

چرخش محیطی انتروویروس‌های غیر پولیوی 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^۴، دکتر محمود کریملو^۴ دکتر مهدی ناطق پور^۵، هما صدیقی^۶، 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 ویروس‌ها بعضی از آنها مانند: کوکساکسی ویروس‌ها و اکوویروس‌ها بیماریهای تنفسی نیز ایجاد می‌نمایند. در نتیجه این ویروسها می‌توانند بیماریهای حاد و یا بدون علائم 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 پولیوی در کشتهای سلولی حساس جداسازی گردید. سپس ویروس‌های جدا شده با استفاده از روش میکرونوترالیزاسیون شناسایی گردید. بیشترین فراوانی انتروویروس‌های جدا شده مربوط به انتروویروس‌های غیر قابل تیپ، E11 و E25 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 پولیوی (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

مقدمه :

انتروویروس‌ها در خانواده پیکورناویریده قرار دارند و شامل: پولیوویروس‌ها، کوکساکسی ویروس‌های A و B، اکوویروس‌ها و انتروویروس‌های جدید می‌باشند. عفونت با این ویروس‌ها در اغلب موارد بدون علامت بالینی بوده و یا همراه با علائم خفیف و عمومی می‌باشد، ولی این ویروس‌ها می‌توانند بیماریهای متعددی مانند: بیماریهای تنفسی، مننژیت، عفونت خونریزی دهنده حاد ملتحمه و بیماریهای گوارشی را ایجاد نمایند (Kew O. and Pallansch M. 2002, Toungianidon D. and Botzenhart K. 1998).

ورود انتروویروس‌ها 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 انتروویروس‌ها یعنی ویروس پولیو در حال ریشه کنی می‌باشد ولی بیماری فلج شل حاد ناشی از سایر انتروویروس‌ها و عوامل دیگر هنوز شایع است. بر طبق مطالعات انجام شده، میزان دخالت انتروویروس‌ها در علائم 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 ویروس‌ها در کودکان ۲ تا ۹ ساله گزارش شده است. شیوع بیماریهای ناشی از انتروویروس‌ها در افراد مذکر بیشتر گزارش شده است (Wyn-jones A.P. and Sewillwood J. 2001). عموماً برای پایش محیطی جمعیتها و شهرهای بزرگتر از سیستم‌های تصفیه فاضلاب استفاده می‌شود، چون که نماینده مناسبی برای ارزیابی وجود ویروس در محیط می‌باشد. ولی در جوامعی که به صورت متمرکز سیستم تصفیه فاضلاب وجود ندارد، می‌توان از آبهای سطحی، آبریزها و یا نمونه‌های مدفوع نیز استفاده نمود.

(Baggi F. 2001)

پویری (Poyry) و همکارانش در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که چرخش ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیر پولیویی در جمعیت به سهولت از طریق فاضلاب می‌تواند انجام شود (Poyry T. and Stenvik M. 1998) و از طرفی آنالیز فاضلاب راه مناسبی برای ارزیابی کفایت عملکرد واکسیناسیون با واکسن خوراکی OPV می‌باشد. در سال ۱۹۹۶، هووی (Hovi) و استن وی کی (Stenvik) و روسن لیو (Rosenlew) با ارزیابی ارتباط فصلی انتروویروس‌های جدا شده از فاضلاب به این نتیجه رسیدند که ویروس‌های کوکساکسی CB4 و CB6، اکوویروس‌های E11 و E6 و کوکساکسی CB2 و CB3 به ترتیب غالب‌ترین سروتیپ‌های موجود در فاضلاب می‌باشند. (Hovi T. 1996)

در مناطق معتدل، عفونت با انتروویروس‌ها انتشار فصلی دارد و معمولاً در اواخر تابستان و اوایل پاییز به اوج خود می‌رسد و در این فصول اپیدمی مننژیت آسپتیک به ویژه در نوزادان مشاهده می‌شود. این ویروس‌ها 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 می‌مانند.

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

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 انتروویروس‌ها را دایر نموده اند. وظیفه این مراکز، بررسی مستمر میزان گردش انتروویروس‌ها 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 پولیوی (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 نمونه‌ها مربوط به فاضلاب خام (Raw sewage) بودند و از قسمت ورودی فاضلاب (Influent) جمع‌آوری شدند.

