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

پژوهشگر محترم ◄ **مرجان یزدی**، مسعود یاورمنش، محبت محبی، معصومه بحرینی، دینا شهرام پور ►

به پاس ارائه پوستر تحت عنوان ◄ **بررسی حضور باکتریوفاژ Male specific($F^+$)RNA به عنوان نماینده ای از ویروس های روده ای، با استفاده از روش های مولکولی و مبتنی بر کشت، از سطح نمونه های کاهو** ►

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 شکر 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 فرخناکی

دبیران اجرایی

دکتر محمد هادی 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

# بررسی حضور باکتریوفاژ Male specific($F^+$)RNA به عنوان نماینده ای از ویروس های روده ای، با استفاده از روش های مولکولی و مبتنی بر کشت، از سطح نمونه های کاهو

**مژگان یزدی[۱*]، مسعود یاورمنش[۲]،محبت محبی[۳]، معصومه بحرینی[۴]، دینا شهرام پور[۱]**

۱-* دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

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

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

yazdi.mojgan@yahoo.com

**چکیده**

در این پژوهش تعداد ۱۵ نمونه کاهو از بازارهای محلی مختلف جمع آوری و جهت شناسایی حضور باکتریوفاژهای Male specific($F^+$)RNA بر سطح نمونه های کاهو ، به وسیله دو روش مبتنی بر کشت( آزمون پلاک) و تکنیک RT-PCR آنالیز شدند. هر دو روش RT-PCR و کشت حضور باکتریوفاژها را بر سطح ۵ نمونه کاهو تایید کردند. در مقابل هیچ یک از این دو روش وجود باکتریوفاژها را در۷ نمونه شناسایی نکردند. یک نمونه در آزمون پلاک منفی در حالی در روش RT-PCR مثبت شناسایی شد. دو نمونه در آزمون پلاک مثبت و در مقابل در روش RT-PCR منفی در نظر گرفته شدند. اختلاف در نتایج ممکن است ناشی از حساسیت، اختصاصیت و یا بازدارندگی در نمونه های کاهو باشد.

**واژه های کلیدی:کاهو،** *باکتریوفاژ Male specific($F^+$)RNA، PEG precipitation، RT-PCR*

مقدمه

در گذشته، قبل از اینکه روش های مولکولی به طور رایج استفاده شوند، شناسایی ویروس های روده ای بر پایه تلقیح مناسب عصاره ماده غذایی به درون کشت های سلولی بوده است. در حالی که جداسازی و شناسایی ویروس های روده ای از طریق کشت سلول آزمایشگاهی زمان بر بوده و همچنین فاقد حساسیت و اختصاصیت کافی جهت شناسایی کامل ویروس ها می باشد، علاوه بر این برخی از ویروس های روده ای نمی توانند در کشت سلولی تکثیر شوند و تشخیص آن ها با استفاده از روش های مولکولی صورت می گیرد. (کروکی ،۲۰۰۸، دور و همکاران،۲۰۰۰).

سبزی ها از جمله سبزی های سالاد از منابع اصلی عفونت های ویروسی در کشور های مختلف می باشند. با توجه به دوره رشد نسبتا کوتاه این محصولات و مصرف خام آنها، این محصولات از لحاظ ایمنی پر خطر در نظر گرفته شده اند. در میان سبزی های سالاد، کاهو به سبب داشتن سطح پهن برگ و تماس مستقیم با کود به شدت در معرض آلودگی مدفوعی قرار می گیرد (وارد و همکاران ۱۹۸۲) .

تحقیقات کمی بر روی میوه ها و سبزی های خام به منظور بررسی حضور ویروس ها یا انگل های سطح آن ها به دلیل فقدان روش های حساس در مواد گیاهی ، صورت گرفته است. (هدبرگ و همکاران۱۹۹۴).

