الكشف عن بعض الممرضات الفيروسية المنقولة عن طريق الخضار باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليميراز للنسخ العكسي RT-PCR

جورجيت فتال*[1] وعبد الجليل غرىواتي[2] وفاتح خطيب[3] ونعيم الحسين[1]

(1). مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، حلب، سورية.

(2). قسم هندسة التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، حلب، سورية.

(3). قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية.

(*للمراسلة الباحث: جورجيت فتال، البريد الإلكتروني: Georgettefattal90@gmail.com)

الملخص

تعد الخضار أحد أهم مصادر العدوى بالفيروسات المنقولة عن طريق الغذاء، وسبباً لتفشي عدة أمراض حول العالم. هدف الدراسة إلى الكشف عن الفيروسات التهاب الكبد A (HAV) وE (HEV) والنوروفيروس (NV) بالطرق الجزيئية على عينات من الخضار. جمعت عينات من الخضار الطازجة من الأسواق المحلية في محافظة حلب، ومن بعض الحقول المزروعة على ضفاف نهر قويق في أربعة مواعيد مختلفة خلال العامين 2018–2019. تم غسيل العينات بواسطة محلول منظم، ومن ثم تركيز الفيروسات من ماء الغسيل بواسطة غشاء من السيليلوز المشحون إيجابياً. أجريت عملية نسخ عكسي بشكل مباشر دون استخلاص الحمض النووي الريبي RNA إلى سلسلة الـ DNA المتممة لها cDNA. أجريت عملية الكشف باستخدام السلسلة المتممة cDNA كقالب مكاثرة في التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR. بينت النتائج وجود الفيروسات بشكل أساسي على عدد من الخضار الورقية خلال فصلي الخريف والربيع. بلغت نسبة وجود النوروفيروس 18.4%، وفيروس التهاب الكبد A 4.1%، بينما وجد فيروس التهاب الكبد E بنسبة 2.05%.

كلمات مفتاحية: الكشف الجزيئي، أمراض منقولة عن طريق الغذاء، الفيروسات المعدية

المقدمة

يشكل الغذاء الذي نتناوله مصدراً مهماً للعديد من الممرضات التي تصيب الإنسان، وتعد الخضار الطازجة من أهم مصادر العدوى وتطور الكثير من الفاشيات الناتجة عن المسببات المرضية المنقولة عن طريق الغذاء في جميع أنحاء العالم (Lynch *et al.*, 2009; Sivapalasingam *et al.*, 2003).

وقد ازداد في السنوات الأخيرة دور الفيروسات المنقولة عن طريق الغذاء كواحدة من أهم المسببات المرضية وتفشي الأمراض الناتجة عنها حول العالم، ومن أهم هذه الفيروسات النوروفيروس (NoV) والفيروسات المعوية (EV) والفيروسات الغدانية (AdV) وفيروس التهاب الكبد الوبائي A (HAV) وفيروس التهاب الكبد E (HEV) وفيروسات الروتا (RoV) والفيروسات النجمية (AstV)، (Greening and Cannon, 2016).

تنتشر الفيروسات المسببة للأمراض في البيئة من خلال تصريف النفايات سواء أكانت معالجة أو غير معالجة، وتتراوح تراكيز الفيروسات في مياه الصرف الصحي الخام ما بين 5000 و100000 وحدة تشكيل الصفائح المدمرة/ليتر (PFU/L)، وقد تقل بدرجة

كبيرة أثناء المعالجة، ومع ذلك يوجد في المتوسط ما بين 50 إلى 100 وحدة تشكيل الصفائح المدمرة/ليتر (PFU/L) في المخلفات السائلة الناتجة عن محطات معالجة المياه الصرف الصحي (Rao and Melnick, 1986).

تسبب الفيروسات 59٪ من الأمراض المنقولة عن طريق الأغذية والتي تحدث سنوياً في الولايات المتحدة 37 مليون حالة سنوياً، وتعدّ فيروسات النوروفيروس من أهم هذه الفيروسات، إذ تسبب ما يقدر بـ 5.5 مليون حالة سنوياً (Scallan *et al*., 2011). وتعرف الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية (EFSA) فيروس النوروفيروس (NoV) والتهاب الكبد A على أنهما الفيروسات الرئيسية التي تنقلها الأغذية والتي لها أهمية في الصحة العامة (EFSA, 2011).

يسبب فيروس التهاب الكبد A التهاباً حاداً في الكبد الذي يتميز بالحمى واليرقان وبراز فاتح اللون وبول داكن اللون وآلام في البطن وأحياناً الإسهال للأطفال والبالغين (Nainan *et al*., 2006)، وتتشابه الأعراض السريرية لفيروس التهاب الكبد E مع التهاب الكبد A ولكنها تكون أشد وطأة (Kase *et al*., 2009). ويُعد النوروفيروس المسبب الرئيس لالتهاب المعدة والأمعاء الوبائي المنتقل عبر الأغذية عالمياً، وتؤدي إصابة المعدة بالنوروفيروس إلى تأخر تفريغها وحدوث الغثيان والتقيؤ المميز للإصابة، كما يصيب الخلايا المعوية الناضجة في الأمعاء الدقيقة مؤدياً إلى سوء امتصاص الدسم وD-xylose واللاكتوز لمدة أسبوعين (Greening, 2006).

