا باشد و

توانایی تشخیص فلورسانس ویروسی را از پس‌زمینه یا فلورسانس غیراختصاصی داشته باشد (Kennedy, 2005). در مطالعه حاضر نیز به منظور آزمون تایید حساسیت رده سلولی به ویروس، سنجش آنتی‌بادی ایمونوفلورسانس مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آزمون تایید کننده حساسیت کشت سلولی اولیه تولید شده از باله دمی ماهی سفید دریای خزر به ویروس ویرمی بهاره کپور بود، به طوری که نقاط سبز درخشان به وضوح با میکروسکوپ فلورسانس قابل مشاهده بود.

در مجموع، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی حساسیت کشت سلولی اولیه ماهی سفید دریای خزر نسبت به SVCV پرداخته شد. این مطالعه به عنوان یکی از نتایج پایه‌ای مهم برای انجام مطالعات گسترده‌تر بعدی در شناسایی عفونت‌زایی SVCV در ماهی سفید و همچنین اعضای دیگر خانواده کپورماهیان است. همچنین نتایج پژوهش حاضر راهگشایی در برای طراحی واکسن‌های موثر علیه ویرمی بهاره کپور در ایران و به‌کارگیری راهکارهای پیشگیرانه و درمانی است. به علاوه این کشت سلولی از ماهی سفید دریای خزر، در صورت درخواست برای پژوهش‌های بیشتر در حوزه بیوتکنولوژی آبزیان قابل استفاده خواهد بود.

منابع

عبدلی ا. و نادری م. ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان. ۲۴۴ص.

نیک‌قربان س.، حقیقی کارسیدانی س. و قاسمی م. ۱۳۹۸. بررسی شرایط بهینه تهیه کشت سلولی اولیه از کلیه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) به روش کاشتن. زیست‌شناسی دریا، ۱۱: ۹۰-۷۹.

Abadi Z.T.R., Abtahi B., Grossart H.P. and Khodabandeh S. 2021. Microplastic content of kutum fish, *Rutilus frisii kutum* in the southern Caspian Sea. Science of The Total Environment, 752: 1–15 (141542).

Agol V.I. 2012. Cytopathic effects: Virus-modulated manifestations of innate immunity? Trends in Microbiology, 20: 570–576.

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

Ashraf U., Lu Y., Lin L., Yuan J., Wang M. and Liu X. 2016. Spring viraemia of carp virus: Recent advances. Journal of General Virology, 97: 1037–1051.

Avella M., Berhaut J. and Payan P. 1994. Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrax*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal, 30: 41–49.

Emadi H. 1979. The State of the Fishing and Reproduction of the Kutum, *Rutilus frisii kutum*, in the Caspian Sea of Iran. Journal of Ichthyology, 19(4): 151–154.

Fazli H. and Parafkandeh Haghighy F. 2016. Spatiotemporal abundance and diversity of bonyfishes in beach seines in Iranian waters of the Caspian Sea. Fisheries Science and Technology, 5: 109–120.

Fazli H., Daryanabard G., Pourgholam R., Abdolmalaki S., Bandani A., Pourgholami A. and Safavi S. 2012. Qualitative assessment of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum* Kamensky 1901) stocks in Iranian waters of the Caspian Sea (1991-2011). Iranian Scientific Fisheries Journal, 21: 53–64.

Freshney R.I. and Freshney M.G. 2004. Culture of Epithelial Cells. John Wiley and Sons, USA. 441P.

Gardell A.M., Qin Q., Rice R.H., Li J. and Kultz D. 2014. Derivation and osmotolerance characterization of three immortalized tilapia (*Oreochromis mossambicus*) cell lines. PLoS One, 9: 1–14 (e95919).

Ghasemi M., Zamani H., Hosseini S., Karsidani S.H. and Bergmann S. 2014. Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) as a host for spring viraemia of carp virus. Veterinary Microbiology, 170: 408–413.

Hadifar M., Haghighi Karsidani S. and Ghasemi M. 2019. The Primary cell culture from caudal fin tissue of Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*). Iranian Scientific Fisheries Journal, 28: 95–104.

Iranian Fisheries Organization, 2019. Annually Statistical Report, Iranian Fisheries Organization, Iran. 64P.

Kennedy M. 2005. Methodology in diagnostic virology. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice, 8: 7–26.

