



## غیرفعال سازی ویروس *Rhabdovirus carpio* (ویروس ویرمی بهاره کپور) با استفاده از نانوذرات نقره در سلول های رده EPC

بابک رضانی عاقله<sup>۱</sup>، محدث قاسمی<sup>۲\*</sup>، حجت اله زمانی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: شهریور ۹۵

تاریخ پذیرش: آبان ۹۵

### چکیده

در میان عوامل بیماری زای آبزیان، نقش ویروس ها از همه بارزتر بوده، خسارات وارده به علت درمان ناپذیری، سرایت پذیری شدید و تشخیص دشوار مهم تر از سایر عوامل بیماری زا است. در این مطالعه اثر ضد ویروسی نانوذرات نقره بر ویروس *Rhabdovirus carpio* عامل ویرمی بهاره کپور (SVCV)، از طریق مواجهه سازی سلول های EPC آلوده به ویروس با نانوذرات نقره بررسی شد. در ابتدا سمیت سلولی نانوذرات نقره بر روی تیره سلولی تعیین شد و از غلظت های پایین تر از غلظت نیمه سمی ( $50\text{CC}_{50}$ ) برای مواجهه سازی استفاده شد. مواجهه سازی سلول های آلوده به ویروس با نانوذرات نقره به دو روش تلقیح همزمان و تلقیح با تاخیر چهار ساعته انجام شد. سلول های تلقیح شده، به مدت شش روز، از نظر بروز آثار آسیب سلولی و تغییرات جمعیت سلول های زنده بررسی شدند. بر اساس نتایج، غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره در سلول های EPC  $62\text{mg/L}$  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٪ سلول های شاهد آلوده با ویروس خالص تخریب شدند. بر اساس این مطالعه، نانوذرات نقره در غلظت های با سمیت کم از قابلیت مناسبی در غیرفعال سازی ویروس ویرمی بهاره کپور برخوردار است و می تواند به عنوان یک عامل ضد ویروسی در مهار عفونت حاصل از SVCV در آبی پروری مدنظر قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** آبی پروری، عامل ضد ویروسی، ویرمی، نانوذره.

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
  - ۲- استادیار پژوهشکده آبی پروری آب های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.
  - ۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- \* نویسنده مسئول: [mohades@yahoo.com](mailto:mohades@yahoo.com)

## مقدمه

نانوذرات نقره همچون بسیاری از مواد ضد میکروبی قادر به ایجاد اثرات سمیت در موجودات زنده در درجات مختلف است. بنابراین تعیین غلظت‌های با سمیت پایین و در عین حال با کارایی بهینه برای به کارگیری در صنایع و مصارف گوناگون حائز اهمیت است (Ahamed et al., 2010).

ویرمی بهاره کپور یا (Spring) SVC (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*

نانوذرات به ذراتی گفته می‌شوند که حداقل یکی از ابعاد آن‌ها در محدوده ۱-۱۰۰ 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، اخیراً 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 ضد میکروبی نقره از دیرباز مورد توجه قرار داشته است. اخیراً نانوذرات نقره به دلیل قابلیت ضد میکروبی مناسب در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و ترکیبات ضد عفونی‌کننده و گندزدا مورد استفاده وسیعی قرار گرفته‌اند (Ahamed et al., 2010). با این وجود،

و فارچی بوده است، کارایی این نانوذرات در غیرفعال‌سازی ویروس‌ها کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به قابلیت ضد میکروبی گسترده نانوذرات نقره، به کارگیری آنان در صنایع آبی‌پروری برای کنترل پاتوژن‌های آبیان امری قابل انتظار 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 (Merck, Medium، آلمان) و در فلاسک‌های ۲۵cm<sup>۲</sup> انجام شد. پس از آماده‌سازی سلول‌های

بوده، دارای ظاهری فشنگی شکل و پوشینه لپیدی است (Ahne et al., 2002). این ویروس انتشار جهانی دارد و بنا بر گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) در زمره خطرناک‌ترین ویروس‌های آبیان 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 آبی 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

در ابتدا سوسپانسیون‌های آبی یکنواختی از نانوذرات نقره با رقت‌های ۷/۷۵، ۱۵/۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/L تهیه شد و به میزان ۱۵۰ μL 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°C، 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<sub>50</sub>)<sup>۱</sup> 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<sub>50</sub> (۳۱ mg/L) برای مواجهه‌سازی با SVCV مورد استفاده قرار گرفت.

