بهینه سازی روشهای استخراج و تغلیظ ویروسهای روده ای از سطح سبزیجات آماده مصرف با استفاده از کلی فاژ MS2 به عنوان مدل

معصومه بحرینی[۱*]، محمد باقر حبیبی نجفی[۲]، محمد رضا باسامی[۳]، مسعود یاورمنش[۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

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

۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۰)

چکیده

ویروسهای روده ای از جمله عوامل مهم بیماریزا هستند که از طریق مواد غذایی انتقال می یابند. متاسفانه روشهای مناسبی برای نمونه برداری و بررسی ویروسها در مواد غذایی وجود ندارد. در نتیجه شناخت عوامل بیماریزای ویروسی در اپیدمیهای ایجاد شده توسط مواد غذایی با روشهای معمول بندرت انجام میشود. در این پژوهش، از کلی فاژ MS2 بعنوان یک مدل برای مطالعه روشهای استخراج و تغلیظ انترو ویروسها از سطح ماده غذایی استفاده شد. روش شستشو و استخراج کلی فاژ از سطح سبزیجات با استفاده از بافرهای مختلف شستشو بررسی گردید. از بین ده بافر استفاده شده، چهار بافر (گلایسین ۰/۰۵ مولار و کلرید سدیم ۱۵۰ میلی مولار با pH ۹/۵، گلایسین ۰/۰۵ مولار و بیف اکسترکت ۱٪ با pH ۹/۵ و بیف اکسترکت ۳٪ با دو pH ۷/۵ و ۹/۵) دارای بیشترین میزان بازیافت در مرحله استخراج بودند (به ترتیب ۸۲٪، ۸۸٪، ۹۲٪ و ۸۲٪). بعلاوه ضریب تغلیظ کلی فاژ با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (۸۰۰۰) ۱۰٪ و نمک کلرید سدیم ۰/۳ مولار نیز ارزیابی گردید. میزان تغلیظ کلی فاژ بالای ۸۰٪ بود و مشخص گردید نوع بافر تاثیری بر روی میزان بازیافت ویروس در مرحله تغلیظ ندارد. بر طبق نتایج بدست آمده زمان ماندگاری ویروس در محلول پلی اتیلن گلیگول اهمیت زیادی در میزان تغلیظ داشت. بیشترین میزان تغلیظ با یک شب ماندگاری در $4^{o}C$ بدست آمد.

کلید واژگان: ویروسهای روده ای، کلی فاژ MS2 ، سبزیجات آماده مصرف، روشهای شستشو.

* مسئول مکاتبات: mbahreini@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

۱- مقدمه

امروزه آلودگی مواد غذایی با ویروسها، بعنوان یکی از آلودگی های مهم که جان انسان را تهدید می کند، مطرح است. در بیشتر مواقع، آلودگی مواد غذایی با ویروسها قابل تشخیص نمی باشد، که این یا به خاطر فقدان یک روش تشخیصی مناسب می باشد و یا غیر قابل تشخیص بودن میزان آلودگی در مواد غذایی با روشهای متداول است.

بیشتر ویروسهای آلوده کننده مواد غذایی از راه مدفوعی- دهانی انتقال میابند. دستهای آلوده کارگران و آب آلوده مورد استفاده در کشاورزی از منابع عمده آلوده کننده مواد غذایی میباشند[۲،۱]. ویروسهای روده ای و هپاتیک که از این طریق به انسان منتقل میشوند ، قادرند برای مدت طولانی در محیط باقی بمانند و نتایج تحقیقات نشان داده است که نسبت به عوامل ضدعفونی کننده، حرارت، فشار و دما به مقدار زیادی مقاوم هستند[۳]. با وجود اینکه ویروسها انگلهای درون سلولی اجباری هستند و نمی توانند در مواد غذایی تکثیر یابند و تعداد آنها در ماده غذایی کم میباشد، اما این دلایل نمی تواند باعث اطمینان از ایمنی ماده غذایی باشد، زیرا تنها تعداد کمی از آن ذرات آلوده کننده ویروسی برای ایجاد بیماری کافی میباشد [۱].

گزارشات متعددی وجود دارد که نشان میدهد محصولات غذایی مختلف مثل سبزیجات، میوه ها، صدفهای خوراکی، آب و غذاهای فرایند شده آلوده به ویروسها هستند [۴-۶] و باعث همه گیری میشوند. عامل اتیولوژیک بیشتر این بیماریهای اپیدمیک ویروسهای روده ای گزارش شده اند که غالباً شامل نورووویروس ها[1] و ویروس هپاتیت A[2] [۷] میباشد.

گزارش شده است سبزیجات که شامل انواع سالادها و سبزی خوردن می شود عامل بعضی از اپیدمیهای هپاتیت[3] و ناراحتیهای معدی روده ای[4] بوده اند. در چند سال اخیر چندین اپیدمی از نورووویروس و ویروس هپاتیت A گزارش شده است که در اثر مصرف سبزیجات (توت فرنگی و پیازچه) بوجود آمده است [۶-۹].

