Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

چرخش محیطی انتروویروس‌های غیر پولیویی در فاضلابهای شهر تهران در رده‌های کشت سلولی RD و Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-Phase

دکتر محمد کارگر[۱]*، دکتر محبوبه ساریجلو[۲]، دکتر حمیده طباطبایی[۲] ، دکتر فیروز عباسیان[۳]، مهدی کارگر[۱] ، دکتر شهره شاه محمودی[۲]، دکتر کورش هلاکویی نائینی[٤] ، دکتر محمود کریملو[۴] دکتر مهدی ناطق پور[۵]، هما صدیقی[٦]، دکتر رمضانعلی خاوری نژاد[۷] ، دکتر طلعت مختاری آزاد[۲] و دکتر رخشنده ناطق[۲]

چکیده :

انتروویروس‌های انسانی در دستگاه گوارش تکثیر یافته و با دفع از طریق مدفوع وارد فاضلاب می‌شوند.به همین دلیل جداسازی انتروویروس‌ها از فاضلاب یکی از شاخصهای حساس گردش ویروس در اجتماع محسوب می‌شود. بر خلاف نام این ویروس ها بعضی از آنها مانند :کوکساکی‌ویروس‌ها و اکوویروس‌ها بیماریهای تنفسی نیز ایجاد می نمایند. در نتیجه این ویروسها می توانند بیماریهای حاد و یا بدون علایم بالینی را ایجاد نمایند و در موارد ایجاد بیماری، بیش از $۱۰^{۱۰}$ ویروس در هر گرم از مدفوع فرد بیمار دفع می‌شود.

در این پژوهش ۶۳ نمونه از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران با روش grab sample در مدت یک‌سال تهیه شد و با سه روش تیمار مختلف انتروویروس‌های غیر پولیویی در کشتهای سلولی حساس جداسازی گردید. سپس ویروس های جدا شده با استفاده از روش میکرونوترالیزاسیون شناسایی گردید. بیشترین فراوانی انتروویروس‌های جداشده مربوط به انتروویروس های غیر قابل تیپ، E_{11} و E_{25} بود. از ۶۳ نمونه فاضلاب مورد بررسی ۱۳ انتروویروس با روش مستقیم (۲۰/۶۳٪) ، ۲۵ انتروویروس با روش Pellet (۳۹/۶۸٪) و ۲۷ انتروویروس توسط روش تغلیظ Two-Phase (۴۲/۸۵٪) جداسازی شد.

واژگان کلیدی : *انتروویروس‌های غیر پولیویی(NPEV)، فاضلاب، تهران، پایش محیطی*

---

*(عهده دار مکاتبات)

۱. گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم

۲. گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳ . گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن

۴ . گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی ،دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵ . گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ،دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶ . امور نظارت بر کیفیت آب آزمایشگاههای استان تهران

۷ . گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

مقدمه :

انترووویروس‌ها در خانواده پیکورناویریده قرار دارند و شامل: پولیوویروس ها،کوکساکی ویروس های AوB، اکوویروس ها و انترووویروس‌های جدید می باشند. عفونت با این ویروس ها دراغلب موارد بدون علامت بالینی بوده و یا همراه با علایم خفیف و عمومی می‌باشد، ولی این ویروس ها می توانند بیماریهای متعددی مانند: بیماریهای تنفسی، مننژیت، عفونت خونریزی دهندهٔ حاد ملتحمه و بیماریهای گوارشی را ایجاد نمایند (Kew O. and Pallansch M. 2002 ,Tougianidon D. and Botzenhart K. 1998).

ورود انترووویروس‌ها به سیستم عصبی مرکزی ممکن است به صورت فلج شل حاد (AFP) نیز تظاهر نماید. به همین دلیل با وجود این که قدیمی ترین عضو شناخته شده انترووویروس ها یعنی ویروس پولیو در حال ریشه کنی می‌باشد ولی بیماری فلج شل حاد ناشی از سایر انترووویروس‌ها و عوامل دیگر هنوز شایع است.

بر طبق مطالعات انجام شده، میزان دخالت انترووویروس‌ها در علایم سیستم عصبی در کشورهای مختلف از ۱۲ تا ۶۷ ٪ متغیر است و در بعضی از مناطق حتی درصد بیشتری از آن گزارش شده است (Yerly S. 1996).

بالاترین میزان گردش این ویروس ها در کودکان ۲ تا ۹ ساله گزارش شده است. شیوع بیماریهای ناشی از انترووویروس‌ها در افراد مذکر بیشترگزارش شده است (Wyn -jones A.P. and Sewllwood J. 2001). عموماً برای پایش محیطی جمعیتها و شهرهای بزرگتر از سیستم‌های تصفیه فاضلاب استفاده می‌شود، چون که نمایندهٔ مناسبی برای ارزیابی وجود ویروس در محیط می باشد. ولی در جوامعی که به صورت متمرکز سیستم تصفیه فاضلاب وجود ندارد، می‌توان از آبهای سطحی، آبریزها و یا نمونه های مدفوع نیز استفاده نمود . (Baggi F. 2001)