دابیس و همکاران (۲۰۰۲) روش ته نشینی پلی اتیلن گلایکول را به منظور شناسایی موثر ویروس های تلقیح شده HAV,PV,NLV با غلظت مشخص، از سطح سبزی های تازه و توت های منجمد بوسیله RT-PCR و کشت سلولی با اصلاحاتی شامل بهینه سازی بافر شستشو، بهبود حذف بازدارنده ها به وسیله کلروفرم/ بوتانول، افزایش زمان سانتریفوژ و انتخاب spin-column جهت ایزوله سازی RNA مورد استفاده قرار داد. درصد بازیافت RNA ویروسی بوسیله RT-PCR برای NLV,HAV , PV به ترتیب ۱۳٪ ، ۱۷٪ ، ۱۰۰-۴۵٪ حاصل شد. نتایج نشان داد، اصلاح این روش حساسیت RT-PCR را تقریبا log ۱ افزایش داده است.

شرر و همکاران (۲۰۱۰) به منظور شناسایی NV تلقیحی با غلظت مشخص، به بررسی دو روش استخراج ویروس: ته نشینی پلی اتیلن گلایکول و اولترافیلتراسیون بر روی ۲۱ ماده غذایی (کاهو،تمشک،همبرگر) مکمل با تکنیک real time RT-PCR، پرداختند. فاژ MS۲ به عنوان کنترل فرایند به منظور ارائه کارایی روش مورد آزمون به کار گرفته شد. میانگین بازیافت روش PEG برای کاهو، تمشک و همبرگر به ترتیب ۲۳٪،۷٪ و ۲۴٪ و در روش اولترافیلتراسیون ۹٪ ،۷۰٪ و ۳٪ بود.

سانچز و همکاران (۲۰۱۲) روشی را به منظور افزایش سرعت بازیافت و تغلیظ MNV, HAV,NV ( جایگزین نورویروس) تلقیح شده به ترتیب با غلظت های $10^5$PCRU ۱.۳×و $10^4$ ۱.۵× $TCID_{50}$ و $10^4$ ۶.۶× $TCID_{50}$ بر سطح مصولات تازه برش خرده (جعفری،اسفناج و سبزی های سالاد) توسعه دادند. در این روش از BPW و PEG به عنوان بافر شستشو و ماده تغلیظ کننده به ترتیب استفاده شد. شناسایی کمی به وسیله روش q-PCR و کشت سلولی برای MNV، NV وHAV به ترتیب انجام شد. میانگین بازیافت از سطح جعفری، اسفناج و سالاد ۹/۲٪ ،۴۳/۵٪ و ۲۰/۷٪ به ترتیب برای HAV,MNV,NV به ازای ۱۰ گرم از محصول بود.

بر اساس نظر سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ حداقل دز لازم برای ایجاد عفونت توسط ویروس های روده ای انسان ۱۰۰- ۱ units می باشد. لذا بدلیل دز پایین عفونت زایی ویروس های روده ای و همچنین اتصال ویروس های روده ای بر سطوح غذا نقش محصولات غذایی بعنوان یک حامل در انتقال این ویروس ها دارای اهمیت می باشد (امیتی،۱۹۹۲).

دسته ای از باکتریوفاژ ها ارتباط نزدیکی با انتروویروس ها و روتا ویروس ها داشته و پایداری آنها مشابه ویروس های روده ای در آب دریا و صدف های خوراکی به اثبات رسیده است. بر مبنای آلودگی از طریق پیلی جنسی و یا دیواره سلولی میزبان،کلی فاژها می توانند به ترتیب به دو دسته کلی فاژهای Male specific F+ و سوماتیک طبقه بندی شوند .اما کلی فاژF-RNA به نام MS۲ یکی از اعضای اصلی سروتیپ نوع یک می باشد که به دلیل شباهت بسیار زیاد به ویروس های روده ای انسان به لحاظ ساختار فیزیکی، ترکیب و ریخت شناسی به صورت ویژه به عنوان شاخص یا مدل برای این ویروس ها به کار می رود و بیشترین کاربرد را در مدل سازی دارد(گرابوو و همکاران، ۱۹۹۸).

هدف از این پژوهش ، شناسایی باکتریوفاژهای Male specific $F^+$ RNA به عنوان نماینده ویروس های روده‌ای، با استفاده از تکنیک های مبتنی بر کشت و مولکولی (RT-PCR) از سطح نمونه های کاهو، می‌باشد.

## مواد و روش ها

در این پژوهش در فصل تولید کاهو (بهار و تابستان) تعداد ۱۵ نمونه کاهو از بازار محلی تهیه و در بسته های پلاستیکی استریل، با حفظ زنجیره سرما تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شدند.