بعضی از ویروسهای روده ای انسانی که عامل ناراحتیهای معدی روده ای و هپاتیت هستند توسط تکنیکهای قدیمی مثل کشت سلول قابل کشت نیستند و بیشتر از روشهای مولکولی برای تشخیص آنها استفاده میشود [۱۰-۱۴].

جهت استفاده از روشهای مولکولی برای تشخیص ویروسها در سطح مواد غذایی نیاز است که ابتدا آنها را از سطح ماده غذایی استخراج و تغلیظ نمود و سپس شناسایی مولکولی را بر روی آنها انجام داد و چون کار با آنها مشکل می باشد از ویروسهای مدل برای بهینه سازی روشهای استخراج و تغلیظ استفاده می شود [۱۵-۱۷].

کلی فاژهای جنسی RNA دار (F-RNAbacteriophage) گروهی از ویروسهای RNAدار، تک رشته ای با کپسید مکعبی ساده به قطر ۲۷-۲۴ نانومتر هستند[۱۸]. خواص فیزیکی و ژنومیکی این فاژها مشابه خواص نورووویروس ها و ویروس هپاتیت A میباشد. فراوانی این فاژها در فاضلاب و سادگی کار با آنها ، باعث شده است این فاژها به عنوان شاخص مناسبی برای آلودگی محیط و مواد غذایی به کار گرفته شوند [۱۵،۱۹].

از طرف دیگر به خاطر سادگی روشهای کشت و تشابه زیاد آنها به ویروسهای روده ای، از آنها به عنوان یک مدل مناسب برای تحقیقات در مواد غذایی استفاده کرده اند و مشخص شده است رفتار این فاژها کاملاً شبیه انترو ویروسها می باشد [۲۰]. بطور کلی از این فاژها میتوان برای پیشگویی حضور انتریک ویروسها در مواد غذایی و بررسی اثر عوامل محیطی بر روی آنها استفاده کرد.

هدف از این تحقیق بهینه سازی روشهای شستشو و تخلیص ویروس های روده ای از سطح سبزیجات بسته بندی آماده مصرف و سپس تغلیظ آنها با استفاده از کلی فاژ MS2 بعنوان ویروس مدل بود.

1. Noro-Like Virus
2. Hepatitis A Virus
3. Hepatitis
4. Gastroenteritis

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

۲- مواد وروشها

۲-۱- آماده سازی و کشت کلی فاژMS2 و باکتری میزبان

کلی فاژ MS2 (ATCC 5597-B1) و باکتری میزبان، اشرشیا کلی Famp (ATCC 700891)، طبق روش استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده امریکا (USEPA) به ترتیب زیرآماده شد[۲۲،۲۱].

۲-۱-۱- آماده سازی باکتری میزبان

ابتدا باکتری لیوفیلیزه بر روی محیط کشت TSB[5] حاوی آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و استرپتومایسین در دمای ۳۷°C احیا شد و سپس به صورت خطی بر روی محیط کشت TSA[6] حاوی آنتی بیوتیک کشت و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از رشد یک کلنی از محیط کشت برداشته و به محیط کشت TSB حاوی آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و استرپتومایسین تلقیح و تا رسیدن به جذب نوری بین ۰/۱-۰/۵ در طول موج ۶۰۰ nm در دمای ۳۷°C قرار داده شد.

۲-۱-۲- آماده سازی کلی فاژ MS2

جهت تهیه کلی فاژ MS2، ابتدا محیط کشت TSA دارای ۰/۷۵٪ آگار تهیه و پس از سرد شدن تا دمای ۴۵°C به آن از ذخیره آنتی بیوتیک استرپتومایسین وآمپی سیلین به مقدار ۰/۱۵ گرم در لیتر اضافه شد و پس از همزدن مناسب، ۲۰۰ µl از باکتری اشرشیا کلی Famp در فاز لگاریتمی به آن اضافه و در پتری استریل پخش گردید. بعد از جامد شدن محیط کشت مقدار ۱۰ µl از نمونه کلی فاژ را یه صورت لکه گذاری روی محیط کشت در چند نقطه قرار داده و بعد از جذب در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری گردید.

بعد از ۲۴ ساعت در محل لکه ها، پلاک های بزرگ حاوی کلی فاژ MS2 تشکیل شد. برای استخراج کلی فاژ MS2 از روی پلیت، ۱۰ ml بافر فسفات نمکی به آن اضافه شد و به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد، سپس محلول رویی جمع آوری و از فیلتر ۰/۲۲ µl عبور داده و در لوله استریل جمع آوری گردید و برای استفاده طولانی مدت (به عنوان ذخیره) به آن آنتی بیوتیکهای استرپتومایسین، آمپی سیلین و نالیدیکسیک اسید(۰/۱۵ گرم در لیتر) اضافه شد.

۲-۱-۳- شمارش کلی فاژ MS2

پس از آماده سازی کشت خالص حاوی کلی فاژ MS2، به منظور تعین تعداد دقیق کلی فاژ برحسب پلاک در هرمیلی لیتر (pfu/ml)، حداقل از چهار رقت متوالی استفاده شد. جهت رقیق کردن کشت خالص از محیط کشت TSB فاقد آنتی بیوتیک و برای شمارش پلاکها از روش کشت دو لایه[7] استفاده شد.