وقد تكون الخضار أحد أهم مسببات تفشي هذه الأمراض، إذ تستهلك هذه المحاصيل غالباً بشكل طازج (نيء) أو مطهوة قليلاً، ويمكن أن تتلوث بالبراز في أي مرحلة من مراحل النمو والقطاف والنقل والتعبئة (Petrignani *et al*., 2010; Rowe *et al*., 2009). وقد سُجل العديد من حالات تفشي مرض التهاب الكبد A بسبب تناول البندورة المجففة (Gallot *et al*., 2011) والطازجة المقطعة (Lund & Snowdon 2000) والخس (Pebody *et al*., 1998) وأطباق السلطة (Nygård *et al*., 2001) والبقلة (CDC, 1971) والبصل الأخضر (Dentinger *et al*., 2001) والذي أدى إلى موت 3 أشخاص من 601 إصابة في بنسلفانيا (Wheeler *et al*., 2005). وكان الخس أكثر أنواع الخضار التي تسببت بتفشي النورروفيروس (Ethelberg *et al*., 2010; Wadl *et al*., 2010; Gallimore *et al*., 2005) إضافة للخضار بشكل عام (Makary *et al*., 2009) وأطباق السلطات (Schmid *et al*., 2007).

تعود خطورة هذا النوع من الكائنات إلى حدوث الإصابة بواسطة أعداد قليلة من وحدات الفيروس، حيث يكفي وجود 10-100 وحدة فيروسية معدية لحدوث الإصابة (Greening, 2006). وذلك نظراً لقدرتها الإمراضية المرتفعة، وقدرتها السريعة على التكاثر في خلايا العائل حيث يمكن أن تزداد بمعدل 10^{11} وحدة تشكيل الصفائح المدمرة (PFU) في اليوم الواحد عند الشخص المصاب (Atmar *et al*., 2008).

تمتاز جسيمات الفيروسات بثباتية عالية ومقدرة كبيرة على البقاء تحت الظروف البيئية المختلفة، فهي قادرة على البقاء تحت ظروف البرودة والرطوبة والبيئات المظلمة لعدة أشهر وحتى السنة أو أكثر، وهي مقاومة لدرجة الـ pH المنخفضة والمنظفات والمذيبات العضوية والحرارة المرتفعة (Cappellozza *et al*., 2012) وهذا ما يجعلها قادرة على البقاء في مياه الصرف الصحي، والبقاء لأشهر وسنوات في المياه العذبة والمالحة (Sobsey *et al*., 1986). كما تبقى فعّالة على الغذاء لمدة من يومين حتى 4 أسابيع (Butot *et al*., 2008). وعموماً فإن تحمل الفيروسات المعوية للإجهادات البيئية المختلفة يساعدها على مقاومة كل من البيئة الحامضية للمعدة عند الثدييات والفعالية القلوية والحالّة للبروتينات في الأثني عشري، مما يفسر وجودها ضمن السبيل الهضمي السفلي. كما يجعلها قادرة على البقاء في الأطعمة الحامضية المحفوظة والمجمدة، والمطبوخة قليلاً (Greening, 2006). يمثل

وجود الفيروس بأعداد قليلة، وبشكل غير متجانس في المادة الغذائية؛ أحد أهم الصعوبات التي تعترض عملية الكشف؛ الأمر الذي يتطلب طريقة ذات كفاءة مرتفعة في غسل وتركيز الفيروس عن العينة المدروسة (Verhoef *et al*., 2008).

تستخدم تقنيات عديدة لتجميع وتركيز الفيروسات المنقولة عن الخضار والفواكه، وتعتمد بشكل رئيس على غسل هذه المنتجات وتركيز الفيروسات الموجودة في ماء الغسيل باستخدام طرائق مختلفة كالترسيب بالبولي ايثلين غليكول PEG (Kokkinos *et al*., 2012; Dubois *et al*., 2002) والترشيح الفائق Ultrafiltration (Butot *et al*., 2007) والترشيح بالتبادل الأيوني (Dubois *et al*., 2006) والتثفيل الفائق Ultracentrifugation (Rzeżutka *et al*., 2006) والطرائق المناعية (Lee *et al*., 2012) والتخثر Flocculation (Melgaço *et al*., 2016) والترسيب بالحبيبات المشحونة إيجابياً (Morales-Rayas *et al*., 2010).

1- أهمية البحث وأهداف:

لا تتوفر إحصاءات رسمية على الصعيد المحلي حول التسممات الفيروسية المعوية وطرائق انتقالها بالرغم من الاستهلاك الكبير للخضار الطازجة مباشرة، أو استخدامها في تحضير الأنواع المختلفة من السلطة، وفي ظل انعدام الرقابة على نوعية المياه المستخدمة في ري المزروعات. ومن جهة أخرى فإن المواصفة القياسية السورية رقم 2179 لعام 2007 الخاصة بضبط التلوث بالأحياء الدقيقة لا تتضمن معايير خاصة بتلوث الخضار النيئة، إنما تقتصر على الخضار المعلبة والمجمدة فقط، دون أن تشمل الكشف عن الفيروسات أيضاً، يضاف إلى ذلك ندرة الأبحاث المحلية والعربية المتعلقة بالكشف عن الفيروسات، ولذلك فقد هدف البحث إلى:

الكشف عن كل من الفيروسات (Norovirus وHAV وHEV) المنقولة عن طريق الغذاء في عينات من الخضار في حلب باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليمراز للنسخ العكسي RT-PCR.

2- مواد وطرائق البحث

نُفذ هذا البحث في مختبر التقانات الحيوية في مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب، التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية/ GCSAR، خلال الفترة 2018–2019.

3-1. جمع العينات

جُمعت 49 عينة من الخضار الطازجة المتوفرة في الأسواق المحلية لمدينة حلب ومن المزارع المنتشرة على ضفاف نهر قويق (مياه الصرف الصحي لمدينة حلب)، وذلك خلال أربعة مواعيد مختلفة (الجدول 1).

