امکان سنجی تشخیص ویروس هپاتیت A (HAV) درشیر با بکارگیری تکنیک الایزا (ELISA)

مسعود یاورمنش[1] ـ سید علی مرتضوی[2] ـ مهدی نصیری محلاتی[2] ـ جواد بارویی[3]

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۱۴

چکیده

عفونتهای ویروسی با منشاء غذایی امروزه به طور فزاینده ای بعنوان عوامل بیماری زا در انسان شناخته شده اند . ویروس هپاتیت A (HAV) یکی از مهمترین عوامل ایجاد بیماری می باشد، که شیوع آن می تواند توسط آب و مواد غذایی مختلف خصوصاً شیر صورت گیرد . دراین پژوهش جهت دستیابی به بهترین روش تشخیص ویروس هپاتیت A (HAV) در شیر با بکارگیری تکنیک الایزا، رقتهای مختلف آنتی ژن HAV (ml/L، ml/L ،۱۰$^{-3}$ ml/L،۱۰$^{-6}$ ml/L ،۱۰$^{-9}$) به شیر فرادما افزوده شد و پس از اعمال تیمارهای مختلف برای جداسازی ویروس (آنتی ژن)، مشخص شد که ایجاد دلمهٔ اسیدی و جداسازی آب پنیر و صاف کردن آن با کمک کاغذهای صافی واتمن و صافی های غشایی بیشترین دانسیته نوری و در نتیجه بهترین تشخیص را به همراه دارد ($P \leq ۰/۰۵$) . همچنین مشخص شد که روش مذکور فاقد حساسیت کافی در اندازه گیری کمی ویروس هپاتیت A (آنتی ژن) در شیر می باشد .

واژه های کلیدی : تشخیص،ویروس هپاتیت A (HAV) ، شیر، الایزا

مقدمه

ویروس هپاتیت A، بعنوان عامل عفونت هپاتیت A یکی از اعضاء خانوادهٔ پیکورنا[4] می باشد (۵ و ۷) . این ویروس در گروه انتروویروسها طبقه بندی شده، آن را انترو ویروس نوع ۷۲ می نامند (۱) . HAV امروزه به یک گروه (جنس) جداگانه نسبت داده می شود که به آن هپاتو ویروس[5] می گویند (۵ و ١٤) . ویروس هپاتیت A (HAV) ویروسی RNA دار بدون پوشش و کروی به قطر ۳۲- ۲۷ نانومتر است (۲) . ویریون آن از ترکیب چهار پلی پپتید به نامهای Vp_1 ، Vp_2 ، Vp_3 و Vp_4 تشکیل شده است (۵) که RNA درون آن قرار گرفته است . دانسیته شناوری آن درکلرید سزیم (CSCL) حدود ۱/۳۳ گرم در میلی لیتر می باشد (۷) .ویروس هپاتیت A با وجود تشابه با دیگر انترو ویروس ها، مقاومت بیشتری به غیر فعال سازی توسط انواع عوامل شیمیایی و فیزیکی دارد (٤ و ١٥) . بر اساس مطالعات انجام شده با توجه به محیط قرارگیری هپاتیت A (سطوح آزاد، مواد غذایی و آب) سطح مقاومت متغیر خواهد بود (۵ و ۱۱) .

غیرفعال سازی کامل HAV در دمای ۹۸°C برای مدت ۱ دقیقه امکان پذیر می باشد (۱۲) .

از نظر شرایط محیطی، مشخص شده است که بقای HAV در رطوبت نسبی پایین و کاهش دما افزایش می یابد (۱۳) . از نظر الگوی فصلی شیوع عفونت هپاتیت A با یک افزایش شدت در فصل پاییز همراه می باشد، کمترین شدت مربوط به اواسط تابستان می باشد . اما امروزه شدت بیماری تحت تأثیر الگوی فصلی قرار نمی گیرد . بطوریکه در بسیاری از کشورهای گرمسیری شدت عفونت در طول فصول بارانی بوده و در طول فصول خشک کاهش می یابد (١٦) .