۲-۱-۴- روش کشت دولایه

در یک لوله آزمایش که حاوی ۵ میلی لیتر محیط تریپتیکاز سوی براث با ۰/۷٪ آگار ذوب شده که دمای آن ۴۵°C بود، ۵۰ µl از ذخیره آنتی بیوتیک استرپتومایسین-پنی سیلین اضافه و سپس ۱۰۰ µl از باکتری که در فاز لگاریتمی بود و ۵۰۰ µl از نمونه فاژ اضافه و لوله در کف دست چرخانده شد تا کاملاً مخلوط گردد. پس از آن نمونه را بر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار که دارای ۱/۵٪ آگار بود و قبلا به آن از آنتی بیوتیک ذخیره استرپتومایسین-پنی سیلین اضافه شده بود، به صورت یک لایه بر روی آن ریخته شد و به آرامی در سطح پتری پخش گردید و در گرمخانه در دمای ۳۷°C قرار داده شد.

۲-۲- آماده سازی سبزیجات

کاهو، جعفری و ریحان، سبزیهای انتخابی برای کار بودند که از فروشگاه های محلی تهیه گردید. نمونه سبزی ابتدا چند بار با آب شیر شسته و توسط هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شد. سپس با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزدایی و مجددا دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد و در زیر هود لامینار در شرایط استریل به مدت ۳-۴ ساعت قرار گرفت تا کاملا خشک شود و در ظرف استریل تا موقع کار نگه داری شد [۸،۶]. Double agar layer procedure

5. Tryptic soy broth
6. Tryptic soy agar
7. Double agar layer procedure

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

۲-۳- روش شستشوی کلی فاژ از سطح سبزی

ده بافر مختلف برای شستشوی کلی فاژ از سطح سبزی استفاده شد که عبارت بودند از: ۱- گلایسین۰/۰۵ مولار (Merk, Co.) با pH ۹/۵، ۲- گلایسین۰/۰۵ مولار، تریس(شرکت، سیناژن)۱۰۰ میلی مولار، بیف اکسترکت ۱٪ (Himedia, Co.) با pH ۹/۵، ۳- گلایسین ۰/۰۵ مولار، تریس ۱۰۰ میلی مولار با pH ۹/۵، ۴- گلایسین ۰/۰۵ مولار ، بیف اکسترکت ۱٪ با pH ۹/۵، ۵- گلایسین ۰/۰۵ مولار، کلرید سدیم ۱۵۰ میلی مولار(Merk, Co.) با pH ۹/۵، ۶- بیف اکسترکت ۳٪ با دو pH ۹/۵ و ۷/۵، ۷- بافر فسفات نمکی با دو pH ۹/۵ و ۷/۵، ۸- آب با pH ۷/۸.

۲۵ گرم نمونه سبزی ضدعفونی شده در شرایط استریل وزن و در داخل کیسه استوماکر فیلتردار (Interscience.fr) گذاشته شد سپس بر روی سطح سبزی در ده نقطه بصورت لکه گذاری ۱۰۰ µl از محلول حاوی کلی فاژ MS2 دارای 10^5 pfu/ml فاژ تلقیح شد و کیسه با درب باز به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود لامینار قرار داده شد تا کاملاً لکه های فاژ خشک شود، پس از اضافه کردن ۲۲۵ ml بافر شستشو درب کیسه بسته شد و به مدت یک ساعت همراه با تکان های مقطعی در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از اتمام زمان، بافر موجود در کیسه استوماکر به یک ظرف استریل منتقل و بعد از تنظیم pH بافر در حد خنثی، تعداد کلی فاژهای بازیافت شده با روش دولایه سنجش شد. هر آزمایش حداقل در سه تکرار انجام شد [۱،۲،۸،۱۲].

در هر سری آزمایش یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت گذاشته شد. کنترل منفی شامل نمونه سبزی بود که طبق روش بالا تهیه گردید و بجای تلقیح کلی فاژ، فقط از ۱۰۰ µl بافر فسفات نمکی محلول رقیق کننده فاژ استفاده شد. بعد از اتمام کار تمام نمونه ها با روش دو لایه سنجش پلاک شدند.

۲-۴- تغلیظ کلی فاژ MS2 با پلی اتیلن گلیکول

۵ گرم از نمونه سبزی ضدعفونی شده وزن و به آن ۴۵ ml از سه بافر شستشوی انتخاب شده که عبارت بودند از ۱- گلایسین ۰/۰۵ مولار، بیف اکسترکت ۱٪ با pH ۹/۵ ، ۲- گلایسین ۰/۰۵ مولار، کلرید سدیم ۱۵۰ میلی مولار با pH ۹/۵ ، ۳- بیف اکسترکت ۳٪ با pH ۷/۵ اضافه و به مدت یک ساعت بر روی شیکر با دور ۱۰۰ rpm قرار گرفت. سپس محلول به یک ظرف استریل منتقل و pH آن به ۰/۲ ±۷/۲ رسانده شد و به آن ۱۰۰ µl از کلی فاژ حاوی 10^5 pfu/ml تلقیح شد و پس از هم زدن نمونه، به آن پلی اتیلن گلیکول(۸۰۰۰) (۱۰٪ w/v) و نمک کلرید سدیم (۰/۳ M) اضافه و مجدداً خوب هم زده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. سپس در داخل شیکر با دور ۱۰۰ rpm و دمای ۴°C قرار داده شد. یک نمونه به مدت ۴ ساعت و نمونه دیگر یک شب در داخل شیکر ماند. سپس هر یک از نمونه ها بعد از اتمام زمان مورد نظر، به لوله های سانتریفوژ منتقل و به مدت نیم ساعت در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفوژ در بافر فسفات نمکی ۰/۱۵ M (pH ۹/۵) حل و با روش دو لایه تعداد فاژها سنجش شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و هر سری آزمایش شامل یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت بود [۲۳،۲۴].