3-2. غسل وتركيز الفيروسات

وزنت كمية 25 غ من كل عينة، وغسلت بكمية 225 مل من محلول الغسيل (50 ميلي مولر غلايسين-100 ميلي مولر Tris-HCl–1% مستخلص اللحم) pH 9.5 لمدة 45 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة مع التحريك. رُشح سائل الغسيل من الخضار بتمريره على ثلاث طبقات من الشاش الطبي، وثُفل لمدة 5 دقائق عند سرعة 4000 دورة / الدقيقة. رُكزت الفيروسات بطريقة الترشيح باستخدام غشاء من النتروسيلولوز المشحون إيجابياً، وذلك بناءً على نتائج دراستنا السابقة لتركيز فيروس التهاب الكبد A (فتال وآخرون، 2018).

عُدلت درجة حموضة سائل الغسيل إلى pH 7.2 باستخدام حمض كلور الماء HCl، ثم مُررت كل عينة من خلال غشاء

نتروسيللولوز (إنتاج شركة Protran)، مشحون إيجابياً ومسامه 0.45 ميكرومتر، باستخدام جهاز خاص للترشيح القابل لإعادة الاستخدام مصنع من متعددات السفلون (من شركة Nalgene). وضع الغشاء في 5 مل من المحلول (50 ميلي مولر غلايسين–1% مستخلص اللحم، pH 9) مع الرج يدوياً بقوة، لثلاث مرات، وبمعدل دقيقتين في كل مرة.

الجدول 1. أنواع وعدد عينات الخضار التي جمعت من السوق المحلية وبعض الحقول في محافظة حلب

التاريخ النوع	شهر نيسان/ 2018	شهر ايلول/ 2018	شهر تشرين الأول/ 2018	شهر حزيران/ 2019	العدد الكلي
بقدونس	+	+	+	+	4
بندورة	-	+	-	+	2
بقلة	+	+	-	+	3
بصل أخضر	+	-	+	-	2
جرجير	+	+	-	+	3
جزر	+	+	-	+	3
خس	+	-	-	+	2
رشاد	+	+	+	-	3
زعتر أخضر	+	-	-	+	2
فجل	+	+	+	+	4
فليفلة	-	+	-	+	2
قثة	-	+	-	+	2
ملفوف	+	+	-	+	3
نعناع	+	+	+	+	4
هندباء	+	+	+	-	3
سبانخ	+	-	+	-	2
سلق	+	-	+	-	2
خيار	+	+	-	+	3
المجموع	15 عينة	13 عينة	8 عينة	13 عينة	49

3-3. الكشف عن الفيروسات:

3-3-1. النسخ العكسي (Reverse Transcription (RT-PCR:

كُشف عن الفيروسات في العينات المدروسة بوساطة تفاعل البوليميراز المعشش nested PCR، حيث نُفذ التفاعل على مرحلتين، تم في الأولى استخدام زوج من البادئات تكاثر قطعة محددة كبيرة الحجم نسبياً، بينما استخدم في المرحلة الثانية، ناتج تفاعل المرحلة الأولى كقالب مكاثرة باستخدام زوج آخر من البادئات يعمل ضمن مجال الزوج الأول من البادئات (الجدول 2). يفيد هذا النوع من التفاعل في زيادة تعداد نسخ القالب المراد مكاثرته عندما تكون قليلة في الوسط، كما يفيد في زيادة التخصص لعملية الكشف عن الهدف المراد البحث عنه والتخفيف من الارتباط غير النوعي.

أُجريت عملية النسخ العكسي (RT) reverse transcription بشكل مباشر دون استخلاص جينوم الفيروسات (الحمض النووي الريبي RNA) (Abe, 2003). عولجت العينة بتسخين كمية 10 ميكروليتر من ناتج تركيز الفيروس عند حرارة 95 °س لمدة 3 دقائق ثم وضعت مباشرة في الثلج لمدة 5 دقائق. واستخدمت كمية 5 ميكروليتر من كل عينة في تفاعل النسخ العكسي مع 1 ميكروليتر من متعدد التايمين oligo dT، و1 ميكروليتر من مزيج النكليوتيدات الأربعة dNTP's (تركيز 10 ميلي مولر) وأُكمل الحجم إلى 10 ميكرو ليتر بإضافة الماء المعقم منزوع الشوارد. سُخن المزيج عند درجة حرارة 65 °س لمدة 5 دقائق ثم وضعت مباشرة في الثلج لمدة 2 دقائق. تم بعد ذلك إضافة المزيج الثاني المؤلف من 0.5 ميكروليتر من أنزيم النسخ العكسي reverse

transcriptase (تركيز 200 وحدة أنزيمية/ ميكروليتر) و2 ميكرو ليتر من المحلول المنظم (10x RT-PCR buffer)، و17.5 ميكرو ليتر ماء معقم منزوع الشوارد. تمت عملية النسخ العكسي للحمض النووي الريبي RNA الموجود في العينات عند درجة حرارة 50 °س لمدة 60 دقيقة، ومن ثم إيقاف التفاعل بالتسخين لمدة 15 دقائق عند درجة الحرارة 70 °س وفق تعليمات الشركة الصانعة (GeneDirex الأمريكية).