EPC در فلاسک‌های ۲۵cm<sup>۲</sup> 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 ۱۵۰ μL 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 °C 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) ۲۰ nm بود.

1- 50% Cytotoxicity Concentration

## 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 (S۳۰) Z۳۷۵۰۵/۱ (آزمایشگاه مرجع بیماری‌های ماهیان اتحادیه اروپا، دانمارک) استفاده شد (Stone et al., 2003). 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 ۰/۴۵μm فیلتر شد و به میزان ۲cc-۱/۵ به فلاسک‌های حاوی سلول‌های رشد یافته EPC اضافه شد. تمامی فلاسک‌ها در دمای ۱۵C گرم‌گذاری 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) 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 ۴C 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 مواجهه‌سازی تجربی، در محیط EMEM استریل و در دمای ۸۰C- نگهداری شد (Haenen and Davidse, 1993).

## تیتراسیون ویروس و تعیین دوز مواجهه‌سازی

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- Cytotoxic Effects

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  $200 \mu\text{L}$  از این ترکیب به چاهک‌های حاوی سلول EPC اضافه شد. آزمایش‌های مواجهه‌سازی در شش تکرار انجام شد و شاهد‌های مثبت مورد استفاده شامل شاهد ویروس خالص و شاهد نانوذره نقره (با غلظت پایین‌تر از  $\text{CC}_{50}$ ) 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 تیتراهای 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.

نظر گرفته شدند. پلیت تیتراسیون پس از تلقیح در یک محفظه مرطوب قرار داده شد و به دمای  $15^{\circ}\text{C}$  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 تیترو ویروسی به صورت  $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  بیان شد.  $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰٪ از خانه‌های پلیت کشت سلولی شود.

رابطه ۱:

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = \text{Anti log} [-1 - \left(\frac{\text{CPE}}{100} - 0.5\right)]$$

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

#### مواجهه‌سازی نانوذرات نقره با SVCV در سلول‌های EPC

مواجهه‌سازی نانوذرات نقره با SVCV به دو روش مواجهه‌سازی همزمان و تاخیری انجام شد. در روش همزمان،  $100 \mu\text{L}$  سوسپانسیون نانوذره نقره با غلظت  $31 \text{ mg/L}$  و  $100 \mu\text{L}$  از محلول ویروسی با تیترو  $\text{TCID}_{50}/\text{mL} = 10.5 \times 10^3$  به

## نتایج

استفاده شد. جدول ۱ تغییرات جمعیت سلول‌های EPC را در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نشان می‌دهد.