۲-۵- جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها

داده های حاصل از این تحقیق در نرم افزار صفحه گستردهExcel وارد و مدیریت داده ها بر روی آن انجام شد. توصیف داده ها از جمله ترسیم نمودارها در این نرم افزار انجام شد. طرح آماری در این تحقیق از نوع کاملا تصادفی با سه تکرار بود. تجزیه و تحلیل های لازم با استفاده از نرم افزار MSTAT-C[8] و آزمون LSD در سطح آلفا برابر ۰/۰۵ انجام شد.

۳- نتایج

هدف اصلی این تحقیق ارزیابی اثر بافرهای مختلف بر شستشوی کلی فاژ MS2 و تغلیظ آن از سطح سبزیجات

8. Michigan State University version 1.42

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

آماده مصرف بود. با توجه به این فرضیه که نمونه های آلوده عمدتاً ذرات ویروسی را بر روی سطح خود حمل می کنند [۸]، با آلوده کردن مصنوعی سطح نمونه ها به کلی فاژ MS2 سعی شد حداکثر شبیه سازی به آلودگی طبیعی را بوجود آورد و سپس مراحل شستشو را مورد ارزیابی قرار داد.

میانگین بازیافت کلی فاژ MS2 تلقیح شده به سطح کاهو، جعفری و ریحان با استفاده از بافرهای مختلف در جدول ۳-۱ نشان داده شده است. سه بافر گلایسین و کلرید سدیم، گلایسین و بیف اکستراکت، و بیف اکستراکت ۳٪ در دو pH ۷/۵ و ۹/۵ در مقایسه با سایر بافرهای شستشو بیشترین میانگین بازیافت را داشتند که به ترتیب عبارت بود از ۸۲٪، ۸۸٪، ۹۲٪ و ۸۲٪.

کمترین میزان بازیافت مربوط به بافر شستشوی آب با pH معمولی بود. بافر فسفات نیز در دو pH خنثی و قلیایی بررسی شد و مشخص شد درصد بازیافت در pH قلیایی بیشتر است.

نتایج نشان داد ترکیب بافر در میزان بازیافت کلی فاژ MS2 موثر است و بافر حاوی ماده بیف اکستراکت اثر بهتری بر روی جداسازی ویروس از سطح ماده غذایی دارد. بافر گلایسین و کلریدسدیم، بیشترین بازیافت را بعد از بافرهای بیف اکستراکت ۳٪ و گلایسین و بیف اکستراکت نشان داد.

نوع سبزی نیز در میزان بازیافت موثر بود، طبق نتایج بدست آمده میزان بازیافت کلی فاژ MS2 از سطح دو سبزی جعفری و کاهو بهتر از ریحان بود.

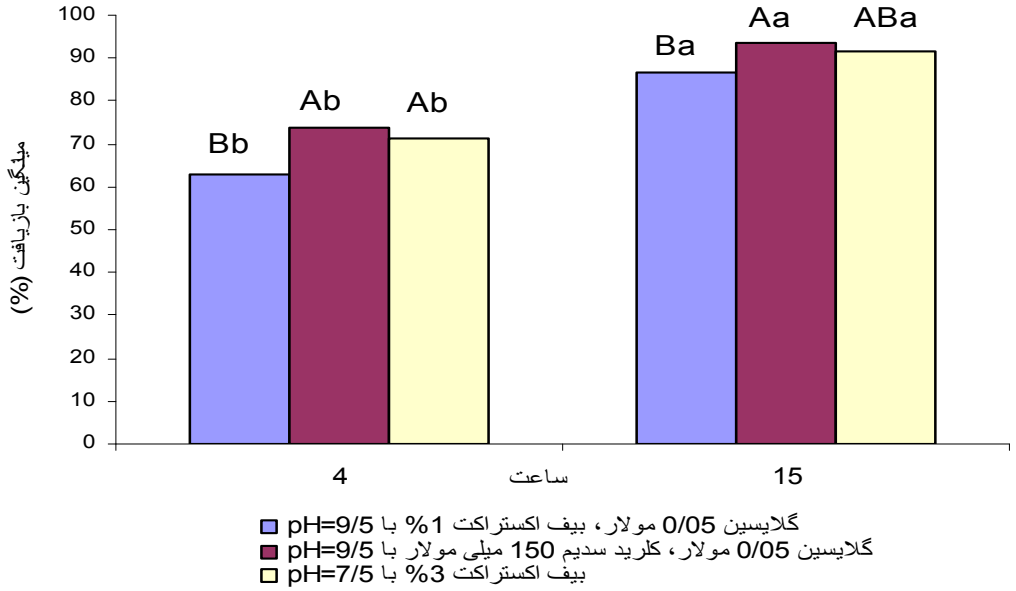
جهت تغلیظ کلی فاژ MS2 از ماده پلی اتیلن گلیکول استفاده شد و اثر بافرهای مختلف بر روی میزان بازیافت کلی فاژ در مرحله تغلیظ بررسی گردید (جدول ۳-۲). بافرهای بیف اکستراکت ۳٪ و گلایسین و کلرید سدیم بهتر از بافر گلایسین و بیف اکستراکت ۱٪ کلی فاژهای تلقیح شده را رسوب دادند. بین بافرهای بیف اکستراکت ۳٪ و گلایسین و کلرید سدیم اختلاف معنی داری مشاهده نشد ولی بافر گلایسین و بیف اکستراکت ۱٪ با دو بافر دیگر اختلاف معنی داری نشان داد (شکل ۳-۱). همچنین مشخص شد زمان ماندگاری کلی فاژ MS2 در محیط حاوی پلی اتیلن گلیکول اهمیت دارد و یک شب نگهداری در این شرایط نسبت به ۴ ساعت ماندگاری بهتر است و باعث تغلیظ بهتر ویروس می شود.