پویری(Poyry) و همکارانش در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که چرخش ویروس پولیو و انترووویروس‌های غیر پولیویی در جمعیت به سهولت از طریق فاضلاب می تواند انجام شود (Poyry T. and Stenvik M. 1998) و از طرفی آنالیز فاضلاب راه مناسبی برای ارزیابی کفایت عملکرد واکسیناسیون با واکسن خوراکی OPV می باشد. در سال ۱۹۹۶، هووی (Hovi) و استن وی کی (Stenvik) و روسن لیو (Rosenlew) با ارزیابی ارتباط فصلی انترووویروس‌های جدا شده از فاضلاب به این نتیجه رسیدند که ویروس‌های کوکساکی CB4 وCB6 ، اکوویروس‌های E11 و E6 و کوکساکی CB2و CB3 به ترتیب غالب‌ترین سروتیپ‌های موجود در فاضلاب می باشند. (Hovi T. 1996)

در مناطق معتدل، عفونت با انترووویروس‌ها انتشار فصلی دارد و معمولاً در اواخر تابستان و اوایل پاییز به اوج خود می‌رسد و در این فصول اپیدمی مننژیت آسپیتیک به ویژه در نوزادان مشاهده می شود.این ویروس ها از طریق مدفوعی- دهانی منتقل می‌شوند و در شرایط فقر بهداشتی و تراکم جمعیت شیوع بیشتری دارند. همچنین در pH خنثی و حرارت پایین به ویژه در حضور مواد محافظت کننده آلی در مدت طولانی به صورت عفونی باقی می مانند .

(Manor A. 1999 , Hovi T. 2001). در آبهای استخر شنا، حتی در نبود کلی فرمهای مدفوعی و دارا بودن حد مجاز کلر آزاد نیز انترووویروس‌ها جداسازی شده اند. فاضلاب اصلی ترین کانون جداسازی انترووویروس ها است و در جوامع با شرایط اقتصادی و اجتماعی پایین که جمعیت زیر ۱۵ سال بیشتری در آن مناطق سکونت دارند، آلودگی فاضلاب با انترووویروس ها نیز بیشتر است. انترووویروس‌های غیرپولیویی طیف وسیعی از عفونتهای حاد و مزمن را ایجاد می کنند، اما متاسفانه

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

هنوز هیچ گونه بررسی اپیدمیولوژیک دقیقی در مورد عفونتهای شایع و همچنین چرخش محیطی انتروویروس‌ها در ایران انجام نشده است. در بسیاری از کشورهای پیشرفته دنیا مانند: آمریکا و کانادا که سالهای طولانی از ریشه کنی فلج اطفال در آنجا می‌گذرد، مرکز ملی پایش انتروویروس ها را دایر نموده اند. وظیفه این مراکز، بررسی مستمر میزان گردش انتروویروس ها در جامعه و ارزیابی زمان و مکان شیوع و تعیین نقش این ویروس‌ها در ایجاد بیماریهای حاد و مزمن است .

هدف از این پژوهش، ارزیابی چرخش محیطی انتروویروس‌های غیر پولیویی (NPEV) در ماههای مختلف سال در فاضلابهای شهر تهران با روشهای مستقیم و دو روش تغلیظ در کشتهای سلولی حساس و شناسایی ویروس‌های جدا شده با روش میکرونوترالیزسیون است .

روش کار :

الف) نمونه گیری: با همکاری شرکت آب و فاضلاب تهران از آذر ماه ۱۳۸۱ تا آبان ماه ۱۳۸۲ از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران با روش grab sample، ۶۳ نمونه تهیه شد. تمامی نمونه ها مربوط به فاضلاب خام (Raw sewage) بودند و از قسمت ورودی فاضلاب (Inffluent) جمع‌آوری شدند.

حجم تمامی نمونه های ارسالی یک لیتر بود و توسط ظروف پلاستیکی در پوش دار به آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز کشوری فلج اطفال(NPL) واقع در انستیتو تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل می‌گردید. در تمامی موارد مشخصات نمونه فاضلاب ارسالی (محل نمونه برداری، تاریخ pH و حرارت نمونه) در پرسشنامه تنظیمی ثبت می‌شد.در انتقال و نگهداری نمونه ها قبل از تلقیح کشت سلولی رعایت زنجیره سرد و نگهداری در حرارت ۴ درجه سانتی گراد انجام می گرفت.

ب) تیمار نمونه ها: نمونه های فاضلاب به صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ رسوبی (Pellet) و روش تغییر یافته Two-Phase مورد بررسی قرار گرفت. برای تغلیظ با روش Pellet ، ۵۰۰ میلی لیتر از فاضلاب تهیه شده را به ۸ لوله پلاستیکی (Nunc) ۵۰ میلی لیتری منتقل و در حرارت ۵ درجه و دور 2000 RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم و سپس رسوب حاصل (Pellet) به دو قسمت مساوی تقسیم و در حرارت ۴ درجه نگهداری شد.