### روش ته نشینی پلی اتیلن گلایکول

مراحل این روش به صورت شماتیک در شکل۱ نشان داده شده است. ۸/۷۵ گرم از نمونه کاهو وزن و به آن ۳۵ میلی لیتر از بافر شستشو TGBE(۱٪ بیف اکسترکت، گلایسین ۵۰ میلی مولار، تریس- اسیدکلریدریک ۱۰۰ میلی مولار،۹/۵ pH:) اضافه و به مدت یک ساعت بر روی شیکر با دور rpm ۲۰۰ قرار گرفت. سپس جهت حذف گل ولای و شفاف سازی بیشتر، بافر شستشو به لوله های سانتریفوژ منتقل و به مدت نیم ساعت در g ۱۰۰۰۰ در دمای C° ۴ سانتریفوژ گردید. محلول رویی( سوپرناتانت) به درون یک ظرف استریل منتقل و pH به ۷/۲±۰/۲ رسانده و به آن ۰/۲۵ حجم بافر به دست آمده محلول غلیظ ۵۰٪ PEG+NaCl اضافه و به مدت ۴ ساعت در C° ۴ یخچال گذاری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g در دمای ۴°C سانتریفوژ گردید. پس از آن محلول رویی دور ریخته و رسوب حاصل در بافر فسفات حل شده و بخشی از آن جهت شمارش فاژ در آزمون کشت دو لایه و بخشی از آن جهت استخراج RNA و انجام واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار می گیرد (روش تغییر یافته باتوت،۲۰۰۷،. دابیس،۲۰۰۲، چرر،۲۰۱۰) .

### آزمون کشت دو لایه

قبل از اجرای این روش ابتدا باید کلنی تک باکتری E.coli Famp از محیط کشت TSA۱/۵٪ آگار به درون لوله حاوی TSB ۵ cc و ۵۰µl آنتی بیوتیک (ampicillin sodium salt و streptomycin sulfate) تلقیح شده و سپس درون اینکوباتور شیکر دار C° ۳۷ به مدت ۵-۴ ساعت تا رسیدن به فاز لگاریتمی گرمخانه گذاری گردد.

دو نوع محیط کشت TSB ۱/۵٪ و ۰/۷٪ آگار برای این آزمون مورد نیاز است. برای انجام این آزمون ابتدا به ترتیب ۵۰µ l آنتی بیوتیک، µ l ۱۰۰E.coli Famp و ۵۰۰µ l از پلت محلول در بافر فسفات نهایی در هر دو روش PEG و اولتراسانتریفوژ باید به لوله حاوی ۰/۷TSA٪ آگار اضافه شده سپس با انجام عمل ورتکس، محلول حاصلبر روی سطح پلیت حاوی محیط کشت جامد ۱/۵TSB٪ پخش گردد. سپس پلیت ها به درون اینکوباتور C° ۳۷ انتقال یافته پس از بازه زمانی ۱۶-۱۴ ساعت پلاک ها قابل شمارش خواهند بود(U.S. EPA Method ۱۶۰۱,۲۰۰۱ ).

### استخراج RNA

جهت استخراج RNA باکتریوفاژ از کیت شرکت کیاژن طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد.

### Reverse Transcription(RT)

برای انجام واکنش رونویسی معکوس و تهیه cDNA از کیت فرمنتاز طبق دستورالعمل استفاده شد.

### واکنش PCR

واکنش PCR در کیت تر Master mix Red در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی باکتریوفاژ MS۲، پیشرو(۲,۷۱۷, CTGGGCAATAGTCAAA) و معکوس (۳,۰۳۱,CGTGGATCTGACATAC)

( با غلظت ۵ پیکومول) ، ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با برنامه دمایی مناسب در دستگاه ترموسایکلر(آلمان,Sensequest) انجام شد. در هر سری آزمایش یک کنترل منفی که در آن به جای cDNA آب اضافه می شد و تمام مراحل کار بر روی آن انجام می گرفت، گذاشته شد.

**مراحل انجام ژل الکتروفورز**

برای مشاهده نتایج واکنش PCR، پس از بارگذاری قطعات تکثیر یافته حاصل از PCR در ژل آگارز(۱٪) حاوی ۱٪ سایبر گرین، الکتروفورز تحت ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد.