حجم تمامی نمونه‌های 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 نمونه‌ها قبل از تلقیح کشت سلولی رعایت زنجیره سرد و نگهداری در حرارت ۴ درجه سانتی گراد انجام می‌گرفت.

ب) تیمار نمونه‌ها: نمونه‌های 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 سانتریفیوژ مرحله اول (روش Pellet) را در داخل یک ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و PEG6000، ۳۰٪ (Merck) و دکستران ۲۰٪ *Leuconostocmesenteroides* مربوط به باکتری (D5376, sigma) و NaCl (Merck) ۵ مولار به ترتیب به میزان: ۱۳۳/۶ گرم (W/V)، ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی لیتر (V/V) به آن اضافه گردید و پس از تنظیم pH محلول در دامنه 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 لایه تشکیل شده در بین دو فاز (Interphase) جمع‌آوری شد و به یکی از لوله‌های Pellet 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

برای مدت ۱۰ دقیقه در دور 2000RPM حرارت ۵ درجه سانتیفریوژ گردید و مایع تیمار شده رویی در کرایو تیوبهای استریل جمع آوری شد.

ج) کشت سلولی: از رده های سلولی RD و Hep-2 برای جداسازی انتروویروس هایی غیر پولیوی و از رده سلولی L20B نیز برای بررسی وجود ویروس پولیوی احتمالی در نمونه های مثبت شده سلول RD استفاده شد. حساسیت رده های سلولی به وسیله انتروویروس های 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 مشاهده CPE هر روز لوله ها با میکروسکوپ (Inverted Microscope) بررسی و نمونه های مثبت در حرارت ۲۰- درجه نگهداری می گردید. همچنین پس از ۷ روز، لوله های 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 روی RD به دلیل احتمال وجود ویروس پولیو به سلول L20B تلقیح گردید.

د) تست نوترالیزاسیون: برای انجام این تست از پلیتهای میکروتیتر (میکرو پلیت) استفاده شد. برای هر ویروس جدا شده از آنتی سرم Pooled polio (PP)، آنتی سرمهای کوکساکسی ویروس های B₁ تا B₆ (CP)، هفت مجموعه مخلوط آنتی سرمی مربوط به کوکساکسی ویروس A9 و ۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نامهای A تا G استفاده شد.

نوترالیزاسیون ویروس با آنتی سرم PP، نشان دهنده ویروس پولیو و خنثی شدن با آنتی سرم CP تأیید کننده وجود ویروس کوکساکسی B می باشد (WHO.2001)

در مورد اکوویروس ها، هر مجموعه آنتی سرمی (pooled) شامل چندین آنتی بادی علیه انتروویروس های مختلف است و معمولاً نوترالیزاسیون با دو آنتی سرم از مجموعه A تا G صورت می گیرد که مطابق جدول راهنمای WHO نوع ویروس مشخص می شود. اگر نمونه انتروویروس احتمالی با هیچکدام از آنتی سرمها نوترالیزه نشود، نشان دهنده وجود مخلوطی از چند ویروس و یا وجود انتروویروس 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 (رده سلولی Human habdomosarcoma) به کشت سلولی L20B (رده سلولی موشی دارای رسپتور اختصاصی ویروس پولیو) تلقیح گردید. مثبت شدن سلول های L20B نشان دهنده وجود ویروس پولیو می باشد و برای تعیین سروتیپ، تست نوترالیزاسیون اختصاصی ویروس پولیو انجام شد و برای تأیید آن نیز تست آنتی ژنیک ELISA و ژنومیک پروب هیبریدیزاسیون جهت افتراق داخل تیبی (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 پولیو ویروس های تیپ ۱ و ۲ پوشیده شده با سوش معین پولیو مجاور می شوند. سپس آنکوآسیون با آنتی سرمهای خرگوش جذب متقاطع شده 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 می شود تا آنتی سرمهای خرگوش را شناسایی نماید. در این تست برای تشخیص پولیوی واکسن و وحشی، برای هر نمونه سه چاهک (A, B, C) در نظر گرفته می شود. در چاهک A

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 می‌شود. از چاهک‌های B و C هر کدام که OD دو برابر و نیم دیگری را داشته باشد، نشان دهنده سوش ویروس مورد نظر است.