روش Two-Phase ، با استفاده از روش پیشنهادی (هووی) Hovi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ به صورت زیر انجام شد: ۴۰۰ میلی لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفوژ مرحله اول (روش Pellet) را در داخل یک ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و PEG6000 ، ۳۰٪ (Merck) و دکستران ۲۰ ٪ مربوط به باکتری *Leuconostocmesenteroides*(D5376, sigma) و NaCl(Merck) ۵ مولار به ترتیب به میزان: ۱۳۳/۶گرم (W/V ، ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی لیتر (V/V) به آن اضافه گردید و پس از تنظیم pH محلول در دامنهٔ ۷ تا ۸ با سود یک نرمال به مدت یک ساعت روی شیکر (Horizontal shaker) با دور 260 RPM قرار داده شد. سپس محتویات ارلن را به داخل یک قیف جدا کننده (Separation funnel) ۴۰۰ میلی لیتری ریخته و یک شب (Overnight) در یخچال ۴ درجه نگهداری گردید. در مرحله بعد ۵ میلی لیتر از لایه رسوب انتهایی (bottomphase) و لایهٔ تشکیل شده در بین دو فاز (Interphase) جمع‌آوری شد و به یکی از لوله‌هایPellet مرحله قبل اضافه گردید (Hovi . T. 2001 , WHO , 2003).

در مرحله آخر برای از بین بردن باکتریها و قارچها به ۴ میلی لیتر از نمونه مستقیم فاضلاب، رسوب (Pellet) و مخلوط تغلیظ شده (Two -Phase) یک میلی لیتر کلروفرم (Merck) اضافه و ۲۰ دقیقه در دور 200RPM بر روی شیکر لوله قرار دادیم و در نهایت محتویات لوله

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

برای مدت ۱۰ دقیقه در دور2000RPM حرارت ۵ درجه سانتریفیوژ گردید و مایع تیمار شده رویی در کرایو تیوبهای استریل جمع‌آوری شد.

ج)کشت سلولی: از رده های سلولی RD و Hep-2 برای جداسازی انتروویروس هایی غیر پولیویی و از رده سلولی $L_{20}B$ نیز برای بررسی وجود ویروس پولیوی احتمالی در نمونه های مثبت شده سلول RD استفاده شد.

حساسیت رده های سلولی به وسیلهٔ انترویروس‌های موجود در آزمایشگاه تعیین گردید.

برای هر ۳ تیمار یک نمونه فاضلاب، ۶ لوله کشت سلولی RD و Hep-2 در نظر گرفته شد. میزان تلقیح فاضلاب به هر لوله کشت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بود و پس از تلقیح در حرارت ۳۶ درجه به مدت ۷ روز نگهداری گردید . برای مشاهدهCPE هر روز لوله ها با میکروسکوپ (Inverted Microscope) بررسی و نمونه‌های مثبت در حرارت ۲۰- درجه نگهداری می گردید. همچنین پس از۷ روز ، لوله‌های منفی در حرارت ۲۰- درجه فریز شده و پس از گرم کردن در حرارت اتاق (Freeze & Thawing) پاساژ مجدد داده شد.

نمونه های مثبت شده بر رویRD به دلیل احتمال وجود ویروس پولیو به سلول $L_{20}B$ تلقیح گردید.

د) تست نوترالیزاسیون : برای انجام این تست از پلیتهای میکروتیتر (میکرو پلیت) استفاده شد. برای هر ویروس جداشده از آنتی سرم Pooled polio(PP)، آنتی سرمهای کوکساکی ویروس های B_1 تاB_6 (CP)، هفت مجموعه مخلوط آنتی سرمی مربوط به کوکساکی ویروس A9 و۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نامهای A تاG استفاده شد.

نوترالیزاسیون ویروس با آنتی سرمPP ، نشان دهندهٔ ویروس پولیو و خنثی شدن با آنتی سرم CP تأیید کننده وجود ویروس کوکساکی B می‌باشد(WHO.2001)

در مورد اکوویروس ها، هر مجموعه آنتی سرمی (pooled) شامل چندین آنتی بادی علیه انترووویروس های مختلف است و معمولاً نوترالیزاسیون با دو آنتی سرم از مجموعهA تاG صورت می‌گیرد که مطابق جدول راهنمای WHO نوع ویروس مشخص می‌شود. اگر نمونه انترووویروس احتمالی با هیچکدام از آنتی سرمها نوترالیزه نشود، نشان دهندهٔ وجود مخلوطی از چند ویروس و یا وجود انترووویروس غیر قابل تیپ (N.T.E.V) با آنتی سرمهای موجود در کیت است.

ه) شناسایی ویروس پولیو: نمونه های مثبت بر روی سلول RD(ردهٔسلولیHuman habdomosarcoma) به کشت سلولی $L_{20}B$ (ردهٔ سلولی موشی دارای رسپتور اختصاصی ویروس پولیو) تلقیح گردید. مثبت شدن سلول های$L_{20}B$ نشان دهندهٔ وجود ویروس پولیو می باشد و برای تعیین سروتیپ، تست نوترالیزاسیون اختصاصی ویروس پولیو انجام شد و برای تائید آن نیز تست آنتی ژنیک ELISA و ژنومیک پروب هیبریدیزاسیون جهت‌افتراق داخل تیپی (Intratyping) انجام شد (WHO . 2001).