تعیین غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره بر سلول‌های EPC

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

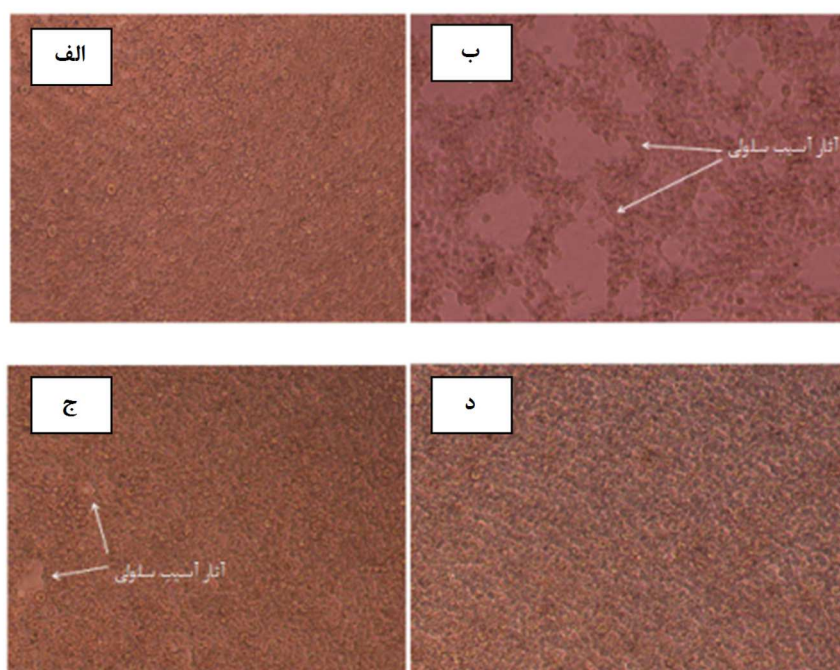
به منظور تعیین غلظت نیمه سمی نانوذرات نقره بر سلول‌های EPC، غلظت‌های متعدد نانوذرات نقره با سلول‌های EPC مجاور شد و تغییرات جمعیت سلول‌های زنده به صورت روزانه و به مدت ۹۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت و در پایان این مدت غلظت ۶۲ mg/L به عنوان غلظت نیمه سمی تعیین شد. با توجه به این نتایج، از غلظت کمتر از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

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

تعداد سلول‌های مرده (Cell/mL)				تعداد اولیه سلول EPC (Cell/mL)	غلظت نانوذرات نقره (mg/L)
۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت		
$6/5 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	$6/2 \times 10^3$	$5/7 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۱۰۰۰
$6/5 \times 10^3$	$6/1 \times 10^3$	$5/4 \times 10^3$	$4/9 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۵۰۰
$5/9 \times 10^3$	$5/6 \times 10^3$	$4/8 \times 10^3$	$4/5 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۲۵۰
$3/9 \times 10^3$	$3/9 \times 10^3$	$3/3 \times 10^3$	$3/1 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۱۲۵
$2/9 \times 10^3$	$2/9 \times 10^3$	$2/8 \times 10^3$	$2/7 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۶۲
$1/4 \times 10^3$	$1/3 \times 10^3$	$1/3 \times 10^3$	$1/0 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۳۱
$0/2 \times 10^3$	$0/2 \times 10^3$	$0/5 \times 10^3$	$0/7 \times 10^3$	$6/5 \times 10^3$	۱۵
.	.	.	.	$6/5 \times 10^3$	۷/۵

آسیب‌های سلولی شامل گردشگری 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 طوری که 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.