ز) تست پروب هیبریدیزاسیون: در این تست از اختلافات موجود در ژنوم ویروس واکسن و وحشی استفاده می‌شود. 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 ناحیه غیر قابل ترجمه ۵ ژنوم (5 NTR) ساخته شده و در تمامی انتروویروس‌ها حفاظت شده است نیز به عنوان شاهد استفاده می‌شود. برای انجام تست پروب هیبریدیزاسیون، باید تیترا 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 می‌شود سپس پروب‌های نشان دار شده با (Digoxigenin)IG به آن افزوده می‌شود. پروب‌های باند نشده طی مراحل شستشو خارج و پروب‌های باند شده توسط واکنش آنزیم - سوبسترا شناسایی می‌گردد. واکنش مثبت به صورت مشاهده لکه خاکستری مشخص می‌شود.

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، قیطره، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش و محلاتی ۶۳ نمونه تهیه گردید.

همان گونه 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 تقریباً 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 (جدول ۱).

در جدول شماره ۲، مجموع انتروویروس‌های غیر پولیوی 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 قیطره و صاحبقرانیه اختلاف معنی داری (در سطح ۰/۰۱) وجود داشت. همچنین میزان جداسازی ویروس در تمامی واحدهای مورد پژوهش به استثنای تصفیه‌خانه‌های قیطره و شوش در هر دو روش تغلیظ Pellet و Two-Phase با هم برابر بود. در مورد تصفیه‌خانه‌های قیطره و شوش نیز بین دو روش تغلیظ یاد شده اختلاف معنی داری وجود نداشت.

بیشترین فراوانی انتروویروس‌های جدا شده مربوط به E11، N.T.E.V و E25 بود. ویروس کوکساکسی B، تنها در رده سلولی Hep-2 و فقط با روش Pellet جداسازی گردید. همچنین مطابق نمودار شماره ۱، میزان جداسازی انتروویروس‌های غیر پولیوی با هر دو روش تغلیظ در رده سلولی Hep-2 یکسان بود. اما در رده سلولی RD میزان جداسازی انتروویروس‌های غیر پولیوی با روش Two-Phase، اختلاف معنی داری را در سطح ۰/۰۱ با روش Pellet نشان داد. در نمودار شماره ۲ فراوانی جداسازی انتروویروس‌های غیر پولیوی در فصول مختلف سال نشان داده شده است. میزان جداسازی انتروویروس‌های غیر پولیوی با هر سه روش در فصول بهار و پاییز تقریباً برابر

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 درجه حرارت و جداسازی انتروویروسها، در تمامی نمونه های مورد بررسی درجه حرارت اندازه گیری شد. دامنه درجه حرارت تمامی نمونه های مورد بررسی بین ۱۲ تا ۳۰ درجه سانتی گراد بود. بیشترین فراوانی مربوط به حرارت ۲۱ درجه سانتی گراد (با فراوانی ۱۴/۳٪) و کمترین فراوانی حرارت نمونه، ۱۲، ۲۷ و ۳۰ درجه (با فراوانی ۱/۶٪) بود. اما با این وجود آنالیز آماری نشان داد که در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ بین درجه حرارت نمونه و جداسازی انتروویروسها ارتباط معنی داری وجود ندارد. نکته جالب توجه جداسازی ۳۳/۳٪ از انتروویروسهای غیر پولیوی 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 معنی داری 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 انتروویروسها را دارند. در مطالعات انجام شده در ژاپن مشخص شده که انتروویروسهای E₆ و E₁₇ و CB₅ در سال ۱۹۹۱ و E₁₁ و E₂₅، E₇₁ و E₉ در سال ۲۰۰۰ و E₁₁ و CB₅ در سال ۲۰۰۱ نقش اصلی را در ایجاد اپیدمی منتزیت آسپتیک در این کشور داشته اند

(IASR.2002). با توجه به جداسازی انتروویروس های E₁₁، N.T.E.V و E₂₅ در این پژوهش ضرورت بررسیها و مطالعات بیشتر در مورد ارتباط بیماریهای ناشی از انتروویروسها و ارتباط آنها با چرخش محیطی در فواصل زمانی کوتاه تر در شهر تهران و شهرهای 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 انتروویروسها به کلر، ضرورت انجام مطالعات پایه در جهت طراحی سیستم های کارآمدتر تصفیه پیشنهاد می گردد.