HAV به صورت مشخص در مدفوع اشخاص مبتلا دیده می شود و توسط انتقال مدفوعی ـ دهانی از شخصی به شخص دیگر منتقل می شود (٦) . انتقال از دو طریق عمومی و مواد غذایی صورت می گیرد، راههای انتقال عمومی شامل :

۱- تماس و برخورد اعضاء خانواده با اشخاص عفونی،

۲- تماس جنسی با اشخاص عفونی،

---

۱ – کارشناس و دانشجوی دکترا علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد. پست الکترونیکی: masoud53y@yahoo.com

۲ –اعضاء هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳ –کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی

4– Picorna Viride

5– Hepato Virus

۳- نوزادانی که در نواحی با نرخ بالای شیوع زندگی می کنند،
٤- اشخاصی که به کشورهای با آلودگی بالا سفر می کنند (۷).

اما اصولاً انتقال از طریق مواد غذایی به سبب آغشته شدن آنها به مواد مدفوعی و آبهای آلوده و یا مواد غذایی در تماس با آبهای آلوده صورت می پذیرد (۸).

مهمترین مواد غذایی انتقال دهنده ویروس هپاتیت A، صدف ماهی، سبزی ها و میوه ها، محصولات حیوانی، شیر و فرآورده های لبنی می باشد (۹).

روشهای تعیین و شناسایی ویروسها در مواد غذایی اصولاً در موارد شیوع از ارزش بیشتری برخوردارند، چرا که اساساً این روشها گران بوده و فاقد حساسیت نسبی می باشند و همچنین زمان صرف شده برای این چنین روشهایی زیاد است (٦).

روشهای مورد استفاده در تعیین و شناسایی ویروسها در مواد غذایی شامل کشت سلول، روشهای سرم شناختی و روشهای بیولوژیکی می باشد، امروزه در اروپا برای شناسایی ویروسهای HAV و NLV[1] از روشهایی مثل میکروسکوپ الکترونی، RT-PCR[2] و ELISA[3] استفاده می شود (۱۰).

در این پژوهش توانایی کیتهای الایزا در تشخیص ویروس هپاتیت A(آنتی ژن) در شیر که یکی از راههای مهم انتقال از طریق مواد غذایی در کشور ما می باشد تحت تیمارهای مختلف بررسی گردید.

مواد و روشها

مواد اولیه : برای بازیافت ویروس(آنتی ژن)، از شیر فرادمای شرکت سهامی صنایع شیر ایران (پگاه خراسان) استفاده شد. همچنین یک ویال[4] محتوی ٤ میلی لیتر آنتی ژن خالص HAV (Clinotech, Richmond B.C. ,Canada) بر مبنای u/ml(واحد Clinotech/ ml) جهت آماده سازی رقتها به کار گرفته شد .

تجهیزات : از کیت HAV – Antigen EIA (Mediagnost. Reutlingen, Germany) جهت تشخیص ویروس استفاده شد . جهت خواندن دانسیته نوری[5] از دستگاه خوانش گرالایزا[6] با نام (Awerness stat Fax strip Reader 303,USA) استفاده شد . همچنین صافی های غشایی سرنگی با قطر منافذ ۰/۲ میکرون از شرکت (Schleicher and schuell,Germany) به کار گرفته شد .

آماده سازی رقتها : درون ۵ ظرف(ارلن) کاملاً استریل یک لیتری، شیر فرادما به میزان یک لیتر افزوده شد. سپس به هر یک از چهار ظرف، رقتهای مختلفی از آنتی ژن خالص HAV (۱ml/L ،10^{-3} ml/L ،10^{-6} ml/L ،10^{-9} ml/L) اضافه شد . یک ظرف بدون افزودن آنتی ژن HAV بعنوان شاهد منظور گردید . ظروف محتوی شیر برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴-۲ °C نگهداری شدند.

روشهای تشخیص ویروس (آنتی ژن) : پس از گذشت ٢٤ ساعت، ۵ تیمار مختلف برای تشخیص ویروس به کار گرفته شد (۸).

تیمار A (بدون فرآیند) : از شیر فرادما در رقتهای مختلف HAV (۱ml/L ،10^{-3} ml/L ،10^{-6} ml/L ،10^{-9} ml/L) بدون اعمال فرآیند جداسازی استفاده شد .