3-3-2. التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR

استخدمت نسخ الـ DNA المتممة cDNA الناتجة كقالب مكاثرة للتفاعل الأول لـ PCR، إذ حُضر مزيج التفاعل في حجم نهائي 20 ميكروليتر (2 ميكرو ليتر من cDNA، و2 ميكرو ليتر من المحلول المنظم (10x PCR buffer)، و0.6 ميكروليتر من محلول كلوريد المغنيزيوم (تركيز 50 ميلي مولر)، و0.4 ميكروليتر من مزيج النكليوتيدات الأربعة dNTP's (تركيز 10 ميلي مولر)، و1 ميكروليتر لكل من البادئة الأمامية والعكسية المتخصصة بالفيروس المدروس (التركيز الأساسي لكل منها 10 ميكرومولر) جدول(2)، و1 ميكروليتر من محلول مصل الألبومين البقري BSA (1 مغ/مل)، و0.2 ميكروليتر من أنزيم البلمرة الثابت حرارياً *Taq* Polymerase (تركيز 5 وحدة أنزيمية/ ميكروليتر)، وأُكمل الحجم إلى 20 ميكرو ليتر بإضافة الماء المعقم منزوع الشوارد.

نُفذت عملية التدوير الحراري في جهاز من نوع (Eppendorf Mastercycler, Germany) وفق برنامج تدوير حراري تضمن عملية فصل أولي عند درجة حرارة 94 °س لدقيقتين، تلتها 50 دورة تضمنت كل دورة منها: مرحلة فصل ثانوية عند درجة حرارة 94 °س لمدة 30 ثانية، ومرحلة التحام البادئة عند درجة حرارة 55 °س لمدة 30 ثانية، ومرحلة الامتداد عند حرارة 72 °س لمدة 30 ثانية، وبعد انتهاء الدورات المحددة أُجريت عملية استطالة نهائية لدورة واحدة فقط عند حرارة 72 °س لمدة 7 دقائق (Bowden, 2010a,b; Kirkwood, 2010; Abe, 2003).

ثم أُجريت مكاثرة بطريقة nested-PCR لـ DNA الناتج عن برنامج التدوير الأول. إذ حُضر مزيج التفاعل الثاني بحيث يحوي نفس مكونات التفاعل الأول، ماعدا استخدام 1 ميكرولتر من ناتج التفاعل الأول كقالب مكاثرة، واستخدام زوج آخر من البادئات الداخلية المتخصصة على الفيروسات المدروسة (الجدول 2).

تمت عملية المكاثرة لفيروسي التهاب الكبد A وE باستخدام نفس برنامج التدوير الحراري الأول (Bowden, 2010a,b).

أما بالنسبة للنوروفيروس فقد تمت عملية التدوير الحراري وفق برنامج تضمن عملية فصل أولي لـ DNA عند درجة حرارة 94 °م لمدة دقيقتين، تلتها 35 دورة تضمنت كل دورة منها: مرحلة فصل ثانوية عند درجة حرارة 94 °س لمدة 30 ثانية، ومرحلة التحام البادئة عند درجة حرارة 45 °س لمدة 30 ثانية، ومرحلة الامتداد عند حرارة 72 °س لمدة 30 ثانية، وبعد انتهاء الدورات المحددة أُجريت عملية استطالة نهائية لدورة واحدة فقط عند حرارة 72 °س لمدة 7 دقائق (Kirkwood, 2010).

الجدول.2 والتسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في التفاعل التسلسلي المعشش Nested PCR وطول القطعة المتوقعة لكل فيروس.

الكائن المدروس	اتجاه البادئة	اسم البادئة	تسلسل البادئة 5´-------------3´	مرحلة التفاعل	طول القطعة المكاثرة (زوج نكليوتيدي (bp)
نوروفيروس	الأمامية	NV2o-F2	GGAGGGCGATCGCAATC	الأولى	379
	العكسية	NV2o-R	GTRAACGCRTTYCCMGC		
	الأمامية	G2-F3	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGA	الثانية	311
	العكسية	G2SK-R	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT		
فيروس التهاب الكبد E	الأمامية	HEVORF1-Outer-F	CTGGCGATYACTACTGCYATTGAGC	الأولى	336
	العكسية	HEVORF1-Outer-R	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC		
	الأمامية	HEVORF1-Inner-F	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG	الثانية	288
	العكسية	HEVORF1-Inner-R	GCGAGWRTACCARCGCTGAACATC		
فيروس التهاب الكبد A	الأمامية	HAV-OU1	TTGTCTGTCACAGAACAATCAG	الأولى	358
	العكسية	HAV-OD1	AGTCACACCTCTCCAGGA AAACTT		
	الأمامية	HAV-IU2	TCYCAGAGCTCCATTGAA	الثانية	233
	العكسية	HAV-ID2	AGGRGGTGGAAGYACTTCATTTGA		

3-3-3. فصل نواتج التفاعل

فُصلت نواتج تفاعل الـ PCR الثاني بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1.2%. إذ حُملت كمية 10 ميكروليتر من الـ DNA، أُضيف لها 1 ميكروليتر محلول تحميل عينات 10x loading dye buffer، وتمت عملية الرحلان في جهاز الرحلان الكهربائي من شركة (Euroclone)، لمدة 45 دقيقة عند 100 فولط، ثم لُونت الهلامة في محلول بروميد الايثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، وظُهّرت تحت الأشعة فوق البنفسجية UV في جهاز توثيق الهلام gel documentation من نوع Wise Doc، وأُخذت صورة رقمية للهلامة لقراءة النتائج.