و) تست الایزا: کیت اختصاصی الایزای پولیو (RIVM) توسط سازمان بهداشت جهانی در اختیار آزمایشگاههای فلج اطفال قرار می گیرد . در این تست چاهکهای میکرو پلیت که توسط IgG گاوی ضد پولیوویروس‌های تیپ ۱و۲و۳ پوشیده شده با سوش معین پولیو مجاور می شوند .سپس آنکوباسیون با آنتی سرم‌های خرگوش جذب متقاطع شدهٔ اختصاصی (cross-absorbed)تیپ ادامه می یابد. پس از شستشوی آنتی سرم‌های خرگوش متصل نشده،IgG ضد خرگوش نشان دار شده با پراکسیداز (HRP)اضافه می‌شود تا آنتی سرم‌های خرگوش را شناسایی نماید. در این تست برای تشخیص پولیوی واکسن و وحشی ،برای هر نمونه سه چاهک (A,B وC) در نظر گرفته می شود .در چاهک A

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

آنتی بادی خرگوش ضد پولیو ویروس توتال (که هم با ویروس واکسن و هم با ویروس وحشی واکنش می‌دهد)، در چاهک B آنتی بادی ضد پولیوی وحشی و در چاهک C آنتی بادی ضد پولیوی واکسن ریخته می شود .از چاهک‌های B و Cهر کدام که OD دو برابر و نیم دیگری را داشته باشد، نشان دهندهٔ سوش ویروس مورد نظر است .

ز) تست پروب هیبریدیزاسیون: در این تست از اختلافات موجود در ژنوم ویروس واکسن و وحشی استفاده می شود.پروب مناسب که برای قسمت VP1/2A ویروس واکسن ساخته و نشان دار شده ،برای افتراق بین ویروس واکسن از وحشی به کار می‌رود. هم چنین از پروب دیگری که برای ناحیهٔ غیر قابل ترجمهٔ ۵ ژنوم (5 ŃTR) ساخته شده و در تمامی انتروویروس‌ها حفاظت شده است نیز به عنوان شاهد استفاده می شود .برای انجام تست پروب هیبریدیزاسیون، باید تیتر بالایی از ویروس پولیو (که تیپ آن معلوم شده است) وجود داشته باشد.در این روش RNA ویروس استخراج و بر روی فیلتر قرار داده می شود سپس پروب های نشان دار شده با IG(Digoxigenin) به آن افزوده می شود. پروب‌های باند نشده طی مراحل شستشو خارج و پروب‌های باند شده توسط واکنش آنزیم – سوبسترا شناسایی می گردد. واکنش مثبت به صورت مشاهدهٔ لکهٔ خاکستری مشخص می شود.

ح)آنالیز آماری: آنالیز آماری نتایج به دست آمده با نرم افزار SPSS12 انجام شد.

نتایج:

از آذر ماه سال ۱۳۸۱، تا آبان ماه ۱۳۸۲، از ۶ تصفیه خانه، قیطریه، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش و محلاتی ۶۳ نمونه تهیه گردید.

همان‌گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، بیشترین جمعیت تحت پوشش فاضلاب مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب اکباتان در غرب شهر تهران با جمعیت یک میلیون نفر (۸۴/۲۵٪) و کمترین جمعیت مربوط به صاحبقرانیه در شمال تهران با جمعیت ۷ هزار نفر (۰/۵۹٪) بود. طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی نمونه گیری طوری طراحی شده بود که تقریبا از هر سیستم تصفیه فاضلاب هر ماه یک نمونه تهیه شود. به استثنای تصفیه خانه زرگنده (که به علت تعمیرات ، از خرداد ماه سال ۱۳۸۲ امکان ادامه نمونه گیری از آن محل وجود نداشت) در سایر موارد فراوانی توزیع نمونه برداری یکسان بود (جدول۱).

در جدول شماره۲، مجموع انتروویروس‌های غیر پولیویی جدا شده از واحدهای مورد پژوهش با سه روش مختلف نشان داده شده است. مطابق جدول یاد شده، بین روش جداسازی مستقیم و هر دو روش تغلیظ به استثنای قیطریه و صاحبقرانیه اختلاف معنی داری (در سطح ۰/۰۱) وجود داشت. همچنین میزان جداسازی ویروس در تمامی واحدهای مورد پژوهش به استثنای تصفیه‌خانه‌های قیطریه و شوش در هر دو روش تغلیظ Pellet و Two-Phase با هم برابر بود. در مورد تصفیه‌خانه‌های قیطریه و شوش نیز بین دو روش تغلیظ یاد شده اختلاف معنی داری وجود نداشت .

بیشترین فراوانی انتروویروس‌های جدا شده مربوط به N.T.E.V، E_{11} و E_{25} بود. ویروس کوکساکی B، تنها در ردهٔ سلولی Hep-2 و فقط با روش Pellet جداسازی گردید. همچنین مطابق نمودار شمارهٔ۱، میزان جداسازی انتروویروس های غیر پولیویی با هر دو روش تغلیظ در ردهٔ سلولی Hep-2 یکسان بود. اما در ردهٔ سلولی RD میزان جداسازی انتروویروس های غیر پولیویی با روش Two-Phase ، اختلاف معنی داری را در سطح ۰/۰۱ با روش Pellet نشان داد. در نمودار شمارهٔ ۲ فراوانی جداسازی انتروویروس های غیر پولیویی در فصول مختلف سال نشان داده شده است. میزان جداسازی انتروویروس های غیر پولیویی با هر سه روش در فصول بهار و پاییز تقریباً برابر

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

بود .همچنین میزان جداسازی در فصول تابستان و زمستان الگوی مشابهی را نشان داد . اما به طور کلی بین جداسازی انتروویروس ها ، ماه‌ها و فصول مختلف سال ارتباط معنی داری مشاهده نشد .