تیمار B (ایجاد دلمهٔ اسیدی) : ۱۰۰ میلی لیتر شیر انتخاب، پس از گذشت مدت زمان مشخص (٢٤-١٢ ساعت) چربی سطح شیر جدا گردید . سپس pH شیر با استفاده از اسید کلریدریک غلیظ تا pH ٤/٤ کاهش داده شد . پس از گذشت مدتی دلمه اسیدی ایجاد با استفاده از پارچه های توری نازک سه لایه و کاغذ صافی واتمن آب پنیر جدا گردید . آب پنیر بدست آمده برای انجام آزمونهای تشخیص HAV(آنتی ژن)

1- Norwalk- like Viruses
2- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
3- Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay
4- Vial
5- Optical Density
6- Reader

در داخل ویالهای شیشه ای در دمای ۴°C- منجمد گردید .

تیمار C (ایجاد دلمه اسیدی و تعدیل pH آب پنیر) : همانند تیمار B آب پنیر جدا گردید،با این تفاوت که pH آب پنیر قبل از انجماد با استفاده از سود۳ نرمال به حدود خنثی (pH =۷) افزایش یافت .

تیمار D (ایجاد دلمهٔ اسیدی و انتقال آب پنیر از صافی غشایی) : همانند تیمار B آب پنیر جدا گردید . آب پنیر اسیدی سپس از صافی های غشایی سرنگی با منافذ ۰/۲ میکرون برای حذف میکروارگانیسم ها عبور داده شد. آب پنیر بدست آمده برای انجام آزمایشات منجمد گردید .

تیمار E (ایجاد دلمهٔ اسیدی، تعدیل pH آب پنیر و انتقال آن از صافی غشایی) : همانند تیمار C عمل نموده با این تفاوت که قبل از انجماد، آب پنیر از صافی غشایی سرنگی با منافذ ۰/۲ میکرون عبور داده شد .

روش کار و محاسبات

روش انجام تکنیک EIA [1] برای تشخیص آنتی ژن HAV بر مبنای میکروتیتر پلیتهایی [2] پوشیده شده از مقدار مشخصی آنتی بادی HAV است.پس از افزودن نمونه ،آنتی ژن احتمالی با استفاده از آنتی بادی ثانویه یا کونژوگه ردیابی می شود.حساسیت کیت در حدی است که نمونه های منفی به هیچ عنوان حاوی آنتی ژن HAVنمی باشند.همچنین با کمک روش PCR ۹۱درصداز نمونه های مثبت، از نظر حضور آنتی ژن مورد تایید قرار می گیرد.میزان ضریب تغیرات(CV) [3] آزمونهای درونی [4] برای نقطه Cut-offوکنترل مثبت به ترتیب ۱۶درصدو۳/۵ درصد می باشد.مبنای ارزیابی آزمایشات برای مثبت یا منفی بودن از نظر وجود HAV، نقطه Cut-off می باشد، اندازه های دانسیته نوری بالاتر ازنقطه Cut-off به منزله حضور آنتی ژن HAV و اندازه های دانسیته نوری کمتر ازنقطه Cut-off بعنوان عدم حضور آنتی ژن HAV محسوب می شود .در این کیت یک دهم(۱/۱۰) اختلاف میانگین کنترل مثبت و کنترل منفی،نقطه Cut-off نامیده می شود .همچنین اگر کنترل مثبت و نمونه های مثبت از نظرحضور آنتی ژن HAV تحت تیماربا سرم خنثی به ترتیب ۸۰ درصد و ۲۵ درصد در میزان دانسیته نوری خودکاهش نشان دهند، می توان از صحت آزمایش اطمینان حاصل کرد .

طرح آماری

برای تجزیه و تحلیل نتایج، از طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی دو فاکتور استفاده شد، فاکتورهای مورد نظر تیمار در ۵ سطح، رقت در ٤ سطح (۱ml/L، $۱۰^{-۳}$ ml/L ، $۱۰^{-۶}$ ml/L، $۱۰^{-۹}$ ml/L) بود، که در سه تکرار صورت پذیرفت، داده های حاصل به وسیلهٔ آنالیز واریانس با تعیین کمترین حد مورد اختلاف (LSD) مورد بررسی قرار گرفت .

جهت آنالیز داده هااز نرم افزارهای MstatC و Excel 2000 استفاده شد .