۴- بحث

امروزه ویروس های روده ای که از طریق مواد غذایی بخصوص مواد غذایی تازه که فرایند نشده و یا حداقل فرایند بر روی آنها انجام شده است، انتقال می یابند اهمیت پیدا کرده است و تحقیقات زیادی در جهت تشخیص آنها در مواد غذایی انجام گرفته است. شناسایی و تشخیص ویروس های روده ای در سطح مواد غذایی مشکل است و با روش های معمول که برای شناسایی باکتری ها استفاده می شود نمی توان آنها را تشخیص داد. برای درک حضور ویروس ها در مواد غذایی ابتدا لازم است که روش های مناسبی را برای بازیافت آنها از سطح محصولات غذایی تعیین و بکار برد. در مطالعه حاضر جهت شناسایی ویروس های روده ای در سطح محصولات تازه، ابتدا سعی شد یک روش مناسب برای جداسازی ویروس ها از سطح سبزیجات طراحی شود که شامل شستشوی ویروس از سطح ماده غذایی و سپس تغلیظ آن توسط روش پلی اتیلن گلیکول با استفاده از کلی فاژ MS2 بعنوان ویروس مدل بود.

در این مطالعه از کلی فاژ MS2 به عنوان ویروس مدل جهت تایید روش استفاده شد. در بسیاری از کارهای تحقیقاتی، کلی فاژ MS2 به عنوان جانشین و مدل برای ویروس های روده ای استفاده شده است [۲۶،۲۵]، چون براحتی در آزمایشگاه قابل کشت است و روش های استاندارد برای کشت آن در دسترس می باشد [۲۰،۲۱]. بسیاری از محققین از این کلی فاژ بعنوان مدل در کارهای خود استفاده کرده اند. Dawson و همکاران [۲۷] از کلی فاژ MS2 به عنوان مدل در ماندگاری نوروویروس بر روی میوه ها و سبزیجات استفاده کردند. Yavarmanesh و همکاران [۱۵] از کلی فاژ MS2 برای بررسی اثر ترکیبات شیر خام بر روی استخراج RNA ویروسی استفاده نمودند. Dubois و همکاران [۱۹] نیز با استفاده از این کلی فاژ، روش های تغلیظ ویروس ها را از سطح سبزیجات بررسی کردند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]



شکل ۱ تاثیر زمان نگهداری در محلول پلی اتیلن گلیکول بر روی میزان تغلیظ کلی فاژMS2

جدول ۱ در صد میانگین استخراج کلی فاژ MS2 از سطح سبزیجات در بافرهای مختلف شستشو

نوع بافر(pH)	در صد میانگین استخراج		
	جعفری	ریحان	کاهو
گلایسین+بیف اکستراکت+تریس(۹/۵)	۷۷/۳	۴۷	۷۳/۶
گلایسین+تریس (۹/۵)	۳۰	۵۳/۹	۳۵/۲
گلایسین+بیف اکستراکت(۹/۵)	۷۹/۵	۱۱۱/۵	۷۳/۴
گلایسین+ NaOH(۹/۵)	۸۹/۶	۶۰/۱	۹۶
گلایسین (۹/۵)	۱۷/۴	۷۹/۴	۳۲
بیف اکستراکت(۹/۵)	۱۱۴/۵	۵۵	۷۷/۴
بیف اکستراکت(۷/۵)	۷۷/۳	۸۵	۹۷/۳
بافر فسفات نمکی(۹/۵)	۷۵/۹	۵۵	۷۰
بافر فسفات نمکی(۷/۴)	۵۰/۹	۴۷/۵	۶۱
آب(۷/۸)	۱۲/۹	۲۱	۲۰

جدول ۲ در صد میانگین بازیافت کلی فاژMS2 در مرحله تغلیظ با پلی اتیلن گلیکول در بافرهای مختلف شستشو