در این پژوهش ، جهت ارزیابی ارتباط درجهٔ حرارت و جداسازی انتروویروس‌ها، در تمامی نمونه های مورد بررسی درجه حرارت اندازه گیری شد. دامنهٔ درجه حرارت تمامی نمونه های مورد بررسی بین ۱۲ تا ۳۰درجه سانتی گراد بود. بیشترین فراوانی مربوط به حرارت ۲۱ درجه سانتی گراد (با فراوانی ۱۴/۳٪) و کمترین فراوانی حرارت نمونه ، ۱۲ ،۲۷و ۳۰ درجه (با فراوانی ۱/۶٪) بود . اما با این وجود آنالیز آماری نشان داد که در سطح ۰/۰۱و۰/۰۵ بین درجه حرارت نمونه و جداسازی انتروویروس‌ها ارتباط معنی داری وجود ندارد. نکته جالب توجه جداسازی ۳۳/۳ ٪ از انتروویروس‌های غیر پولیویی جدا شده از تصفیه خانه شوش با جمعیت تحت پوشش ۱۰۰/۰۰۰ نفر (۸/۴۲٪) بود. با آزمون آنالیز واریانس(ANOVA) و سپس HOC Post مشخص شد که این میزان جداسازی اختلاف معنی‌داری را با سایر تصفیه خانه ها نشان می دهد (۰/۳۵ =P). با توجه به قرار گرفتن سیستم تصفیه فاضلاب شوش در جنوب شهر تهران و سطح پایین تر بهداشتی و اقتصادی ساکنین این منطقه، نتایج به دست آمده دور از انتظار نمی باشد.

بحث:

هر آبی که در معرض فاضلاب قرار گیرد و همچنین آبهای سطحی، زیر زمینی و آبهای لوله کشی پتانسیل آلودگی با انتروویروس ها را دارند. در مطالعات انجام شده در ژاپن مشخص شده که انتروویروس های E_6 و E_{17} و CB_5 در سال ۱۹۹۱ و E_{11} و E_{25} ، E_{71} و E_9 در سال ۲۰۰۰ و E_{11} و CB_5 در سال ۲۰۰۱ نقش اصلی را در ایجاد اپیدمی مننژیت آسپتیک در این کشور داشته اند (IASR.2002).با توجه به جداسازی انتروویروس های N.T.E.V ، E_{11} و E_{25} در این پژوهش ضرورت بررسیها و مطالعات بیشتر در مورد ارتباط بیماریهای ناشی از انتروویروس ها و ارتباط آنها با چرخش محیطی در فواصل زمانی کوتاه تر در شهر تهران وشهرهای دیگر کشور پیشنهاد می شود.

روشهای متداول سیستم های تصفیه فاضلاب برای از بین بردن باکتری های پاتوژن ، در حذف انتروویروسها ناکارآمد می باشند. (Tougianidon D. and Botzenhart k. 1998) از طرفی به دلیل مقاومت نسبی انتروویروس ها به کلر، ضرورت انجام مطالعات پایه در جهت طراحی سیستم های کارآمدتر تصفیه پیشنهاد می‌گردد.

معیار موفقیت آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مراحل آخر ریشه کنی فلج اطفال تشخیص انتروویروس های غیر پولیویی در نمونه های فاضلاب می‌باشد . مطابق بولتن ارائه شده توسطWHO در سال ۲۰۰۳ حداقل ۳۰٪ از نمونه های فاضلاب تغلیظ شده از یک grab sample بایستی واجد انتروویروس های غیر پولیویی (NPEV) باشند. از۶۳ نمونه فاضلاب مورد بررسی ۱۳ انتروویروس غیر پولیویی با روش مستقیم(۲۰/۶۳٪) ، ۲۵ انتروویروس غیر پولیویی با روش Pellet (۳۹/۶۸٪) و ۲۷ انتروویروس از روش تغلیظ Two -Phase (۴۲/۸۵٪) جداسازی شد، که نشان دهندهٔ کیفیت مناسب نمونه گیری و کارآیی هر دو روش تغلیظ Pellet و Two-Phase برای جداسازی انتروویروس ها می‌باشد. بدین ترتیب ما برای اولین بار با معرفی روش تغلیظPellet ثابت نمودیم که این روش نیز کارآیی لازم را جهت پایش محیطی دارد . همچنین دراین روش نیازی به استفاده از مواد گران قیمت دکستران و PEG نیز وجود ندارد و به دلیل کاهش هزینه و زمان پژوهش می توان با این روش نمونه‌های بیشتری را بررسی و تغلیظ نمود. از طرفی این مساله می تواند نشان دهندهٔ