نتایج و بحث

تجزیه واریانس برای تشخیص ویروس (آنتی ژن) از شیر، نشان می دهد که در $\alpha = ۰/۰۵$ بر اساس مقادیر دانسیته نوری (Optical Density) اختلاف بین تیمارها معنی دار است، اما اختلاف بین رقتهای آنتی ژن و اثر متقابل تیمار و رقت معنی دار نمی باشد .

جدول ۱ ـ تجزیه واریانس تشخیص ویروس

منابع تغییر	درجه آزادی	آزمون F
تیمار	۴	۲/۶۱۲۰ *
غلظت	۳	۱/۷۰۴۲ ns
تیمار غلظت	۱۲	۰/۸۹۴۶ ns
خطا	۴۰	
کل	۵۹	

*: وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد

ns: تفاوت معنی داری وجود ندارد

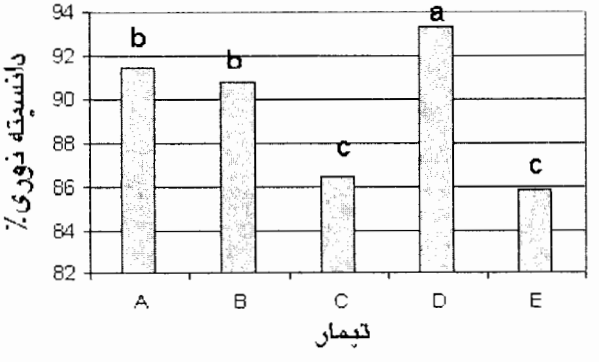
1- Enzyme Immuno Assay
2- Microtiter plate
3- Coefficient of variation
4- Intra-assay

بنابراین بر اساس مقادیر OD[1] فقط تیمارها در تشخیص HAV (آنتی ژن) در شیر اثرگذار بوده و حاوی اختلاف معنی دار می باشند ($P \leq ۰/۰۵$).

بر این اساس برای دستیابی به بهترین تیمار در تشخیص ویروس HAV در شیر تیمارها بر اساس درصد دانسیته نوری نسبت به نقطه Cut-off با یکدیگر مقایسه شدند .

$$\text{درصد دانسیته نوری نسبت به نقطه Cutt-off} = \frac{\text{نقطه Cut-off} - \text{میانگین دانسیته نوری هر تیمار}}{\text{نقطهٔ Cut-off}} \times ۱۰۰$$

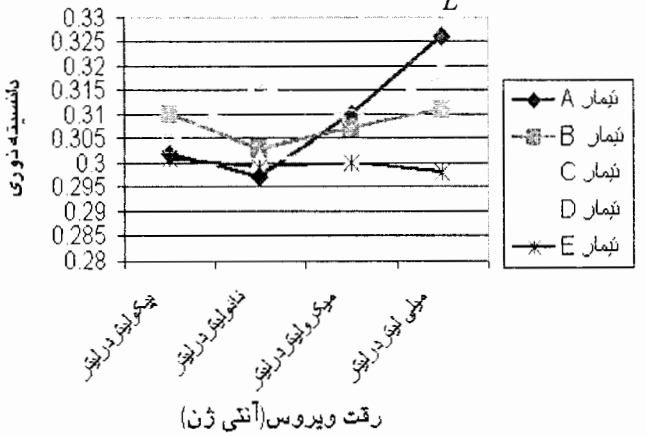
همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می شود درصد دانسیته نوری در تمامی تیمارها بصورت قابل ملاحظه ای ازنقطه Cut-off بیشتر بوده و تمامی تیمارها از نظر وجود HAV(آنتی ژن) مثبت می باشند . در بین پنج تیمار، تیمار D بیشترین و تیمار E کمترین درصد دانسیته نوری را نسبت به نقطه Cut-off نشان می دهد . درصد دانسیته نوری بالا در تیمار D بیانگر واکنش پذیری بیشتر آنتی ژن با آنتی بادی و در نتیجه تشخیص بهتر ویروس (آنتی ژن) می باشد (۳) .



شکل ۱- مقایسه تیمارها براساس درصد دانسیته نوری نسبت به نقطه Cut-off ، حروف مشترک نشان دهندهٔ عدم اختلاف معنی دار در $\alpha = \%5$ می باشد .