3- النتائج

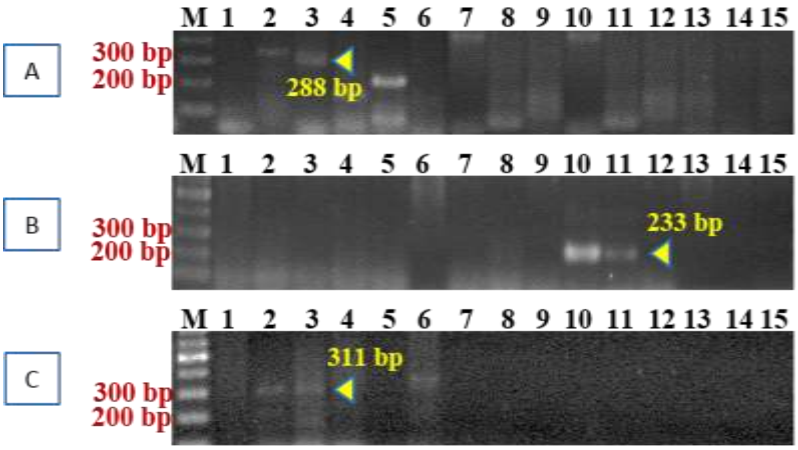
بينت نتائج الكشف الجزيئي عن الفيروسات بطريقة تفاعل البوليميراز للنسخ العكسي RT-PCR وجود جميع الفيروسات المدروسة في العينات التي تم جمعها، وذلك من خلال طول القطعة المتوقعة لكل زوج من البادئات في المرحلة الثانية من التفاعل (الشكل 1)، بنسب مختلفة. تباينت نسب تردد الفيروسات في العينات المدروسة بشكل عام، حيث وجد فيروس التهاب الكبد A في عينتين، والنوروفيروس في تسع عينات، بينما وجد فيروس التهاب الكبد E في عينة واحدة فقط من أصل 49 عينة مختبرة، وهذا يعادل نسبة 4.1 و18.4 و2.05%، على التوالي.

أظهرت النتائج أيضاً تبايناً في عدد العينات الملوثة بالفيروس تبعاً لموعد جمع العينات، حيث كُشف عن وجود النوروفيروس في جميع مواعيد جمع العينات، وكانت 11 عينة إيجابية لأحد الفيروسات، وعينة واحدة فقط كانت إيجابية لفيروسين في حين لم يكتشف وجود جميع الفيروسات معاً في أي من العينات المختبرة، بينما كُشف عن كل من فيروسي التهاب الكبد A وE في شهر نيسان من العام 2018. وقد سجل شهر (تشرين الأول 2018) أكبر نسبة تلوث بالنسبة للفيروسات المدروسة حيث أعطى 3 عينات إيجابية من أصل 8 عينات تلاه شهر (نيسان 2018) إذ سجل 5 نتائج إيجابية للفيروسات في 15 عينة. في حين سجل أدنى عدد للعينات الملوثة بالفيروس في شهر حزيران من العام 2019، وذلك عند عينة واحدة إيجابية فقط.

أما على مستوى المحصول المدروس فقد بينت النتائج، أن البصل الأخضر كان المحصول الأكثر تلوثاً بالفيروسات المدروسة، حيث وجد في جميع العينات المدروسة (2/2)، بينما كان نصف عينات البقدونس والفجل ملوثاً بالفيروسات (4/2)، وكذلك البندورة (2/1)، أما البقلة والجرجير والرشاد والملفوف فقد وجدت الفيروسات بنسبة (3/1) والنعناع (4/1)، (الجدول 3).

الجدول 3. الفيروسات التي تم الكشف عنها على عينات من الخضار تبعاً لموعد الجمع ونوع المحصول

فيروس	تاريخ جمع العينة	العينات الايجابية	النسبة المئوية %
التهاب الكبد A	2018-4-11	ملفوف	49/2 (4.1%)
		نعناع	
نوروفيروس	2018-4-11	بقلة	49/9 (18.4%)
		بصل أخضر	
	2018-9-18	بقدونس	
		جرجير	
		فجل	
	2018-11-27	بقدونس	
		رشاد	
		فجل	
	2019-6-18	بندورة	
التهاب الكبد E	2018-4-11	البصل الأخضر	49/1 (2%)



الشكل (1): الرحلان الكهربائي في هلامة آغاروز تركيز 1.2% لنواتج مكاثرة الـ RT-PCR للفيروسات HEV، HAV، Norovirus على التوالي A، B، C لعينات شهر نيسان 2018. (M): مؤشر قياسي 100 زوج نكليوتيدي. المسارات 1–15: عينات الخضار المدروسة.

4- المناقشة:

تعد عملية مراقبة الممرضات الفيروسية المنقولة عن طريق الأغذية ضعيفة نسبياً إذا ما قورنت بعملية رصد الممرضات البكتيرية كمسببات للأمراض المعدية المعوية، حيث أشارت العديد من الدراسات إلى أن معايير مراقبة الجودة الميكروبيولوجية للأغذية على مستوى العالم والمعتمدة على المعايير القياسية للبكتيريا القولونية التي تم تطويرها كمؤشرات للتلوث البرازي غير كافية للحماية من الأمراض المعدية التي تنقلها الأغذية. حيث تم الكشف عن أعداد كبيرة من الفيروسات المسببة للأمراض التي تصيب الإنسان في الأطعمة التي تباع بالتجزئة والتي تجاوزت جميع معايير المكافحة الميكروبيولوجية (Newell *et al*., 2010).

أما على الصعيد المحلي فلا يتوفر حتى تاريخه دراسات علمية موثقة حول دور الخضار في نقل الأمراض الفيروسية. لذلك تعد هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في هذا المجال، والتي اعتمدت على تقنيات جزيئية حديثة ودقيقة في عملية الكشف عن الفيروسات المحمولة سطحياً على عدد من الخضار الصيفية والشتوية في محافظة حلب. تم من خلال هذه الدراسة الكشف عن وجود ثلاثة أنواع من الفيروسات المعدية للإنسان هي النوروفيروس، وفيروسي التهاب الكبد A وE، وذلك على عدة أنواع من الخضار الورقية التي تؤكل نيئة مثل البقدونس والنعناع والجرجير والبقلة والبصل الأخضر والملفوف، أو درنية (الفجل)، أو على الثمار (البندورة).

