شماره: .....

تاریخ: / /

بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران

۷ تا ۹ آبان ۱۳۹۲

21st National Congress of Food Science and Technology

29 - 31 Oct 2013

بسمه تعالی

پژوهشگران محترم «دینا شهرام پور، مسعود یاورمنش، محمدباقر حبیبی نجفی، محبت محبی و مژگان یزدی»

به پاس ارائه پوستر تحت عنوان «ارزیابی حضور Male specific coliphages به عنوان نماینده ای از ویروسهای روده ای در سبزی تره و جعفری»

در بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران که در تاریخ ۹-۷ آبان ماه ۱۳۹۲ در دانشگاه شیراز برگزار گردید، از شما تشکر و قدردانی نموده و امید است حضور شما گام بلندی در عرصه های نوآوری، شکوفایی و پیشرفت کشور عزیزمان ایران اسلامی باشد.

دبیر علمی

دکتر عسگر فرحناکی

دبیران اجرایی

دکتر محمدهادی اسکندری دکتر مهرداد نیاکوثری

بیست و یکمین کنگره ملی
علوم و صنایع غذایی ایران
۷ تا ۹ آبان ۱۳۹۲ – دانشگاه شیراز
21st National Congress of Food Science and Technology

ارزیابی حضورMale specific coliphages به عنوان نماینده ای ازویروسهای روده ای درسبزی تره وجعفری

دیناشهرام پور[۱*]، مسعودیاورمنش[۲] ، محمد باقرحبیبی نجفی[۲] ، محبت محبی[۲]،مژگان یزدی[۱]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشدمیکروبیولوژی موادغذایی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی ،دانشکده کشاورزی ،دانشگاه فردوسی مشهد

Dina_shahrampour@yahoo.com*

چکیده :

دردهه اخیر بیماریهای التهابی روده- معده ناشی ازویروس های روده ای گسترش یافته ومیوه ها وسبزیجات خام به عنوان یکی از عوامل انتقال این عفونت ها شناخته شده اند . با توجه به اینکه بسیاری ازویروس های روده ای دوزعفونت زایی پایینی دارندو تنها ۱۰۰-۱۰ذره ویروسی درموادغذایی برای ایجاد بیماری کافی است و همچنین دشواری شناسایی آنها درموادغذایی ازاین رو امروزه ازباکتریوفاژ ها به خصوص FRNA(male specific) کلی فاژها به عنوان شاخص ویروسی برای آلودگی مدفوعی درآب و موادغذایی استفاده می گردد. هدف از این مطالعه بررسی حضوراین باکتریوفاژهای male specific به عنوان جانشین ویروس های روده ای درسبزی تره وجعفری که معمولابه صورت خام مصرف می شوند، می باشد.بدین منظورپس از بازیافت باکتریوفاژها ازسطح نمونه های سبزی توسط روش ترسیب باپلی اتیلن گلایکول ، آزمون شمارش پلاک(Double agar layer)DAL مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج تعداد متفاوتی از male specific کلی فاژها درنمونه های سبزی مورد شمارش قرار گرفت که بیانگرآلودگی متفاوت این نمونه ها بود.دراین میان تنها ۷ نمونه از ۱۰(۷۰٪)نمونه سبزی جمع آوری شده ازسطح مزارع و۳ نمونه از۱۰ (۳۰٪)نمونه بازاری نسبت به حضور باکتریوفاژهای male specific مثبت بودند. بنابراین می توان ازکلی فاژها FRNA(male specific) به عنوان شاخص ویروسی برای آلودگی مدفوعی درسبزی تره و جعفری استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ***ویروسهای روده ای ، Male specific کلی فاژها ، تره وجعفری ، آزمون شمارش پلاک DAL***

مقدمه :

دردهه اخیر بیماریهای التهابی روده- معده (گاستروانتریت) ناشی ازویروس های روده ای گسترش یافته ومیوه ها وسبزیجات خام به عنوان یکی از عوامل انتقال این عفونت ها شناخته شده اند . ازآنجاییکه ویروس ها جهت تکثیربه میزبان اختصاصی نیازدارند برروی موادغذایی قادر به رشد نیستند وحضور آنها برروی میوه ها وسبزیجات تازه ناشی از آلودگی مدفوعی است .این آلودگی درطی رشد گیاهان از طریق آبیاری مزرعه با آبهای آلوده واستفاده ازفضولات حیوانی به عنوان کود و یا درطی برداشت یا فراوری توسط دست آلوده به مواد مدفوعی افراد به سطوح میوه ها وسبزیجات منتقل می گردد(۷،۳،۲) . بیش از۱۰۰نوع ویروس روده ای درروده انسان شناخته شده که ازطریق مدفوع ازبدن خارج می گردند اما تنها تعدادی ازآنها شامل : نورووویروس ها ، انتروویروس ها ، آدنوویروس ها ، آستروویروس ها ، هپاتیت A و E می توانند توسط آب وموادغذایی ازمسیرمدفوعی – دهانی منتقل