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

جذب مقادیر متنابهی از انتروویروس‌ها به ذرات جامد موجود در فاضلاب باشد .مطالعات انجام شده به وسیلهٔ رینولدز (Reynolds) و همکارانش درسال ۱۹۹۶ در مورد جذب انتروویروس‌ها به ذرات جامد موجود در فاضلاب نشان داد که این ویروس ها پس از جذب شدن به ذرات جامد فاضلاب ویژگی عفونت زایی خود را حفظ می نمایند. همچنین این نتایج در مدیریت لجن تهیه شده از فاضلاب نیز حایز اهمیت است. گذشته از این با توجه به متفاوت بودن نوع و تعداد انتروویروس‌های جدا شده با این دو روش دربعضی از موارد، پیشنهاد می شود که جهت افزایش کارآیی تغلیظ از هر دو روش به صورت همزمان استفاده شود. از نظر تئوری قدرت تغلیظ روش Two –Phase بین ۵۰ تا ۱۰۰برابر است (WHO. 2003 , Hovi) T. 2001). با توجه به نتایج تغلیظ نسبتاً برابر دو روش Pelletو Two–Phase می توان تصور کرد که با استفاده از روش Pellet، حداقل نمونه های فاضلاب ۵۰ تا ۱۰۰برابر تغلیظ می گردد. در این تحقیق مشابه با نمونه های کلینیکی از نمونه های مثبت شده بر روی RD به L_{20} B تلقیح گردید. این کار موجب می‌شود که ویروس های پولیو با تیتر پایین را بتوان شناسایی نمود. در ۴ مورد پس از پاساژ از RD به سلول $L_{20}B$ (دارای رسپتور اختصاصی ویروس پولیو) ویروس پولیوی SL

(Sabin Like)جدا شد (دو مورد PIII، یک مورد PI و یک مورد هم PII). در این حالت پس از شناسایی ویروس های پولیو درسلول $L_{20}B$ با تست نوترالیزاسیون اختصاصی ،سروتیپ ویروس پولیو وبا تست های افتراق داخل تیپی ELISA و هیبریزیداسیون، واکسن ویا وحشی بودن سویه های جداشده تعیین گردید . سپس با خنثی سازی ویروس پولیوی تعیین تیپ شده با آنتی سرم اختصاصی، مجددا برای شناسایی انتروویروس های غیر پولیویی تست نوترالیزاسیون گذاشته شد. به این ترتیب در نمونه های مخلوط توانستیم چند نوع انتروویروس را شناسایی نماییم.

اغلب انتروویروس ها می توانند با تکثیر در سلول‌های انسانی اثرات CPE قابل تشخیص با میکروسکوپ را ایجاد نمایند ولی برای تایید نتایج منفی حداقل باید به مدت دو هفته بررسی ادامه یابد. به همین دلیل استفاده از کشت سلولی زمان بر و پر هزینه است. روش سریعتر و حساس تر، استفاده از تکنیک های مولکولی است. به وسیلهٔ PCR می‌توان ویروس را در محلول های دارای میزان کمتر از یک PFU شناسایی نمود (TSAIA. 1993).

اصلی ترین مشکل روش یاد شده جهت شناسایی انتروویروس‌ها وجود بازدارنده آلی تخریب کنندهٔ ژنوم ویروس در فاضلاب است. شی یه (Shieh) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ استفاده از ترکیب گوانیدین ایزوتیوسیانات (GIT) برای حذف بازدارنده های آلی موجود در فاضلاب پیشنهاد نمودند. (Shieh Y-S.C. and wait D. 1995) به طور کلی برای حذف بازدارنده های آلی روشهای زیادی پیشنهاد شده است، اما اکثر این روشها فاقد حساسیت لازم برای انجام تست PCR می باشند. همچنین با روشPCR نمی توان بین انتروویروس های عفونی و غیرعفونی افتراق قایل شد. رینولدز (Reynolds) و همکارانش در سال ۱۹۹۶ و سپس در سال ۲۰۰۴ با استفادهٔ ترکیبی و همزمان روش کشت سلولی در یک دورهٔ کوتاه ۲۵ ساعته و سپس RT-PCR را برای به حداقل رساندن بازدارنده های موجود در فاضلاب پیشنهاد نمودند. به همین دلیل با توجه به نتایج این پژوهش، به منظور تشخیص انتروویروس های عفونی تغلیظ شده، استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و PCR جهت ارزیابی دقیق تر روش تغلیظ Pellet و مقایسهٔ آن با نتایج کشت سلولی پیشنهاد می گردد . (Metcalf T.C. 1995, Reynolds K. 1996)

امید است که ما با پژوهش بنیادی در مورد انتروویروس ها بتوانیم درک عمیق تری از اتیولوژی،

بیماریزایی، شیوع و گسترش این ویروس ها در مناطق مختلف کشور به دست آوریم.

تشکر و قدردانی :

این پژوهش به شماره طرح ط ۲۴۱/۸۲/۶۶ با حمایت مالی قطب علمی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است همچنین نویسندگان این مقاله. از جناب آقای مهندس عباس حاج حریری، سرکار خانم مهندس نشاط مجد و سرکار خانم مهرنوش مطلبی در حوزه معاونت نظارت بر بهره برداری فاضلاب استان تهران و امور نظارت بر کیفیت آب آزمایشگاههای استان تهران صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