تنتشر الفيروسات المعوية في البيئة عن طريق التلوث بالبراز البشري، وتستعمل الخضار المدروسة (والتي تم كشف الفيروسات عليها) في الغالب لتحضير السلطات التي لا تخضع لمعالجة بالحرارة، ويمكن لهذه الجزيئات أن تتكاثر في المضيف المناسب وتسبب المرض.

يمكن أن يُعزى وجود فيروس HAV وNoV وHEV في عينات الخضار المدروسة، إلى أنها تلوثت بالفيروس بسبب عملية الري التي تستخدم مياه الصرف الصحي أو مياه جوفية ملوثة بالبراز، أو بسبب استخدام هذه المياه في الممارسات الشائعة لما بعد الحصاد من رش أو غسل أو غمر الفواكه والخضروات في الماء (Gandhi *et al.*, 2010). أو قد حدث هذا التلوث في مرحلة الإنتاج أو في مرحلة البيع بواسطة مناولي الأغذية (قاطفي الخضار وبائعيها) أو العملاء الذين يلامسون المنتجات بسبب ممارسات النظافة غير المأمونة، إذ ينتج عن لمس قطع من الخس الطازج مع إصبع ملوثة صناعياً لمدة 10 ثوانٍ نقل 9.2% تقريبًا من الـ HAV (Bidawid *et al.*, 2000). أم بالنسبة لموعد جمع العينات فقد لوحظ أن عملية الكشف كانت إيجابية غالباً خلال فصلي الخريف والربيع، حيث تكون درجات الحرارة معتدلة نسبياً مما يحافظ على حيوية الفيروس إذا ما قورنت بالعينات التي جُمعت صيفاً حيث سادت درجات حرارة مرتفعة خلال هذه الفترة.

تطابقت نتائج هذه الدراسة مع دراسات عالمية مشابهة في نفس المجال من حيث الكشف عن وجود فيروسات معدية محمولة على الخضار. فقد أظهرت نتائج اختبار 149 عينة من الخس جُمعت من نقاط البيع من ثلاث دول أوروبية (اليونان، صربيا، بولندا) وجود الفيروس HEV بنسبة 3.2% والفيروس NoVGI بنسبة 1.3% والفيروس NoVGII بنسبة 0.8%، بينما سجلت نسبة 0.0% للفيروس HAV (Kokkinos *et al.*, 2012). وتبين بنتائج دراسة أخرى لـ 30 عينة من السبانخ والبقدونس والبقلة جُمعت من متاجر المكسيك أن نسبة التلوث بالنوروفيروس وفيروس التهاب الكبد A كانت 7.14% و23.3%، على التوالي (Parada-Fabian *et al.*, 2016). بينما أشار (Felix-Valenzuela *et al.*, 2012) في دراسته التي أُجريت في المكسيك على 32 عينة من الخضار (الكزبرة، البقدونس، الخس، البصل الأخضر) جُمعت من مخازن مختلفة لتعبئة الخضار إلى وجود فيروس HAV بنسبة 21.8% والفيروس NoV بنسبة 18.7%. وبينت إحدى الدراسات التي تناولت التلوث بفيروس التهاب الكبد A في 29 عينة خضار متنوعة من مناطق زراعة مختلفة في الباكستان أن نسبة التلوث بـالفيروس كانت 10.3% (Khan *et al.*, 2014)، أما في إيطاليا فقد أشارت إحدى الدراسات التي أُجريت على 911 عينة من الخضار الجاهزة للأكل (كالسلطات والخضار المباعة في المتاجر على أنها مغسولة) إلى انتشار فيروس HEV بنسبة 0.6% وHAV بنسبة 1.9%، فيما كانت العينات خالية من NoV (Terio *et al.*, 2017).

أظهرت نتائج تحليل أكثر من 10000 حالة بين عامي 2001 و2007 تفشي الأمراض المنقولة عن طريق الأغذية بنسب تختلف اختلافاً كبيراً بين البلدان، مما يُفترض أنه يعكس الاختلافات في أنظمة المراقبة الوطنية (Newell *et al.*, 2010).

وبحسب (Jacobsen and Wiersma, 2010) فإن سورية تعاني من معدلات إصابة متوسطة بفيروس التهاب الكبد A. ويمكن اليوم من خلال نتائج هذه الدراسة اعتماد التقانات الحيوية الحديثة المعتمدة على التفاعل التسلسلي للبوليميراز في الكشف عن مصادر الإصابة وتتبع مصادر الوبائيات لغيرها من الممرضات في حال حدوثها، كما يمكن التوصية باعتماد هذه الطرائق في مخابر الكشف عن سلامة الأغذية عند إدراج الملوثات الفيروسية المعدية للإنسان ضمن المواصفات القياسية.

الاستنتاجات

1- تعد الخضار عموماً والورقية خاصةً مصدراً للتلوث ببعض الفيروسات المعدية للإنسان.

2- كان النوروفيروس هو الأكثر تواجداً من بين الفيروسات المدروسة على عينات الخضار من أسواق حلب خلال الدراسة.

3- كفاءة طريقة التفاعل البوليميراز للنسخ العكسي في الكشف عن الفيروسات المحمولة على الخضار.