**نتایج و بحث**

در این مطالعه از روش ته نشینی پلی اتیلن گلایکول به دلیل قابلیت تکرارپذیری و ضریب بازیافت بالاتر (باتوت،۲۰۰۷.، سوما ،۲۰۱۲.، روتجس ،۲۰۰۶) در مقایسه با سایر روش ها به منظور شستشو و تغلیظ ذرات ویروسی از سطح نمونه های کاهو استفاده شد. محلول نهایی به دست آمده از این روش جهت شناسایی حضور باکتریوفاژهای Male specific($F^+$)RNA ، به وسیله دو آزمون پلاک و تکنیک RT-PCR آنالیز شد. در بین ۱۵ نمونه کاهو، باکتریوفاژها به وسیله هر دو روش در ۳۳٪ از نمونه ها( ۵ تا از ۱۵ نمونه) شناسایی شدند در مقابل باکتریوفاژها در هیچ یک از دو روش در ۴۵٪ از نمونه ها( ۷ از ۱۵ نمونه) شناسایی نشدند. یک نمونه در آزمون پلاک منفی در حالی در روش RT-PCR مثبت شناسایی شدند. این نتیجه ممکن است قابلیت تکنیک RT-PCR را در شناسایی ذرات ویروسی غیر قابل کشت منعکس کند. دو نمونه در آزمون پلاک مثبت و در مقابل در روش RT-PCR منفی در نظر گرفته شدند که این نشان می دهد با کاهش سطح کلی فاژ در محلول، حساسیت این روش جهت شناسایی کاهش می یابد (جدول۱). این نتیجه با نتایج رز و همکاران(۱۹۹۷) همخوانی دارد. نمونه های منفی در روش RT-PCR ممکن است در اثر وجود بازدارنده ها بوده که با تغلیظ محلول نهایی غلظت آن ها افزایش یافته و منجر به نتایج منفی غلط شده است. به طور کلی هماهنگی و توافق کاملی بین نتایج دو روش مشاهده شد. اختلاف در نتایج ممکن است ناشی از حساسیت، اختصاصیت و یا بازدارندگی RT-PCR در نمونه های کاهو باشد (رز و همکاران(۱۹۹۷).

**نتیجه گیری کلی**

آلودگی باکتریوفاژی نمونه های کاهو نشان دهنده تماس آن ها با مدفوع انسانی/ حیوانی یا استفاده از کود های آلوده در طول داشت و همچنین توزیع نامناسب این محصول توسط افراد آلوده و تحت شرایط بهداشتی ضعیف می باشد. امروزه شناسایی ویروس ها در مواد غذایی به دلیل سطوح پایین آلودگی تبدیل به یک چالش شده است. در مطالعه حاضر روش RT-PCR و مبتنی بر کشت( آزمون پلاک) جهت شناسایی باکتریوفاژهای $(F^+)$RNA از سطح نمونه های کاهو، مورد مقایسه قرار گرفتند

تکنیک های مولکولی در مقایسه با روش های مبتنی بر کشت دارای مزایای زیر می باشد:

I. روش RT-PCR برای شناسایی باکتریوفاژهای $(F^+)$RNA در ۶ ساعت انجام می شود در حالی که آزمون پلاک به ۲۴ ساعت زمان و نیز رشد و بقای باکتری میزبان نیازمند است
II. تعداد زیادی از باکتریوفاژهای $(F^+)$RNA قابل کشت نیستند و توسط آزمون پلاک شناسایی نمی شوند
III. میزبان استفاده شده در آزمون پلاک علاوه بر باکتریوفاژهای $(F^+)$RNA، کلی فاژهای سوماتیک را نیز شناسایی می کند در حالی که استفاده از پرایمرهای اختصاصی در روش RT-PCR فقط باکتریوفاژهای $(F^+)$RNA را شناسایی می کند

معایب تکنیک های مولکولی نیز عبارتند از:

I. وجود بازدارنده PCR که می تواند در واکنش مداخله کند
II. با کاهش سطح کلی فاژ در محلول، حساسیت این روش جهت شناسایی کاهش می یابد

در تحقیق انجام شده هماهنگی و توافق کاملی بین نتایج دو روش مشاهده شد ولی از آن جاییکه روش RT-PCR نیازمند صرف زمان کمتر، سهولت انجام و نیز دارای قابلیت شناسایی باکتریوفاژهای غیر قابل کشت بوده، بر روش های مبتنی بر کشت ترجیح داده می شود.