معیار موفقیت آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مراحل آخر ریشه کنی فلج اطفال تشخیص انتروویروس های غیر پولیوی در نمونه های فاضلاب می باشد. مطابق بولتن ارائه شده توسط WHO در سال ۲۰۰۳ حداقل ۳۰٪ از نمونه های فاضلاب تغلیظ شده از یک grab sample بایستی واجد انتروویروس های غیر پولیوی (NPEV) باشند. از ۶۳ نمونه فاضلاب مورد بررسی ۱۳ انتروویروس غیر پولیوی با روش مستقیم (۲۰/۶۳٪)، ۲۵ انتروویروس غیر پولیوی با روش Pellet (۳۹/۶۸٪) و ۲۷ انتروویروس از روش تغلیظ Two-Phase (۴۲/۸۵٪) جداسازی شد، که نشان دهنده کیفیت مناسب نمونه گیری و کارایی هر دو روش تغلیظ Pellet و Two-Phase برای جداسازی انتروویروسها می باشد. بدین ترتیب ما برای اولین بار با معرفی روش تغلیظ Pellet ثابت نمودیم که این روش نیز کارایی لازم را جهت پایش محیطی دارد. همچنین در این 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 نمونه های بیشتری را بررسی و تغلیظ نمود. از طرفی این مساله می تواند نشان دهنده

جذب مقادیر متناهی از انتروویروس‌ها به ذرات جامد موجود در فاضلاب باشد. مطالعات انجام شده به وسیله رینولدز (Reynolds) و همکارانش در سال ۱۹۹۶ در مورد جذب انتروویروس‌ها به ذرات جامد موجود در فاضلاب نشان داد که این ویروس‌ها پس از جذب شدن به ذرات جامد فاضلاب ویژگی عفونت زایی خود را حفظ می‌نمایند. 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 در بعضی از موارد، پیشنهاد می‌شود 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 ۱۰۰ برابر است (WHO, 2003, Hovi T. 2001). با توجه به نتایج تغلیظ نسبتاً برابر دو روش Pellet و Two-Phase می‌توان تصور کرد که با استفاده از روش Pellet، حداقل نمونه‌های فاضلاب ۵۰ تا ۱۰۰ برابر تغلیظ می‌گردد. در این تحقیق مشابه با نمونه‌های کلینیکی از نمونه‌های مثبت شده بر روی RD به L₂₀B تلقیح گردید. این کار موجب می‌شود که ویروس‌های پولیو با تیتراژ پایین را بتوان شناسایی نمود. در ۴ مورد پس از پاساژ از RD به سلول L₂₀B (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 ویروس‌های پولیو در سلول L₂₀B با تست نوترالیزاسیون اختصاصی، سروتیپ ویروس پولیو و با تست‌های افتراق داخل‌تیپی ELISA و هیبریزیداسیون، واکسن ویا وحشی بودن سویه‌های جدا شده تعیین گردید. سپس با خنثی‌سازی ویروس پولیوی تعیین تیپ شده با آنتی‌سرم اختصاصی، مجدداً برای شناسایی انتروویروس‌های غیر پولیوی تست نوترالیزاسیون گذاشته شد. به این ترتیب در

نمونه‌های مخلوط توانستیم چند نوع انتروویروس را شناسایی نماییم.

اغلب انتروویروس‌ها می‌توانند 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 زمان‌بر و پرهزینه است. روش سریعتر و حساس‌تر، استفاده از تکنیک‌های مولکولی است. به وسیله PCR می‌توان ویروس را در محلول‌های دارای میزان کمتر از یک PFU شناسایی نمود (TSAIA, 1993).