التوصيات

- إدراج الكشف عن الفيروسات ضمن المواصفات القياسية لسلامة الأغذية.
- اعتماد الطرق الجزيئية المعتمدة على الـ PCR في مخابر الكشف عن الأحياء الدقيقة في الأغذية نظراً لدقتها وموثوقيتها.
- المتابعة في البحث لاستخدام طريقة التقدير الكمي بالاعتماد على التفاعل التسلسلي للبوليميراز بالزمن الحقيقي qPCR.
- تتبع تلوث الخضار بالفيروسات من مرحلة الانتاج الزراعي حتى المستهلك.
- وضع ضوابط صارمة لزراعة الخضار على سرير نهر قويق بحلب ومنع الري بمياه الصرف الصحي.
- تطبيق المواصفة السورية الخاصة بمياه الصرف الصحي المعالجة لأغراض الري 2003/2752.
- ضرورة معالجة مياه الصرف الصحي مع أنها غير كافية للقضاء على كل الفيروسات.

المراجع

فتال، جورجيت وعبد الجليل غريواتي وفاتح خطيب ونعيم الحسين (2018). اختبار بعض الطرائق لتركيز فيروس التهاب الكبد A من الخضار والكشف عنه بتفاعل البوليميراز للنسخ العكسي RT-PCR. مجلة بحوث جامعة حلب–سلسلة العلوم الزراعية، العدد 138 لعام 2019.

Abe, K., (2003). Direct PCR from Serum. In: Bartlett, J.M.S., Stirling, D., Ed., PCR Protocols 2nd ed, Methods in Molecular Biology, vol 226, Humana Press, Totowa, NJ, pp: 161-166.

Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Graham, D. Y. (2008). Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging infectious diseases*, *14*(10), 1553.

Bidawid, S., Farber, J. M., and Sattar, S. A., (2000) Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Appl. Environ. Microbiol. 66*(7), 2759–2763.

Bowden, S., (2010a). Hepatitis A Virus. In: SCHULLER M., SLOOTS T., JAMES G., HALLIDAY C., CARTER I., Ed., PCR for Clinical Microbiology, Springer, Dordrecht, pp: 245- 248.

Bowden, S., (2010b). Hepatitis E Virus. In: SCHULLER M., SLOOTS T., JAMES G., HALLIDAY C., CARTER I., Ed., PCR for Clinical Microbiology, Springer, Dordrecht, pp: 261- 263.

Butot, S., Putallaz, T., & Sanchez, G., (2007). Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 186-

192.

Butot, S., Putallaz, T., & Sanchez, G., (2008). Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *International journal of food microbiology*, 126(1-2), 30-35.

Cappellozza, E., Arcangeli, G., Rosteghin, M., Kapllan, S., Magnabosco, C., Bertoli, E., & Terregino, C., (2012). SURVIVAL OF HEPATITIS A VIRUS IN PASTEURIZED MANILA CLAMS. *Italian journal of food science*, 24(3).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (1971). Infectious hepatitis—Tennessee. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 20, 357.

Dentinger, C. M., Bower, W. A., Nainan, O. V., Cotter, S. M., Myers, G., Dubusky, L. M., ... & Bell, B. P., (2001). An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *The Journal of infectious diseases*, 183(8), 1273-1276.

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. *Journal of food protection*, 65(12), 1962-1969.

Dubois, E., Hennechart, C., Deboosere, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., ... & Traoré, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 164-171.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*, *9*(7), 2190.

Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A. C., Villif, A., Jensen, T., ... & Muller, L. (2010). Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Eurosurveillance*, *15*(6), 19484.

Gallimore, C. I., Pipkin, C., Shrimpton, H., Green, A. D., Pickford, Y., McCartney, C., ... & Gray, J. J. (2005). Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiology & Infection*, *133*(1), 41-47.

Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A. M., Couturier, E., Carrillo-Santisteve, P., Pouey, J., ... & De Valk, H., (2011). Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 566-568.

Gandhi, K. M., Mandrell, R. E., & Tian, P. (2010). Binding of virus-like particles of Norwalk virus to romaine lettuce veins. *Appl. Environ. Microbiol.*, *76*(24), 7997-8003.

Greening, G. E., (2006). Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). In: GOYAL, M. S., Ed., Viruses in Foods, Springer, Boston, MA, pp: 5-42.

Greening, G. E., Cannon, L. J., (2016). Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). In: GOYAL, M. S., Ed., Viruses in Foods, Springer, Boston, MA, pp: 5-57.

Jacobsen, K. H., & Wiersma, S. T. (2010). Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*, *28*(41), 6653-6657.

Kase, J. A., Correa, M. T., & Sobsey, M. D. (2009). Detection and molecular characterization of swine hepatitis E virus in North Carolina swine herds and their faecal wastes. *Journal of water and health*, *7*(2), 344-357.

Khan, W., Irshad, M., Rehman, G., & Hussain, A. (2014). HAV in fresh vegetables: a hidden health risk in district Mardan, Pakistan. *SpringerPlus*, *3*(1), 675.

Kirkwood, C., (2010). Noroirus. In: SCHULLER M., SLOOTS T., JAMES G., HALLIDAY C., CARTER I., Ed., PCR for Clinical Microbiology, Springer, Dordrecht, pp: 317- 320.

Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., & D'agostino, M., (2012). Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food and environmental virology*, 4(4), 179-191.

Lee, K. B., Lee, H., Ha, S. D., Cheon, D. S., & Choi, C., (2012). Comparative analysis of viral concentration methods for detecting the HAV genome using real-time RT-PCR amplification. *Food and environmental virology*, 4(2), 68-72.

Lund, B. M., & Snowdon, A. L., (2000). Fresh and processed fruits. *The microbiological safety and quality of food*, *1*, 738-758.

Lynch, M. F., Tauxe, R. V., & Hedberg, C. W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology & Infection*, *137*(3), 307-315.