**منابع**


۱. Butot, S, Putallaz, T, Sánchez, G, ۲۰۰۷, Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables, Journal of Applied and Environment Microbiology ,۷۳, ۱۸۶–۱۹۲.

۲. Dubois, E, Agier, C, Traore´, O, Hennechart, C, Merle, G, Crucie`re, C, Laveran, H, ۲۰۰۲,Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase polymerase chain reaction or cell culture, Journal of Food Protection, ۶۵(۱۲), ۱۹۶۲– ۱۹۶۹.

۳. Croci,L, Dubois,E, Cook,N, Medici,D, Rutjes,S,A, Hoorfar,J,Van der Poel,W,۲۰۰۸, Current Methods for Extraction and Concentration of Enteric Viruses from Fresh Fruit and Vegetables: Towards International Standards. Journal of Food Analytical Methods ,۱,۷۳–۸۴.

۴. Dore´,W, Wood,K,H, Lees,D, ۲۰۰۰, Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a Candidate Human Enteric Virus Indicator for Bivalve Molluscan Shellfish, Journal of Applied And Environmental Microbiology, ۱۸۳(۲):۱۵۴-۶۰.

۵. Grabow,W, Very,A,Uys, M, De Villiers,JC,۱۹۹۸,Evaluation of the application of bacteriophages as indicators of water quality, Journal of Water Research Commission, Pretoria,۵۵ pp.

۶. Hedberg ,C,W, MacDonald, K,L, Osterholm M,T, ۱۹۹۴, Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective, Journal of Clinical Infective Disease, ۱۸:۶۷۱-۶۸۲.

۷. Mbithi, J, Springthorpe, V, Boulet, J, Sattar, S, ۱۹۹۲, Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces, Journal of Clinical Microbiology , ۳۰ (۴), ۷۵۷-۷۶۳.

۸. Rutjes,S, Verschoor,F, Van Der Poel,W, Duijnhoven,Y, Husman,M,۲۰۰۶, Detection of Noroviruses in Foods: A Study on Virus Extraction Procedures in Foods Implicated in Outbreaks of Human Gastroenteritis, Journal of Food Protection, ۶۹, ۱۹۴۹–۱۹۵۶

۹. Sanchez,G,Elizaquivel,P,Aznar,R,۲۰۱۲,A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables, International journal of food microbiology ۱۵۲.۹-۱۳.