جدول ۱: فراوانی مطلق و نسبی واحدهای مورد پژوهش بر حسب جمعیت ومحل نمونه گیری

سال نمونه گیری / محل نمونه گیری	جمعیت یا ظرفیت اسمی (به نفر)		سال ۱۳۸۱		سال۱۳۸۲		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
قیطریه	۲۰/۰۰۰	۱/۶۸	۴	۱۶	۷	۱۸/۵	۱۱	۱۷/۵
زرگنده	۳۰/۰۰۰	۲/۵۳	۴	۱۶	۱	۲/۶۳	۵	۷/۹
صاحبقرانیه	۷/۰۰۰	۰/۵۹	۴	۱۶	۷	۱۸/۴۲	۱۱	۱۷/۵
اکباتان	۱۰/۰۰۰/۰۰۰	۸۴/۲۵	۴	۱۶	۷	۱۸/۴۲	۱۱	۱۷/۵
شوش	۱۰۰/۰۰۰	۸/۴۲	۶	۲۴	۷	۱۸/۴۲	۱۳	۲۰/۶
محلاتی	۳۰/۰۰۰	۲/۵۳	۳	۱۲	۹	۲۳/۶۸	۱۲	۱۹/۰
جمع	۱/۱۸۷/۰۰۰	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۳۸	۱۰۰	۶۳	۱۰۰

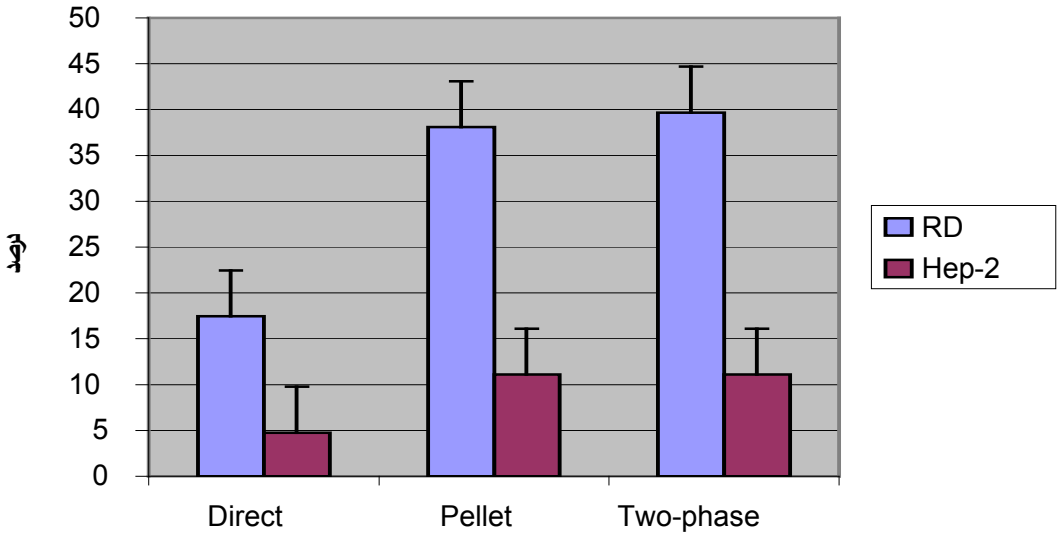
جدول ۲: انترویروس‌های غیر پولیویی (NPEV) جدا شده با سه روش مختلف از واحدهای مورد پژوهش

ویروس جدا شده / واحد	مستقیم		تغلیظ Pellet		تغلیظ Two-Phase	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
قیطریه	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	۳	۴/۷۶
زرگنده	-	-	۳	۴/۷۶	۳	۴/۷۶
صاحبقرانیه	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷
اکباتان	۱	۱/۵۹	۴	۶/۳۵	۴	۶/۳۵
شوش	۴	۶/۳۵	۸	۱۲/۷۰	۹	۱۴/۲۹
محلاتی	۴	۶/۳۵	۶	۹/۵۲	۶	۹/۵۲
جمع	۱۳	۲۰/۶۳	۲۵	۳۹/۶۸	۲۷	۴۲/۸۵

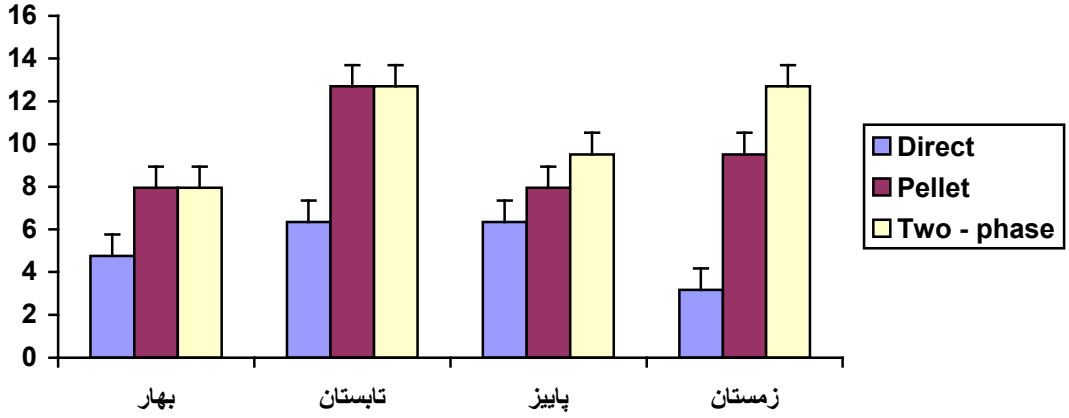
Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

نمودار ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی

انتروویروس‌های غیرپولیویی



نمودار-۲: توزیع فراوانی مطلق و نسبی انتروویروس‌های غیر پولیویی بر حسب فصل در۳ روش مختلف



Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

منابع :

Baggi F. (2001), Persistence of viral Pathogens and bacterioghages during sewage treatment Res. *Microbiol*, 152: 743-751.