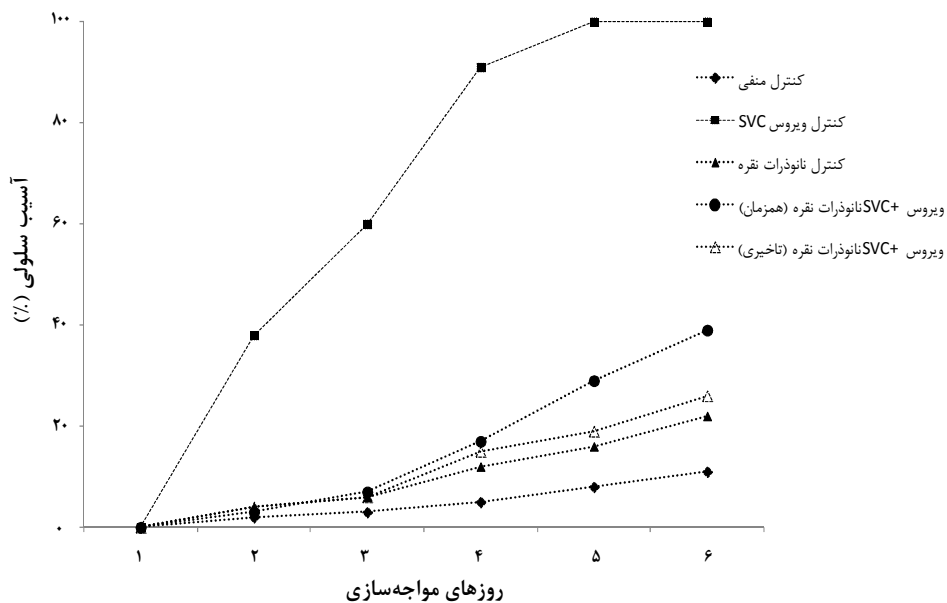


شکل ۱: سلول‌های EPC در روز سوم مواجه‌سازی. الف) تیمار شاهد منفی (ب) تیمار شاهد ویروس (ج) تیمار مواجه‌سازی همزمان ویروس و نانوذرات نقره (د) تیمار مواجه‌سازی تاخیری ویروس و نانوذرات نقره (بزرگنمایی تصاویر ۱۰۰ برابر).



علاوه بر این، تخریب سلولی در تیمارهای مواجهه‌سازی 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 مواجهه‌سازی همزمان بود. بر اساس نتایج، در پایان دوره مواجهه‌سازی سلول‌های EPC با

SVCV، در تیمار شاهد ویروس تمامی سلول‌ها از بین رفتند در حالی که میزان تخریب سلولی در تیمارهای مواجهه‌سازی 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

## بحث

مطالعات بر روی ویروس‌های انسانی انجام یافته است (Gaikwad et al., 2013; Mori et al., 2013). صنایع آبزی پروری از ارکان اقتصادی مهم در بسیاری از مناطق دنیا است و میکروبه‌های 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 مواجهه‌سازی نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف با سلول‌های EPC غلظت نیمه سمی نانوذرات ( $62 \text{ mg/L}$ ) محاسبه شد و سپس از غلظت‌های پایین‌تر از غلظت نیمه سمی ( $31 \text{ mg/L}$ ) به منظور آزمایش‌های غیرفعالسازی ویروس استفاده شد.

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 ضد میکروبی آن‌ها در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر نقره می‌شود (Pokharkar et al., 2014).

خواص ضد میکروبی موثر نقره منجر به استفاده روزافزون آن در صنایع بهداشتی، آرایشی و دارویی شده است. تاکنون پژوهشگران بسیاری به بررسی کارایی ضد میکروبی 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

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.

مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره از پتانسیل بسیار بالایی در غیرفعال‌سازی SVCV برخوردار بود. مقایسه تیمارهای مواجهه‌سازی 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 ضد میکروبی 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) 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 مستقیماً قادر هستند به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها به ویژه گروه عاملی SH- اتصال یابند که این امر منجر به تغییراتی

## 1- Reactive Oxygen Species

تأثیر نانوذرات نقره بر روی ویروس‌های هیپاتیت B، RSV (Respiratory Syncytial 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., 2014; Khandelwal et al., 2013). علاوه بر این فعالیت ضد میکروبی 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 کیپور 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 ضد میکروبی 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 ضد ویروسی مناسب باشند در کنترل عفونت ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین نانوذرات نقره

علاوه بر این، مقایسه میزان تلفات سلولی در دو تیمار مواجهه‌سازی همزمان و تاخیری نشان داد که اگر SVCV پیش از ورود به سلول با نانوذرات نقره مواجهه‌سازی 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 مواجهه‌سازی 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 ضد عفونی 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.

### تشکر و قدردانی

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.

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.

## منابع

- محمدى ع. و زمانى ح. ۱۳۹۰. مرجع كامل ميكروپشناسى عمومى. انتشارات آراد. ۵۴۰ ص.
- Ahamed M., Alsali 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 antibacterial 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.

- 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: Nanoplatfoms 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 antimicrobial 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.



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

Babak Ramezani Aghelah<sup>1</sup>, Mohades Ghasemi<sup>2\*</sup>, Hojjatolah Zamani<sup>3</sup>

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<sub>50</sub>) of Ag-NPs in EPC cells was determined and the concentration 0.5 CC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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](mailto:mohades@yahoo.com)