گردند. بسیاری ازویروسهای روده ای دوزعفونت زایی پایینی دارند یعنی تنها ۱۰۰-۱۰ذره ویروسی درموادغذایی برای ایجاد بیماری کافی است،به علاوه بسیاری ازویروسهای ناشی از غذافاقدپوشش هستند ومقاومت بالایی به استرسهای محیطی مثل گرما،pHبالا وپایین،خشک کردن ،نورواشعه UVنشان می دهندکه به آنها این امکان را می دهد که طی ۲روز تا۴هفته عفونت زایی شان را درماده غذایی حفظ کنند.(۸) به دلیل غلظت پایین ویروسها درموادغذایی و پایین بودن دوزعفونت زایی آنها بکار گیری روشهایی با حساسیت بالا جهت استخراج وتشخیص حضورآنها درموادغذایی به منظور پیشگیری مخاطرات سلامتی ضروری به نظرمی رسد. روشهای مختلفی مانند اولترا فیلتراسیون ،اولترا سانتریفوژ، ترسیب با پلی اتیلن گلایکول واستفاده از ذرات مغناطیسی برای استخراج ، تغلیظ و شناسایی ویروسها در موادغذایی مختلف ارائه شده است،که دراین مطالعه ازروش ترسیب با پلی اتیلن گلایکول که روشی ارزان وپرکاربرد برای انواع موادغذایی می باشد ، استفاده شد.اکثر ویروس ها ی روده ای درکشت سلولی تکثیرنمی یابند وتشخیص آنها درنمونه های غذایی به کمک میکروسکوپ الکترونی و یاروشهای مولکولی امکان پذیر است که روش های گران وزمان بری هستند. (۱)ازاین روجهت بررسی حضورویروسهای روده ای ازباکتریوفاژها به خصوص گروهی ازآنها به نام Male Specific FRNA کلی فاژها که سالهاست به عنوان شاخص ویروسی آلودگی مدفوعی درآب و موادغذایی پیشنهاد شده اند، استفاده می گردد.(۴،۵)ازویژگی این فاژها این است که برخلاف باکتریها درمحیط تکثیرنمی شوند،ازنظرساختار و ویژگی ها به ویروس های روده ای شباهت داشته و برخلاف آنها به آسانی درمحیط های کشت حاوی باکتری میزبان مناسب درآزمایشگاه کشت داده می شوند و ترکیب معمول فلور روده پستانداران را تشکیل می دهند (۲). هدف از این مطالعه نیزبررسی حضوراین باکتریوفاژها به عنوان جانشین ویروس های روده ای درسبزی تره وجعفری می باشد. درایران استفاده ازسبزی خوردن درکناروعده های غذای بسیارمرسوم است ودو سبزی تره وجعفری درمیان سایرسبزی ها بسیارپرطرفداروپرمصرف می باشند ازاین روبررسی آلودگی ویروسی دراین دو سبزی اهمیت دارد.

موادوروش :

جهت استخراج ویروسها ازسطح موادغذایی روش های مختلفی پیشنهاد شده است که دراین میان روش ترسیب باپلی اتیلن گلایکول برای انواع موادغذایی مناسب بوده ونتایج حاصل ازآن تکرارپذیری خوبی دارند.به همین دلیل دراین پژوهش ازاین روش به دلیل بازیافت نسبتا بالاترباکتریوفاژ استفاده شد.