اصلی‌ترین مشکل روش یاد شده جهت شناسایی انتروویروس‌ها وجود بازدارنده آلی تخریب‌کننده ژنوم ویروس در فاضلاب است. شی‌یه (Shieh) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ استفاده از ترکیب گوانیدین ایزوتوسیانات (GIT) برای حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب پیشنهاد نمودند. (Shieh Y-S.C. and wait D. 1995) به طور کلی برای حذف بازدارنده‌های آلی روش‌های زیادی پیشنهاد شده است، اما اکثر این روش‌ها فاقد حساسیت لازم برای انجام تست PCR می‌باشند. همچنین با روش PCR نمی‌توان بین انتروویروس‌های عفونی و غیرعفونی افتراق قایل شد. رینولدز (Reynolds) و همکارانش در سال ۱۹۹۶ و سپس در سال ۲۰۰۴ با استفاده ترکیبی و همزمان روش کشت سلولی در یک دوره کوتاه ۲۵ ساعته و سپس RT-PCR را برای به حداقل رساندن بازدارنده‌های موجود در فاضلاب پیشنهاد نمودند. به همین دلیل با توجه به نتایج این پژوهش، به منظور تشخیص انتروویروس‌های عفونی تغلیظ شده، استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و PCR جهت ارزیابی دقیق‌تر روش تغلیظ Pellet و مقایسه آن با نتایج کشت سلولی پیشنهاد می‌گردد. (Metcalf T.C. 1995, Reynolds K. 1996) امید است که ما با پژوهش بنیادی در مورد انتروویروس‌ها بتوانیم درک عمیق‌تری از اتیولوژی،

بیماری‌زایی، شیوع و گسترش این ویروس‌ها 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.

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

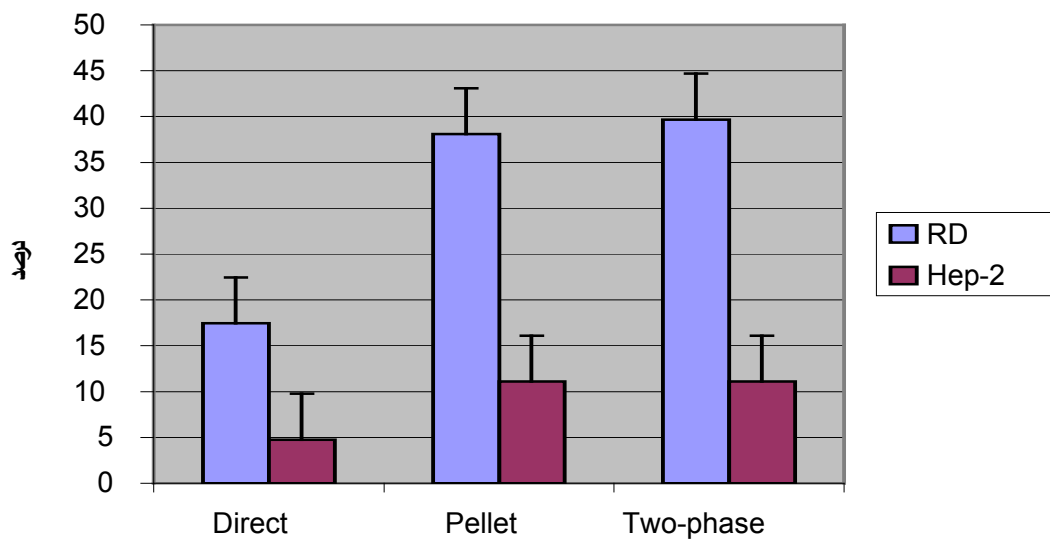
| جمع | | سال ۱۳۸۲ | | سال ۱۳۸۱ | | جمعیت یا ظرفیت اسمی (به نفر) | | سال نمونه گیری محل نمونه گیری |
|------|----|----------|------|----------|------|------------------------------|------------|----------------------------------|
| | | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد | |
| ۱۷/۵ | ۱۱ | ۱۸/۵ | ۷ | ۱۶ | ۴ | ۱/۶۸ | ۲۰/۰۰۰ | قیطریه |
| ۷/۹ | ۵ | ۲/۶۳ | ۱ | ۱۶ | ۴ | ۲/۵۳ | ۳۰/۰۰۰ | زرگنده |
| ۱۷/۵ | ۱۱ | ۱۸/۴۲ | ۷ | ۱۶ | ۴ | ۰/۵۹ | ۷/۰۰۰ | صاحبقرانیه |
| ۱۷/۵ | ۱۱ | ۱۸/۴۲ | ۷ | ۱۶ | ۴ | ۸۴/۲۵ | ۱۰/۰۰۰/۰۰۰ | اکباتان |
| ۲۰/۶ | ۱۳ | ۱۸/۴۲ | ۷ | ۲۴ | ۶ | ۸/۴۲ | ۱۰۰/۰۰۰ | شوش |
| ۱۹/۰ | ۱۲ | ۲۳/۶۸ | ۹ | ۱۲ | ۳ | ۲/۵۳ | ۳۰/۰۰۰ | محلاتی |
| ۱۰۰ | ۶۳ | ۱۰۰ | ۳۸ | ۱۰۰ | ۲۵ | ۱۰۰ | ۱/۱۸۷/۰۰۰ | جمع |