Makary, P., Maunula, L., Niskanen, T., Kuusi, M., Virtanen, M., Pajunen, S., ... & Minh, N. T. (2009). Multiple norovirus outbreaks among workplace canteen users in Finland, July 2006. *Epidemiology & Infection*, *137*(3), 402-407.

Melgaço, F. G., Victoria, M., Corrêa, A. A., Ganime, A. C., Malta, F. C., Brandão, M. L. L., ... & Miagostovich, M. P., (2016). Virus recovering from strawberries: evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *International journal of food microbiology*, 217, 14-19.

Morales-rayas, R., Wolffs, P. F., & Griffiths, M. W., (2010). Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 48-55.

Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G., & Margolis, H. S. (2006). Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clinical microbiology reviews*, *19*(1), 63-79.

Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., ... & van der Giessen, J. (2010). Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International journal of food microbiology*, *139*, S3-S15.

Nygård, K., Andersson, Y., Lindkvist, P., Ancker, C., Asteberg, I., Dannetun, E., ... & Stenqvist, K., (2001). Imported rocket salad partly responsible for increased incidence of hepatitis A cases in Sweden, 2000-2001. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, 6(10), 151-153.

Parada-Fabián, J. C., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Salinas, C., & Quiñones-Ramírez, E. I. (2016). Identification of enteric viruses in foods from Mexico City. *Food and environmental virology*, *8*(3), 215-220.

Pebody, R. G., Leino, T., Ruutu, P., Kinnunen, L., Davidkin, I., Nohynek, H., & Leinikki, P., (1998). Foodborne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emerging problem?. *Epidemiology & Infection*, 120(1), 55-59.

Petrignani, M., Verhoef, L., Van Hunen, R., Swaan, C., Van Steenbergen, J., Boxman I., ... & Koopmans, M., (2010). A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands, January-February 2010. *Eurosurveillance*, 15(11), 19512.

Rao, V. C., And Melnick, J. L., (1986). Environmental biology. In: Cole J. A., Knowles C. J., and Schlessinger D., Ed., Aspects of microbiology, vol. 13., American Society of Microbiology, Washington, D.C.

Rowe, S. L., Tanner, K., & Gregory, J. E., (2009). Hepatitis A outbreak epidemiologically linked to a food handler in Melbourne, Victoria. *Communicable Diseases Intelligence*, 33(1), 46-48.

Rzeżutka, A., D'agostino, M., & Cook, N., (2006). An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits. *International journal of food microbiology*, 108(3), 315-320.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, *17*(1), 7.

Schmid, D., Stüger, H. P., Lederer, I., Pichler, A. M., Kainz-Arnfelser, G., Schreier, E., & Allerberger, F. (2007). A foodborne norovirus outbreak due to manually prepared salad, Austria 2006. *Infection*, *35*(4), 232-239.

Sivapalasingam, S., Barrett, E., Kimura, A., Van Duyne, S., De Witt, W., Ying, M., ... & Reddy, V. (2003). A multistate outbreak of Salmonella enterica Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfestation technology. *Clinical Infectious Diseases*, *37*(12), 1585-1590.

Sobsey, M. D., Shields, P. A., Hauchman, F. H., Hazard, R. L., & Caton, L. W., (1986). Survival and transport of hepatitis A virus in soils, groundwater and wastewater. *Water Science and Technology*, 18(10), 97-106.

Terio, V., Bottaro, M., Pavoni, E., Losio, M. N., Serraino, A., Giacometti, F., ... & Tantillo, G. (2017). Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *International journal of food microbiology*, *249*, 61-65.

Verhoef, L., Boxman, I. L., & Koopmans, M., (2008). Viruses transmitted through the food chain: a review of the latest developments. *Identifying International Foodborne Norovirus Outbreak Events*, 111.

Wadl, M., Scherer, K., Nielsen, S., Diedrich, S., Ellerbroek, L., Frank, C., ... & Koch, J. (2010). Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. *BMC infectious diseases*, *10*(1), 30.

Wheeler, C., Vogt, T. M., Armstrong, G. L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainan, O. V., ... & Lee, T. M., (2005). An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *New England Journal of Medicine*, 353(9), 890-897.

Detection of Some Vegetable-borne Viral Pathogens Using RT-PCR

Georgette Fattal[*(1)], Abdul jalil Ghrewaty[(2)], Fateh Khatib[(3)], and Naim Al-Husein[(1)]

(1). Aleppo research center, General Commission of Scientific Agricultural research (GCSAR), Aleppo, Syria.
(2). Dept. of Biotechnology, Faculty of Technology Engineering, University of Aleppo, Aleppo, Syria.
(3). Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Aleppo, Aleppo, Syria.
(*Corresponding author: Georgette Fattal. E-Mail: Georgettefattal90@gmail.com)

Abstract

Vegetables are one of the most important sources of infection with foodborne viruses, causing several outbreaks around the world. This study aimed to detect Norovirus (NV), Hepatitis A virus (HAV) and Hepatitis E virus (HEV) on vegetables using molecular techniques. Fresh vegetables were sampled from local markets and some fields planted on sides of the Quaiq river in Aleppo on different dates during 2018-2019. The samples were washed with elution buffer, and the viruses were concentrated by a cellulose-positive membrane. Reverse transcription was performed directly into the complementary DNA (cDNA) without RNA extraction. The detection of viruses was carried out using cDNA as a template in the PCR. The results showed that viruses were found on many leafy vegetables during autumn and spring. NV was found in 18.4% of the samples, HAV in 4.1%, and HEV in 2.05%.

Keywords: Molecular detection, foodborne disease, infectious viruses.