نوع بافر	تعداد اولیه کلی فاژ(cfu/ml)	تعداد نهایی کلی فاژ (cfu/ml)	در صد بازیافت
گلایسین+بیف اکستراکت	۴۴۱	۳۶۰-۴۰۰	۸۲-۹۱
گلایسین+ NaOH	۳۸۴	۳۲۰-۴۰۰	۸۳-۱۰۴
بیف اکستراکت۳٪	۷۵۰	۶۰۰-۷۷۲/۵	۸۰-۱۰۳

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

سایر محققین نیز از آن به عنوان یک شاخص آلودگی ویروسی با فاضلاب بر روی محصولاتی مثل گوشت و مرغ استفاده کردند. استفاده از کلی فاژ MS2 و دیگر ویروس های کنترلی باعث ساده شدن مقایسه روش های بین آزمایشگاهی شده است [۱۹،۱۸،۱۶] .

ویروس ها با کمک پروتئینهای سطحی خود که دارای بار منفی هستند می توانند به سطوح مختلف منجمله مواد غذایی اتصال یابند. برای جدا کردن این ذرات ویروسی از سطوح مختلف می توان از تغییر بار الکتریکی سطح آنها استفاده کرد [۱۹]. با تغیر pH محیط از خنثی به قلیایی بار منفی سطح آنها به بار مثبت تبدیل می شود و باعث جدا شدن آنها از سطح می شود. در این تحقیق برای بهینه کردن جداسازی ویروس ها از سطح ماده غذایی از تکنیک تغیر pH استفاده شد. برای این منظور از ده بافر مختلف با pH های خنثی و قلیایی برای شستشوی کلی فاژ از سطح سبزی استفاده شد و مشخص گردید که pH قلیایی باعث شستشو و تخلیص بهتر کلی فاژها از سطح سبزی می شود. Butot و همکاران [۸] نیز نشان دادند pH محلول شستشو اثر زیادی بر رها سازی ویروس از سطح ماده غذایی دارد و pH قلیایی برای رها سازی نورووویروس و ویروس هپاتیت A از سطح سبزیجات مناسبتر است.

علاوه بر pH، نوع بافر نیز در میزان جداسازی و تخلیص ویروس از سطح ماده غذایی تاثیر دارد. از بین بافرهای مورد بررسی در پژوهش حاضر، بافر بیف اکستراکت ۳٪ بهتر از بافرهای دیگر توانست ویروس را از سطح سبزی جدا کند و بیش از ۹۰٪ کلی فاژها تخلیص شدند. سایر بافرهای دیگر هم که حاوی بیف اکستراکت بودند درصد بازیافت بهتری نسبت به بقیه داشتند. دیگران نیز نشان دادند بافر بیف اکستراکت ۳٪ بهترین بافر شستشو است [۸،۲۳،۲۸].

با این حال مشخص شده است که این ماده در کارهای مولکولی بعنوان یک عامل بازدارنده عمل می کند و در نتیجه نمی تواند ماده مناسبی برای جداسازی ویروس از سطح ماده غذایی باشد [۲۹،۸]، به همین دلیل در ادامه کار از بافر گلایسین و کلرید سدیم که بازیافت بهتری نسبت به بقیه داشت استفاده شد.

بعد از جدا سازی ویروس از سطح ماده غذایی باید حجم بافر حاوی ویروس را کاهش داد تا برای کارهای مولکولی مناسب باشد. چندین روش برای تغلیظ ویروس ها وجود دارد که میتوان از روش های ایمونولوژیکی، فیلتراسیون، اولتراسانتریفوژ و ترسیب با پلی اتیلن گلیکول نام برد. از روش های ایمونولوژیکی برای تشخیص ویروس ها در مواد غذایی استفاده شده است [۶،۳۰]، اما این روش بخاطر مشکلاتی که در تهیه آنتی بادی و تغییرات آنتی ژنیک سطح بعضی از ویروس ها وجود دارد، روش مناسبی برای تمام ویروس ها نمی تواند باشد. روش اولتراسانتریفوژ در مقایسه با سایر روشها مناسبتر می باشد و به وقت کمتری نیاز دارد ولی بعلت گران بودن روش، استفاده از آن محدود می باشد [۳۱،۱۲،۸]. در فیلتراسیون نیز حجم محلول بازیافت شده زیاد است و باید یک مرحله دیگر تغلیظ را اضافه نمود [۳۲]. بنابراین ترسیب با پلی اتیلن گلیکول روش بهتری نسبت به روش های دیگر می باشد که برای هر ماده غذایی می تواند مناسب باشد و در تمام آزمایشگاهها کاربرد دارد [۳۱]. در تحقیق حاضر از روش ترسیب و تغلیظ با پلی اتیلن گلیکول (۸۰۰۰) استفاده شد. برای بهینه سازی روش تغلیظ ابتدا تاثیر ترکیب بافر بر روی میزان بازیافت کلی فاژ در این مرحله بررسی شد و نتایج نشان داد که نوع ترکیب بافر تاثیری بر روی تغلیظ ویروس ندارد و در هر سه نوع بافر میزان بازیافت بیش از ۸۰٪ بود.