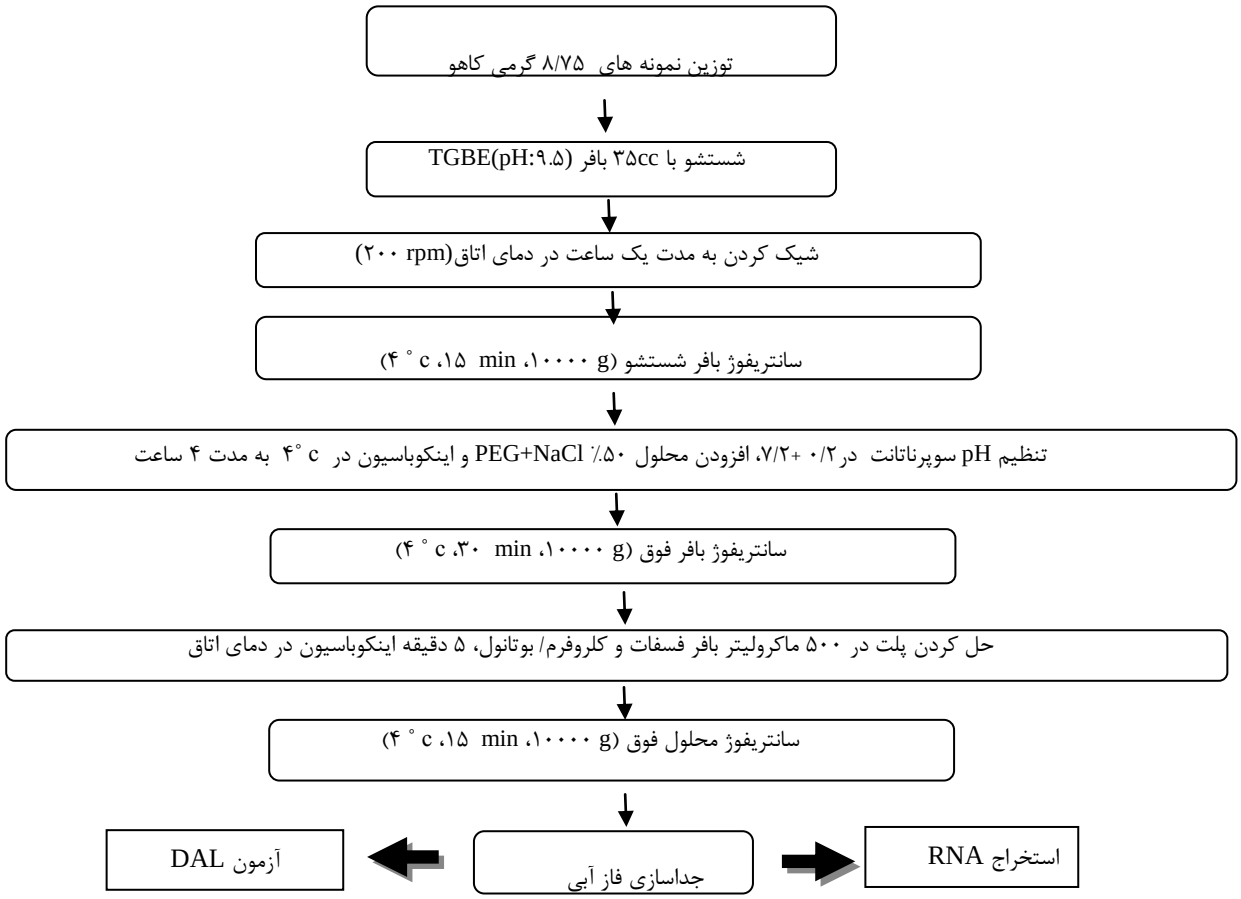
۱۰. Rose, J, Zhou, X, Griffin, D , Paul, J,۱۹۹۷, Comparison of PCR and Plaque Assay for Detection and Enumeration of Coliphage in Polluted Marine Waters, Journal of Applied and Environmental Microbiology, ۶۳( ۱۱): ۴۵۶۴–۴۵۶۶

۱۱. Scherer,K, Johneb,R, Schrader, C, Ellerbroekb,L, Schulenburgc,J, Kleina,G,۲۰۱۰, Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak, Journal of Virological Methods, ۱۶۹ : ۲۲–۲۷.

۱۲. Summa,M, Bonsdorff,C, Maunula,L,۲۰۱۲, Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries, Journal of Virological Methods, ۱۱۸۱۰ ۱–۷

۱۳. U S. EPA, Methods ۱۶۰۱, Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two- single Enrichment Procedure, Washington, DC: Office of Water, U.S, Environmental Protection Agency

۱۴. Ward, B,K, Chenoweth, C,M, Irving, L,G, ۱۹۸۲, Recovery of viruses from vegetable surfaces, Applied and Environmental Microbiology, ۴۴ (۶): ۱۳۸۹–۱۳۹۴.




**شکل۱. نمودار چگونگی انجام روش پلی اتیلن گلایکول**

**جدول۱- اختلاف نتایج در شناسایی باکتریوفاژ Male specific($F^+$)RNA به وسیله آزمون پلاک و RT-PCR**

| شماره نمونه | نتایج آزمون پلاک (pfu/۸/۷۵g) | نتایج RT-PCR |
|---|---|---|
| ۱ | ۴ | + |
| ۲ | ۳ | + |
| ۳ | ۰ | – |
| ۴ | ۰ | – |
| ۵ | ۱۰ | + |
| ۶ | ۰ | – |
| ۷ | ۵ | + |
| ۸ | ۶ | + |
| ۹ | ۰ | – |
| ۱۰ | ۰ | – |
| ۱۱ | ۶ | – |
| ۱۲ | ۰ | – |
| ۱۳ | ۰ | + |
| ۱۴ | ۰ | – |
| ۱۵ | ۲ | – |