- روش ترسیب با PEG (Polyethylene glycol) :

۲۰نمونه سبزی جمع آوری شده ازسطح بازار ومزرعه های نیشابور تا زمان آزمایش دریخچال دردمای C °۴ نگهداری شدند. ابتدا ۱۰گرم نمونه سبزی (مخلوط بخشهای مختلف تره وجعفری) داخل کیسه استومیکر قرار گرفت ، سپس ۴۰میلی لیتر محلول بافر شست وشو (100mMTris-Hcl,50mMglycin,1%beefextract, pH=9.5) اضافه وکیسه به مدت ۱۰دقیقه داخل دستگاه استومیکر قرار گرفت. جهت کنترل مثبت میزان ۱۰۰ماکرولیتر سوسپانسیون باکتریوفاژ MS2 با غلظت $۱۰^{۴}$ به عنوان نماینده باکتریوفاژهای male specific به صورت نقطه گذاری برروی ۱۰گرم نمونه سبزی تلقیح شد و پس ازسپری شدن ۳۰ دقیقه درزیر هود لامینار به منظورخشک شدن سطح سبزی ، بابافرشست وشو شستشو داده شد ومراحل بعدی مشابه نمونه های دیگر برروی آن اعمال گردید.درمرحله بعد محلول شست وشو توسط بخش فیلتری کیسه ازسبزیها جداشده و تحت سانتریفوژ(۱۰۰۰۰*g برای ۳۰دقیقه ودردمای C °۴) قرار گرفت. سپس pH سوپرناتانت جداشده در حدود ۰/۲± ۷/۲ تنظیم و با ۰/۲۵حجمش از محلول پلی اتیلن گلایکول(50% PEG8000 +1.5M Nacl) مخلوط گردید. این محلول برای ۲ساعت دردمای C°۴ نگهداری شد. ویروس ها سپس بوسیله سانتریفوژ(۱۰۰۰۰*g برای ۳۰دقیقه ودردمای C °۴) تغلیظ شده و پلت یا رسوب حاصل در۵۰۰ ماکرولیتر بافرفسفات حل گردید.

پس از اعمال ورتکس ، مخلوط درنهایت جهت شمارش باکتریوفاژ (آزمون DAL) به تیوپی تمیز انتقال یافت (۶).(شکل۱)

شست وشو۱۰گرم نمونه سبزی با بافرTGBE

↓

سانتریفوژ g*۱۰۰۰۰,۳۰دقیقه, C ۴°

↓

تنظیم pHسوپرناتانت تا۷/۲±۰/۲ و ترسیب باPEG ۲ساعت, C ۴°

↓

سانتریفوژ g*۱۰۰۰۰,۳۰دقیقه, C ۴°

↓

حل کردن پلت دربافرفسفات

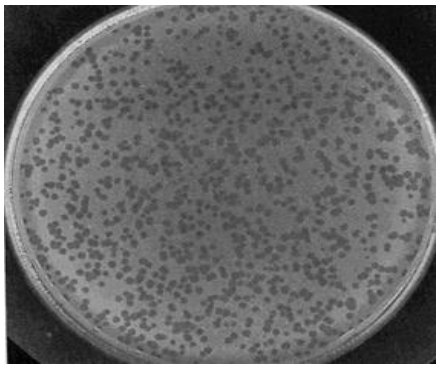
↓

انتقال مخلوط به تیوپی تمیز

شکل ۱-فلوچارت روش ترسیب با PEG(کاترین چرر وهمکاران ,۲۰۱۰).

- تعیین تعداد باکتریوفاژهایmale specific درنمونه های سبزی به روش DAL (Double agar layer) :

پس ازاستخراج ویروسها ازسطح نمونه های سبزی توسط روش ترسیب باپلی اتیلن گلایکول ، پلت یارسوب حاصل ازآخرین سانتریفوژ که در ۵۰۰ ماکرولیتر بافرفسفات حل شده جهت آزمون DAL مورد استفاده قرار گرفت. در این روش۵۰۰ ماکرولیتر از نمونه بازیافتی علاوه بر ۵۰ ماکرولیتر آنتی بیوتیک(استرپتومایسین وآمپی سیلین به نسبت۱:۱) و ۱۰۰ماکرولیتر باکتری E.coli Famp در فاز لگاریمی (به عنوان میزبان باکتریوفاژهای Male specific) به۵ ml محیط کشتTSB (۰/۷٪آگار) اضافه شد. پس از ورتکس نمودن نهایی، و پاشش این مخلوط برروی پلیت دارای محیط کشت TSA حاوی آنتی بیوتیک(استرپتومایسین وآمپی سیلین به نسبت۱:۱) به مدت ۲۴-۱۶ساعت دراینکوباتور با دمای C ۳۷° قرار گرفت. پس ازگذشت زمان مشخص باکتریوفاژها بر روی محیط کشت به صورت نقاط شفافی به نام پلاک مشاهده شدند(شکل ۲)،که می توان جهت تعیین شمار باکتریوفاژها درنمونه سبزی پلاکها را مورد شمارش قرار داد(۱۰). آزمون DAL با دوتکرار برای هرنمونه انجام و میانگین تعداد پلاک ها گزارش شد.