زمان رسوب دهی با پلی اتیلن گلیکول فاکتور دیگری است که در میزان بازیافت ویروس تاثیر دارد. در بررسی انجام شده مشخص شد که ماندگاری یک شب کلی فاژ در محلول پلی اتیلن گلیکول بهتر از ۴ ساعت ماندگاری است و درصد ویروس های بازیافت شده بیشتر می شود. سایرین نتایج متفاوتی را برای زمان ماند نمونه در محلول پلی اتیلن گلیکول گزارش کرده اند. Schowab و همکاران [۲۴] تفاوت معنی داری را در ضریب بازیافت ویروس های هپاتیت A و پولیوویروس در محلول گلایسین و بیف اکستراکت که حاوی ۱۳٪ پلی اتیلن گلیکول و ۰/۲ مولار نمک کلرید سدیم بود بعد از ۲ و ۱۵ ساعت پیدا نکردند. Atmar و همکاران [۱۰] نیز

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

نشان دادند که یک زمان ماند ۲ ساعته در محلول ۸٪ پلی اتیلن گلیکول برای بازیافت ویروس هپاتیت A از نمونه صدف خوراکی کافی می باشد، اما Jones و Jones [۳۴] گزارش کردند که زمان ماند کلی فاژ MS2 در محلول پلی اتیلن گلیکول بر میزان بازیافت ویروس تاثیر دارد و بعد از ۱۵ ساعت یا همان یک شب نگهداری در محلول پلی اتیلن گلیکول باعث افزایش بهتر ضریب بازیافت می شود. این نتایج متفاوت شاید ناشی از نوع ویروس، ترکیب و ساختار محیط و در صد پلی اتیلن گلیکول باشد که بر روی زمان مورد نیاز برای ترسیب ویروس تاثیر می گذارد. این نتایج متفاوت پیشنهاد می کند که تاثیر شرایط مختلف بر روی میزان تغلیظ ویروس با پلی اتیلن گلیکول بررسی و با دقت بیشتری ارزیابی گردد.

۵- منابع

[1] Sair, A.L., D'Souza, D. H., Jaykus, L. A. 2002. Human enteric viruses as causes of food borne disease. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 1:73-89.

[۲] Metcalf, T.G., Melnick, J. L., Estes, M. K. 1995. Enviromental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology- a trip of over 50 years. Anna. Rev. Microbiol. 49: 461-487.

[3] Koopmans, M., Von Bonsdorff, G. H., Vinje, J., Medici, D. Monroe, S. 2002. Food borne viruses. FEMS Microbiology Reviews. 26:187-205.

[4] Hsu, F. C., Shieh, Y. C., Sobsey, M. D. 2002. Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. J. Food Prot. 65:93-99.

[5] Koopmans, M. and Duizer, E. 2004. Food borne viruses: an emerging problem. Int. J. Food Microbiol. 90:23-41.

[6] Bidawid, S., Farber, J. M., Sattar, S. A., 2000. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. J. of Viroogical Methods . 88:175-185.

[7] Le Guyader, F. S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L. 2004. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. Intr. J. of Food Microbiol. 97:179-186.

[8] Butot, S., Putallaz, T., Sanchez, G. 2007. Proceduer for Rapid oncentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. Appl. Environ. Microbiol. 73(1):186-192.

[9] Wheeler, C., Vogt, T. M., Armstrong, G. L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainan, O. V., Dato, V., Xia, G., Waller, K., Amon, J., Lee, T. M., Highbaugh-battle, A., Hembree, C., Evenson, S., Ruta, M. A., Williams, I. T., Fiore, A. E., Bell, B. P. 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. N. Engl. J. Med. 353: 890-897.

[10] Atmar, R. L., Metcalf, T. G., Neill, F. H., Estes, M. K. 1993. Detection of enteric viruse in oysters by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59:631-635.

[11] Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J. 2008. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. Intr. J. of Food Microbiol. 123:101-108.

[12] Fumian, T. M., leite, J. P. G., Marin, V. A., Miagostovich, M. P. 2009. A rapid procedure for detecting from cheese and fresh lettuce. J. of Virologicol Methods. 155:39-43.

[13] Morales-Rayas, R., Wolffs, P.F. G., Griffiths, M. W. 2010. Simultaneous separation and detection of hepatitis A and norovirus in produce. Intr. J. of Food Microbiol. 139:48-55.

[14] Kingsley, D. H., and Richards, G. P. 2001. Rapid and efficient method for reverse transcription-PCR detection of Hepatitis A and Norwalk-Like viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 67(9):4152-4157.

[15] yavarmanesh, M., Mortazavi, A., Habibi Najafi, M.B., Abbaszadegan, M. 2010. Modelling of extraction, purification and identification of enteric viruses in raw milk (Ph.D dissertation). Ferdowsi university of Mashhad. Faculty of agriculture.

[16] Black, E. P., Cascarino, J., Guan, D., Kniel, K. E., Hicks, D. T., Pivarnik, L. F., Hoover, D. G. 2010. Coliphage as pressure surrogates for enteric viruses in

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

foods. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 11:239-244.