همچنین بر اساس شکل ۱ مشخص می شود که تعدیل pH آب پنیر به سمت pH خنثی (pH=۷) حتی در شرایط استفاده از صافی های غشایی سرنگی به منظور حذف میکروارگانیسم ها (تیمار E) میزان دانسیته نوری کمتری را نشان می دهد، این مطلب از آن جهت حائز اهمیت است که اصولاً تکنیک الایزا بر اساس واکنش های آنزیمی استوار بوده و بر اساس آنزیم به کار رفته در این آزمایش (پراکسیداز ریشه خردل) واکنش در pH خنثی (pH=۷) بایستی بهتر صورت گیرد اما نتایج بدست آمده چنین چیزی را نشان نداده و بهترین تیمار برای تشخیص ویروس بر اساس میزان درصد دانسیته نوری، تیمار D یعنی ایجاد دلمهٔ اسیدی و انتقال آب پنیر از صافی غشایی سرنگی می باشد .

در شکل ۲ دانسیته نوری تیمارها نسبت به سطوح مختلف رقت آنتی ژن HAV بر مبنای نزولی مقایسه شده است، همانگونه که ملاحظه می شود میزان دانسیته نوری تیمارها با کا هش رقت آنتی ژن در هیچ یک از تیمارها بصورت یکنواخت افزایش نمی یابد . در تیمارهای A و B افزایش میزان دانسیته نوری نسبت به افزایش میزان آنتی ژن بطور جزئی در محدودهٔ نانولیتر در لیتر ($\frac{nl}{L}$) تا میلی لیتر در لیتر ($\frac{ml}{L}$) مشاهده می شود .



شکل ۲- دانسیته نوری تیمارها نسبت به سطوح مختلف رقت آنتی ژن

عدم وجود حساسیت کافی در اندازه گیری کمی ویروس هپاتیت A (آنتی ژن) در تیمارهای مختلف می تواند به دلیل وجود عوامل بازدارنده و واکنشهای عرضی مثل غلظت پروتئینها به ویژه آلبومین موجود در شیر باشد (شیر حاوی طیف گسترده ای از پروتئینهای

1 – Optical Density

محلول می باشد) . از طرف دیگر کاهش میزان دانسیته نوری برای تیمار E در محدودهٔ رقت میلی لیتر در لیتر (ml/L) با توجه به نوع سنجش (الایزای دو نقطه ای[1]) با پدیده هوک قابل توجیه است (۳) . (پدیدهٔ هوک[2] در تکنیک الایزا زمانی روی می دهد که غلظت آنالیت مورد اندازه گیری از بالاترین غلظت استاندارد بیشتر باشد که در نتیجه منحنی دانسیته نوری نسبت به غلظت آنالیت بصورت قلاب به سمت مقادیر دانسیته نوری کمتر کاهش می یابد).

بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش تکنیک الایزا بر مبنای الایزای دو نقطه ای قادر است ویروس هپاتیت A (HAV) را در شیر در تمامی تیمارهای به کار رفته بر مبنای میزان دانسیته نوری مرجع Cut-off تا رقت $۱۰^{-۹}$ میلی لیتر در لیتر ($۱۰^{-۹}$ml/L) تعیین نماید . هر چند که تشخیص ویروس هپاتیت A (HAV) در شیر با ایجاد دلمهٔ اسیدی و عبور آب پنیر حاصل از صافی غشایی سرنگی می تواند نتایج مطمئن تری بدست آورد . از طرف دیگر تکنیک مذکور در تمامی تیمارها فاقد حساسیت کافی در تعیین میزان کمی ویروس هپاتیت A(HAV) در شیر می باشد و بر اساس میزان دانسیته نوری بدست آمده نمی توان به میزان کمی ویروس در شیر پی برد .

منابع

۱- شهیدی ، ف. ، محبی، م. ، و عدالتیان، م. ر.،۱۳۸۲. میکروبیولوژی و ایمونولوژی ، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، شماره ۳۷۵، مشهد.

۲- ملک زاده، ف. ، ۱۳۷۱ ، اصول طب داخلی هاریسون، بیماریهای عفونی ویروسها، انتشارات شرکت سهامی چهر، تهران.