شکل۲: کشت دولایه یاDAL جهت تعیین تعدادباکتریوفاژ

نتایج وبحث :

بر اساس نتایج تعداد متفاوتی از male specific کلی فاژها درنمونه های سبزی مورد شمارش قرار گرفت که بیانگرآلودگی متفاوت این نمونه ها می باشد. دراین میان تنها ۷ نمونه از۱۰ (۷۰٪)نمونه سبزی جمع آوری شده ازسطح مزارع نیشابور و۳نمونه از۱۰ (۳۰٪)نمونه بازاری نسبت به حضور باکتریوفاژهایmale specific مثبت بودند.رنج باکتریوفاژهای شمارش شده برروی سبزی تره وجعفری به کمک آزمون DAL، pfu/ml ۷۰-۲بود. انتقال ویروس ها و باکتریوفاژها به سطوح سبزیجات درطی رشد آنها در مزرعه ازطریق آب آلوده به مدفوع و یا کودهای حیوانی و درطی برداشت و فراوری آنها ازطریق دست آلوده افراد ، می تواند صورت گیرد. FRNA(male specific) کلی فاژها از نظر ساختار و مقاومت به استرسهای محیطی به ویروسهای روده ای شباهت دارند و به آسانی کشت داده می شوند همچنین برخلاف باکتریها ی مدفوعی درمحیط تکثیرنمی شوند و حضور آنها برروی میوه ها و سبزیجات تازه ناشی از آلودگی مدفوعی است و برحضور ویروس های روده ای دلالت دارد . باوجود موفقیت کشت باکتریوفاژها ، بکارگیری تکنیک های مولکولی مانند PCRو RT-PCR جهت شناسایی دقیق وتعیین منشا آنها مطلوب می باشد.

نتیجه گیری کلی :

باتوجه به شباهت های کلی فاژها male specific به ویروس های روده ای و راحتی کاربا این گونه فاژها درمحیط های آزمایشگاهی می توان ازکلی فاژها FRNA(male specific) به عنوان شاخص ویروسی برای آلودگی مدفوعی ویروسی در موادغذایی مختلف ازجمله سبزیجات(تره و جعفری) استفاده نمود.

منابع :

1. Bern, C., and Glass, R. I. 1994.Impact of diarrheal diseases worldwide. In: Viral Infections of the Gastrointestinal Tract,2nd edn.(Kapikian,A.Z.,Ed.),pp.1-26.Marcel Dekker,New York.
2. Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A. 2000. Contamination of foods by food handlers:experiments on hepatitis A virus transferred to food and its interruption. *Applied and Environmental Microbiology*. *66*,2759–2763.
3. Cook, N., and Rze_zutka, A. 2006. Hepatitis viruses. In: Motarjemi, Y., and Adams, M.(eds) Emerging foodborne pathogens, pp. 282–308. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
4. Grabow, W.2000. Bacteriophages:Update on application as models for viruses in water. *Water Science. 27*,251-268.
5. Jones, H and Johns, W.2009.Improved detection of F-specific RNA coliphages in fecal material by extraction and Polyethylene glycol precipitation. Journal of Applied and Environmental Microbiology,75:6142-6146.
6. Scherer, K ., Johne, R., Schrader, C., Ellerbroek, L., Schulenburg, J., Klein , G.2010. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. Journal of Virological Methods ,169 :22–27.
7. Seymour, I.J., and Appleton, H. 2001. Foodborne viruses and fresh produce: A review. *Applied and Environmental Microbiology. 91*, 759–773.

8. Stals , A., Baert , L., Van Coillie , E., Uyttendaele, M.2011. Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. Journal of Food Microbiology ,53:1–9**.**

9. Summa, M., Bonsdorff, C.H.V., Maunula, L.2012. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *Journal of Virological Methods*.

10. U.S.Environmental Protection Agency.2001.method 1602:Male specific (F^+)and somatic coliphage in water by single agar layer(SAL)procedure.