[17] Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osbourne, J., Jaykus, L., & Vinje, J. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. Journal of Food Protection, 69: 2761−2765.

[18] Dore, W. J., Henshilwood, K., Lees, D. N. 2000. Evaluation of F-Specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66(4):1280-1285.

[19] Dubois, E., Hennechart, C., Deboosere, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., Le Calve, M., Lombard, B., Ferre, V., Traore, O. 2006. Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. Intr. J. of Food Microbiol. 108:164-171.

[20] Havelaar,A.H., Van Olphen ,M.and Drost ,Y.C.1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh water.Appl. Environ .Microbiol.59:2956-2962.

[21] Environmental Protection Agency. 2001. Male –specific (F^+) and somatic coliphage in water by two step enrichment procedure .Method 1601. Office of Water, Washinggton, D.C.20460.

[22] Environmental Protection Agency. 2001. Male –specific (F^+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure .Method 1602. Office of Water, Washinggton, D.C.20460.

[23] Kim, H. , Kwak, I., Hwang, I., Ko, G. 2008. Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. J. of Virological Methods. 153:104-110.

[24] Schwab, K. I., Neill, F. H., Fankhauser, R. L., Daniels, N. A., Monroe, S. S., Bergmire-Sweat, D. A., Estes, nM. K.m, Atmar, R. L. 2000. Development of methods to detect “norowalk-like viruses” (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. Appl. Environ. Microbiol. 66:213-218.

[25] Grabow, W. 2001 .Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Water SA. 27:251-268.

[26] Havelaar, A. H., Pot-Hogeboom, W. M. 1988. F-specific RNA–bacteriophages as model viruses in water hygiene: Ecological aspects. Water Sci .Technol. 20:399-407.

[27] Dawson, D. J., Paish, A., Staffel, L. M., Seymour, I. J., Appleton, H. 2005. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. J. Appl. Microbiol. 98:203-209.

[28] Love, D. C., Casteel, M. J., Meschke, J. S., Sobsey, M. D. 2008. Methods for recovery of hepatitis A virus (HAV) and other viruses from processed foods and detection of HAV by nested RT-PCR and TaqMan RT-PCR. Intr. J. of Food Microbiol. 126:221-226.

[29] Abbaszadegan , M., stewart, M., Stewart , p.and Lechevallier, M. 1998. A strategy for detection of viruses in ground water by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65(2):444-449.

[30] Cobayashi, S., Natori, K., Takeda, N., Sakae, K. 2004. Immunomagnetic capture RT:PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. Microbiol. Immunol. 48:201-204.

[31] Rutjes, S. A., Lodder-Verchoor, F., Poel, W. H. van der , Duijnhoven, Y. T. van, Husmani, A. M. 2006. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. J. Food Prot. 69:1949-1956.

[32] Dubois, E., Agier, C., Traore, O., Hennechart, C., Merle, G., Cruciere, C., Laveran, H. 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. J. of Food Prot. 65:1962-1969.

[33] Lewis, G. D., Hough, A., Green, D. H., Hay, J. E., Ferguson, L. R. 1996. Modification of the polyethylene glycol 6000 percipitation method for recovering human and indicator viruses from oysters and mussels. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 30:443-447.

[34] Jones, T. H. and Johns, M. W. 2009. Improved detection of F-specific RNA coliphages in fecal material by extraction and polyethylene glycol precipitation. Appl. Environ. Microbiol. 75(19):6142-6146.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]

Optimization of extraction and concentration methods of enteric viruses from the surface of ready to Eat vegetables using MS2 coliphage as a model

Bahreini, M.[1 *], Habibi Najafi, M. B.[2]; Bassami, M. R.[3]; Yavarmanesh, M[2].

1. Department of Biology , Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Food science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Department of Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding author: E-mail address: mbahreini@um.ac.ir

(Received: 89/10/23 Accepted: 90/9/20)

Enteric viruses are among those pathogens which are responsible for a significant portion of food-borne diseases. Unfortunately, robust, quantitative methods for sampling and analysis of viruses in foods are not well-established. As a result, epidemiologically determined etiologies or pathogen sources in food-borne outbreaks are rarely confirmed by routine virological analysis. In this study, MS2 coliphage was used as a model for enteric viruses. In addition, elution method of virus from the surface of vegetables by different buffers was investigated. Among ten buffers used for elution of the coliphage, four buffers (0.05 M glycin and 150mM NaCl, pH 9.5; 0.05 M glycin and 1%(w/v)beef extract, 3%(w/v)beef extract in pH 9.5 or 7.5) showed the highest coliphage recovery (82%, 88%, 92% and 82% respectively). Furthermore, the coliphage concentration index using polyethylene glycol [10%(w/v)] and NaCl (0.3M) was also evaluated. Up to 80% of the inculated of coliphages were recovered and confirmed that type of buffer had no effect on the concentration index. According to our results, incubation time in solution of polyethylene glycol was an important factor in concentration index. The highest index of concentration was detected in overnight incubation at 4°C.

Key words: Enteric viruses, MS2 coliphage, Ready-to-eat vegetables, Elution methods.

* Corresponding Author E-Mail Address: mbahreini@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-17]