Hovi T. (1996), Relative Abundance of Enterovirus Serotypes in Sewage Differ From That in Patients: Clinical and Epidemiologic Implications, *Epidemiol Infect, FEBs* , **116** (1): 91 –97.

Hovi T. (2001), Poliovirus Surveillance by Examining Sewage Specimen, *Epidemiol. Infec*,127: 101-106.

IASR (2002) The trend of enterovirns isolation in association with aseptic meningitis, 1999-2002,See information: http:// idsc.nih.go. 193-194.

Kew O. and Pallansch M. (2002), The Mechanism of Poliovirns Eradication, Molecular Biology of Picornaviruses, *ASM Press*, 484-491.

Manor A. (1999), Detection of Poliovirus Circulation by Environmental Survillance in The Absense of clinical cases in Israil & The Palestinan Authority, *J.of clinical Microbiology*, V(**6**), June, 1670-1979.

Metcalf T.G. (1995), Environmental Virology: From Detection of virus in sewage and water by Isolation to Identification by Molecular Biology, *ANN,REV, MICROBIOL,***49**:461-487.

Poyry T. and Stenvik M. (1988), Virus in sewage waters during and after a Poliomye litis out break and subsquent natione wide oral poliovirus vaccination campain in Finland, *Applied An Envirom mental Microbiology*, **54**: 371-374.

Reynolds K. (1996), Detection of infectious enterviruses by integrated cell culture – PCR procedure, Appl. *Envirom. Microbiol*, **62**: 1424-6.

Shieh Y-S.c. and Wait D. (1995),Methods to remove in hibitors in sewage and other fecal waste for enterovirus detection by PCR, *J.of virological Methods*, **54**: 51-66.

Tougianidon D. and Botzenhart k. (1998), Molecular techniques for the detection of enterovirnses in water, OECD Workshop Molecular Methods for safe Drinking Water, P:1-4.

WHO(2001),Department of vaccines and Biological, *Polio Laboratory Manual*, 1-132.

WHO/V/03.03(2003), Guideline for environmental Surveillance of Poliovirns Circulation, Vaccines and Biologicals1-19.

Wyn–Jones A.P. and Sewllwood J. (2001), Enteric Virneses In the Aquatic environment, **91**: 945-962.

Yerly S. (1996) Rapid and Sensitive detection of enteroviruses in Specimens From Patients with Aseptic Meningitis, *J.clinic. Microbiol*, **34**(1), 199-201.

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018

A SURVEY ON NON- POLIO ENTEROVIRNSES (NPEVs) CIRCULTION IN SEWAGE SYSTEM OF TEHRAN BY RD AND HEP -2 CELL LINES USING DIRECT, PELLET AND TWO – PHASE METHODS

Kargar M.,*[1] ph.D; Sarijlou M[2]., ph.D; Tabatabaei H[2]., ph.D; Abbassian F[3]., ph.D; Kargar M.,[1] B.Sc; Shahmahmoodi Sh. [2] ,ph.D; Holakouie Naieni K[4]., ph.D; Karimlo M., ph.D; Nateghpour M[5]., ph.D; Sedighi H[6]., M.Sc; Khavarinegad R[7]., ph.D; Mokhtari T[2]., ph.D; Nategh R[2]., ph.D.

Human Enteroviruses replicate in gastrointestinal tract and are excreted to the sewage system through feces, so isolation of Enteroviruses from sewage can be considered as a sensitive indicator for virus cirulation in society. They are originally given the name of Enteroviruses, but the inadequacy of this term became apparent when some Coxackie and Echoviruses were also found in acute respiratory infections. Therefore, these viruses can produce acute or paraclinical infecions, the shedding of virus is more than 1010 virus per each gram of feaces.

In this study, 63 sewage samples were obtained from the 6 main sewage disposal systems in Tehran by grab sampling: Direct, Pellet, Two–phase methods in 2 sensitive cell lines (Hep2 & RD) and neutralization test were used to determine Enterovirus circulation in one year. None-Typable Enteroviruses, E11 and E25 were isolated more frequently than other Entroviruses. Out of 63 sewege specimens, we isolated 13 (20.63%), 25 (39.68%) & 27 (42.83%) Enteroviruses by Direct, Pellet and Two-phase methods respectively.

Key Words: *Non-Polio Enteroviruses (NPEV), Sewage, Tehran, Environmental Surveillance.*

---

*. (Author to whom all correspondance should be addressed).
1.Department of Microbiology, Jahrom Azad university, Jahrom.
2.Department of Virology, School of Public Health Tehran University, Tehran.
3.Department of Microbiology, Tonekabon Azad Unversity, Tonkabon.
4.Department of Epidemiology and Biostatistices, School of Public Health Tehran University.
5. Department of Parasitology, School of Public Health Tehran University, Tehran..
6. Laboratory of Water Quality in Tehran Provnice, Tehran.
7.Department of Biology, Tarbeit Moalem University,Tehran.

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 3:52 IRST on Saturday February 24th 2018