Lakra W., Swaminathan T.R. and Joy K. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. Fish Physiology and Biochemistry, 37: 1–20.

Lei C., Yang J., Hu J. and Sun X. 2021. On the calculation of TCID 50 for quantitation of virus infectivity. Virologica Sinica, 36: 141–144.

Lei X.Y., Chen Z.Y., He L.B., Pei C., Yuan X.P. and Zhang Q.Y. 2012. Characterization and virus susceptibility of a skin cell line from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Fish Physiology and Biochemistry, 38: 1175–1182.

Leibovitz A. 1963. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. American Journal of Hygiene, 78: 173–180.

Pereira H. 1962. The cytopathic effect of animal viruses. Advances in virus research, 8: 245–285.

Petty B.D., Riggs A.C., Klinger R., Yanong R. and Francis-Floyd R. 2002. Spring Viremia of Carp. Fact Sheet VM-142, University of Florida Cooperative Extension Institute of Food and Agricultural Sciences. 4P.

Sobhana K., George K., Venkat Ravi G., Ittoop G. and Paulraj R. 2009. Development of a cell culture system from gill explants of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Shneider). Asian Fisheries Science, 22: 541–547.

Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T.Y., 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(3): 203–210.

Volpato G.L., Goncalves-De-Freitas E. and Fernandes-De-Castilho M. 2007. Insights into the concept of fish welfare. Diseases of Aquatic Organisms, 75: 165–171.

Wang Y., Zhang H., Lu Y., Wang F., Liu L., Liu J. and Liu X. 2017. Comparative transcriptome analysis of zebrafish (*Danio rerio*) brain and spleen infected with spring viremia of carp virus (SVCV). Fish and Shellfish Immunology, 69: 35–45.

Wolf K. and Ahne W. 1982. Fish cell Culture. Advances in Cell Culture, 2: 305–328.

Yan W., Nie P. and Lu Y. 2011. Establishment, characterization and viral susceptibility of a new cell line derived from goldfish, *Carassius auratus* (L.), tail fin. Journal of Fish Diseases, 34: 757–768.

Zamani H., Ghasemi M., Hosseini S. and Karsidani S.H. 2014. Experimental susceptibility of Caspian white fish, *Rutilus frisii kutum* to Spring viraemia of carp virus. Virus Disease, 25: 57–62.

Zeng W., Dong H., Chen X., Bergmann S.M., Yang Y., Wei X., Tong G., Li H., Yu H. and Chen Y. 2022. Establishment and characterization of a permanent heart cell line from largemouth bass *Micropterus salmoides* and its application to fish virology and immunology. Aquaculture, 547: 1–12 (737427).

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 11, No. 1, Spring 2023

Research Paper

Investigation on susceptibility of the Caspian kutum (*Rutilus kutum*) primary caudal fin cells to spring viremia of carp virus

Seyed Abolfazl Alaei[1], Somayeh Haghighi Karsidani[2]*, Mohaddes Ghasemi[3]

DOI: 10.22124/japb.2022.21587.1456

Received: January 2022 Accepted: May 2022

Abstract

In this *in vitro* study the susceptibility of primary caudal fin cells of Caspian Whitefish (*Rutilus kutum*)- as the mast commercial endemic fish in the southern Caspian Sea- was examined to the spring viremia of carp virus (SVCV), the acute infectious, hemorrhagic and contagious agent. For this purpose, the primary cell culture was established from the caudal fin of fingerlings, using tissue explant technique and trypsinization of minced tissues. After the propagation of SVCV's standard strain, the different dilutions of virus, in six replicates, were inoculated to 96-well plates which was contained primary caudal fin monolayer of cells after 5 passages, and the EPC cell line. In order to evaluation of virus characterization, an indirect immunofluorescent antibody test was hired. The clearly observable cytopathic effects and emergence of SVCV antigens as light fluorescence spots in both primary culture of caudal fin cells and the EPC cell line, highly confirmed the susceptibility of caudal fin primary cells to the SVCV.

Key words: *Indirect Immunofluorescent Antibody Test, Cytopathic Effect, Primary Cell Culture,* Rutilus kutum, Rhabdovirus carpio.

1- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Bandar Anzali Branch, Islamic Azad University, Bandar Anzali, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Bandar Anzali Branch, Islamic Azad University, Bandar Anzali, Iran.
3- Assistant Professor in Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

*Corresponding Author: haghighikarsidani@yahoo.com