۳- ملک نیا، ن. ،۱۳۸۰، کتاب جامع الایزا ، معاونت فنی شرکت تولیدی تحقیق گستر، تهران.

4.Anonymous. 1994. Hapatitis Surveillance. Report No. 55, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 24. Atlanta, GA.

5.Bidawaid, S., J. M, Farber ., S.A, Sattar. and S, Hayward., 2000, Heat inactivation of Hepatitis A virus in dairy foods, J. Food Prot., 63(4): 522-528.

6.Blackwell, J. H., D.O, Cliver., J.J, Callis., N.D, Heidelbaugh., E.P, Larkin., P.D, McKercher. and D.W, Thayer., 1985, Food borne viruses: their importance and need for research, J. Food Prot., 48(8): 717-723.

7.Centers for Disease Control and Preventation (CDC). 2004. Division of viral Hepatitis. Centers for Disease Control and Preventation. Atlanta, GA.

8.Cliver, D. O., R.D, Ellender. and M.D, Sobsey., 1983, Methods for detecting viruses in foods: background and general principles, J. Food Prot., 46:288-259.

9.Cliver, D. O., R.D, Ellender. and M.D, Sobsey., 1983, Methods to detect viruses in foods: testing and interpretation of results, J. Food Prot., 46: 345-357.

10.Koopmans, M., H, Vennema., H, Heersma., E, Vanstrien., Y,Van Dugnhoven., D, Brown., M, Reacher. and B, Lopman., 2003, Early identification of common source food borne virus outbreaks in Europe. Emerging Infection Disease. 9(9): 1136-1142.

11.Koopmans, M., C.H, Von Bonsdorff., J, Vinje., D, Demedici. and S, Monroe., 2002, Food borne viruses, FEMS Microbiol. Rev., 26: 187-205.

1-Two-site ELISA

2- Hook Effect

12.Krugman, S., J.P, Giles. and J, Hammond., 1970, Hepatitis virus: effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains, J. Infect. Dis. 122: 432-436.

13.Mbithi, J. N., S, Springthorpe. and S.A, Sattar., 1993, Comparative in vitro efficiencies of hand washing agents against Hepatitis A virus (HM-157) and Poliovirus type 1 (Sabin). Appl. Environ. Microbiol., 59(10): 3463-3469.

14.Minor, P. D., 1991, Picornaviradeae, In Classification and nomenclature of viruses: the fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Franki, I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. and Brown, F. Eds., Archives of Virology. Suppl., 2, Springer Verlage, Wien, pp. 300-326.

15.Raska, K., J, Helcl., J, Jezek., Z, Kabelka., M, Litiv., J, Novak., J, Radkovsky.,V, Serg., J, Zejdl. and V, Zikmund., 1966, A milk borne infectious Hepatitis epidemic, J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immounol., 10: 413-428.

16.Zuckerman, A. J., J.E, Banatvala. And J.R, Pattison., 2000, Principles and Practice of Clinical Virology, 4 th Ed.John Wiley & Sons Ltd., London, p.776

Possibility of HAV diagnosis in milk by ELISA technique

M.Yavarmanesh- A.Mortazavi-M. Nassiri Mahalati-J.Barooei[1]

Abstract

Food borne viral infections are recognized increasingly as human illneses. Hepatitis A virus (HAV) is an important pathogen which has been responsible for water and many food – borne outbreeks especially milk . In this study for approaching to best diagnosis method of HAV in milk by ELISA technique, various dilutions of HAV antigen (1 ml/L, 10^{-3} ml/L, 10^{-6} ml/L, 10^{-9} ml/L) were added to UHT milk . Various treatments for virus(antigen) isolation, showed that milk with acidic coagulation, following filtration with paper and membrane filters, had the most optical density. It`s indicated that this treatment resulted the best diagnosis ($p < 0/05$) . Also it has been revealed that this method has not any sensitivity for quantitative determination of HAV(antigen) in milk.

Key words: diagnosis, Hepatitis A virus(HAV), Milk, ELISA

1 – Department of Food Sci. & Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, P. O. Box 91775-1163, Mashhad, Iran. e-mial:masoud53y@yahoo.com