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

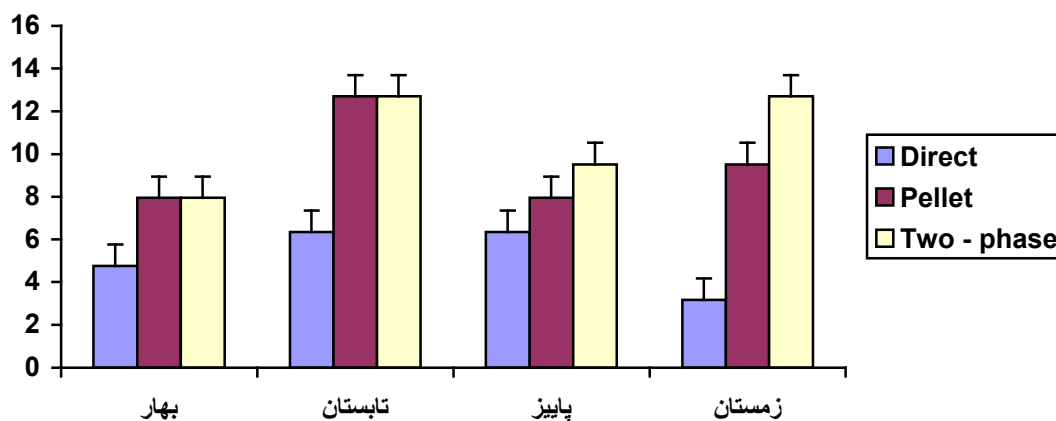
| تغلیظ Two-Phase | | تغلیظ Pellet | | مستقیم | | ویروس جدا شده واحد |
|-----------------|-------|--------------|-------|--------|-------|-----------------------|
| درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | |
| ۴/۷۶ | ۳ | ۳/۱۷ | ۲ | ۳/۱۷ | ۲ | قیطریه |
| ۴/۷۶ | ۳ | ۴/۷۶ | ۳ | - | - | زرگنده |
| ۳/۱۷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

نمودار ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی

انتروویروس‌های غیر پولیوئی



نمودار ۲: توزیع فراوانی مطلق و نسبی انتروویروس‌های غیر پولیوئی بر حسب فصل در ۳ روش مختلف



منابع :

- Toungianidon D. and Botzenhart k. (1998), Molecular techniques for the detection of enteroviruses 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 Polioviruses Circulation, Vaccines and Biologicals1-19.
- Wyn-Jones A.P. and Sewllwood J. (2001), Enteric Viruses 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.
- Baggi F. (2001), Persistence of viral Pathogens and bacteriophages 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 enterovirus isolation in association with aseptic meningitis, 1999-2002,See information: [http:// idsc.nih.gov](http://idsc.nih.gov). 193-194.
- Kew O. and Pallansch M. (2002), The Mechanism of Polioviruses Eradication, Molecular Biology of Picornaviruses, *ASM Press*, 484-491.
- Manor A. (1999), Detection of Poliovirus Circulation by Environmental Surveillance in The Absence of clinical cases in Israil & The Palestinian 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 Poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland, *Applied An Environmental Microbiology*, **54**: 371-374.
- Reynolds K. (1996), Detection of infectious enteroviruses by integrated cell culture – PCR procedure, *Appl. Envirom. Microbiol*, **62**: 1424-6.
- Shieh Y-S.c. and Wait D. (1995),Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal waste for enterovirus detection by PCR, *J.of virological Methods*, **54**: 51-66.

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 M²., ph.D; Tabatabaei H²., ph.D; Abbassian F³., ph.D;
Kargar M.,¹ B.Sc; Shahmahmoodi Sh. ²,ph.D; Holakouie Naieni K⁴., ph.D; Karimlo
M., ph.D; Nateghpour M⁵., ph.D; Sedighi H⁶., M.Sc; Khavarinegad R⁷., ph.D;
Mokhtari T²., ph.D; Nategh R²., 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 circulation 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.

