# پایش محیطی ویروس پولیو در فاضلاب‌های شهر تهران و شناسایی ویروس‌های جدا شده در کشت سلولی با روش میکرونوترالیزاسیون و افتراق بین تیپی توسط روش‌های الیزا و پروب هیبریدیزاسیون

دکتر محمد کارگر[1*]، دکتر حمیده طباطبائی[2]، دکتر محبوبه ساریجلو[2]، سارا صادقی‌پور[1]، مریم قدسی[3]، دکتر رخشنده ناطق[2]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم ۲- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۳- گروه آمار و ریاضی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم

دریافت: ۸۵/۵/۱۰ پذیرش: ۸۶/۱/۲۰

**Title:** *Poliovirus environmental surveillance in sewage system of Tehran: isolation and identification of viruses by cell culture and microneutralization, and intratypic differentiation by ELISA and probe hybridization*

**Authors:** *Kargar M, (PhD); Tabatabaei H, (PhD); Sarijlou M, (PhD); Sadeghi pour S, (MSc); Ghodsi M,(MSc); Nategh R, (MD, PhD).*

**Introduction:** *In some countries, wild polioviruses have been isolated from environment without being recovered from clinical cases. Therefore, to confirm polio eradication, WHO has recommended environmental surveillance using sewage specimens and surface water. Due to wild Poliovirus circulation in Afghanistan and Pakistan and the probability of wild virus entrance to Iran, and also to assure wild poliovirus eradication, Tehran was chosen as the target area.*

**Methods:** *In this study, 63 sewage samples were obtained from 6 main sewage disposals in Tehran by grab sampling and direct, pellet, two-phase method in sensitive cell lines. The isolated viruses were serotyped by microneutralization method and differentiated intratypically by ELISA and probe hybridization techniques.*

**Results:** *From all specimens, only 14 (22.22%) were identified as poliovirus, none of which were wild type. From these polioviruses, 6(9.52%), 13(20.63%) and 14(22.22%) were isolated from direct, pellet and two-phase concentrated specimens, respectively. The most frequent viruses were Polio1 and Polio2 (14.28%) and Polio 3(71.43%).*

**Conclusion:** *Results have revealed the efficacy of immunization coverage and surveillance programs in Iran.*

**Keywords:** *Environmental surveillance, poliovirus, sewage, Tehran.*

*Hakim Research Journal 2007; 10(1):43 -49.*

* نویسنده مسؤول: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۹۱۷-۳۱۴۹۲۰۳ نمابر: ۰۷۱۱-۶۲۶۲۲۱۰۲
پست الکترونیک: mkaragarmicro418@yahoo.com



www.SID.ir

## چکیده

**مقدمه:** *در بعضی از کشورهای دنیا با وجود عدم جداسازی ویروس پولیوی وحشی از نمونه‌های بالینی، گردش خفته ویروس در نمونه‌های فاضلاب گزارش شده است. به‌همین دلیل سازمان جهانی بهداشت جهت تأیید نهایی ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال، پایش محیطی نمونه‌های فاضلاب و آب‌های سطحی را پیشنهاد نموده است. در این پژوهش با توجه به چرخش ویروس پولیوی وحشی در دو کشور افغانستان و پاکستان و همچنین احتمال ورود این ویروس به ایران، جهت اطمینان از ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی، پایش محیطی در شهر تهران انجام شده است.*

**روش کار:** *در این پژوهش۶۳ نمونه از ٦ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران با روش Grab sample در مدت یک‌سال تهیه شد و با روش‌های مستقیم و دو روش تغلیظ رسوبی و دوفاز، ویروس پولیو در رده‌های سلولی حساس شناسایی گردید. سپس ویروس‌های پولیوی جدا شده با روش میکرونوترالیزاسیون تعیین تیپ و با روش‌های الایزا و پروب هیبریدیزاسیون افتراق داخل تیپی انجام شد.*

**یافته‌ها:** *از مجموع کل نمونه‌ها، تنها از ١٤ مورد (٢٢/٢٢٪) ویروس پولیو جداسازی گردیدکه خوشبختانه هیچ کدام ویروس وحشی نبودند. از این تعداد ٦ (٩/٥٢٪)، ١٣ (٢٠/٦٣٪) و١٤ (٢٢/٢٢٪) ویروس پولیو به‌ترتیب با روش مستقیم، تغلیظ رسوبی و دوفاز جداسازی شد. بیشترین فراوانی ویروس‌های جدا شده مربوط به پولیوی تیپ یک و دو (هر کدام با فراوانی ١٤/٢٨٪) و پولیوی تیپ سه ( با فراوانی ٧١/٤٣٪) بود.*

**نتیجه‌گیری:** *نتایج نشان‌دهنده سطح مناسب پوشش ایمن‌سازی در ایران و همچنین مؤید پایش مناسب انجام شده در سال‌های اخیر در کشور است.*


**گل‌واژگان:** *پایش محیطی، ویروس پولیو، فاضلاب، تهران.*

## مقدمه

ویروس پولیو جزو جنس انتروویروس‌ها و خانواده پیکورناویریده است. این ویروس دارای ۳ سروتیپ می‌باشد و مهمترین پاتوژن انسانی عامل فلج شل حاد محسوب می‌شود (۱ و ۲). در سال ۱۹۸۸ سازمان جهانی بهداشت، طرحی را به‌منظور ریشه‌کنی ویروس پولیو تا سال ۲۰۰۰ تدوین نمود ولی به‌دلیل محقق نشدن ریشه‌کنی در بعضی کشورها این هدف تاکنون تحقق نیافته است (۱ و ۳ و ۴) .انجام استراتژی‌های ریشه‌کنی با پوشش گسترده ایمن‌سازی، اعلام روزهای ملی ایمن‌سازی[1]، پایش موارد فلج شل حاد[2] و لکه‌گیری[3] منجر به ریشه‌کنی کامل ویروس وحشی در سال ۱۹۹۴ از آمریکا، در سال ۲۰۰۰ از غرب اقیانوس آرام و در سال ۲۰۰۲ از اروپا گردید. بدین‌ترتیب تا سال ۲۰۰۱ تعداد کشورهای اندمیک از ۱۲۵ کشور به ۱۰ کشور، در سال ۲۰۰۲ به هفت کشور و در سال ۲۰۰۳ به شش کشور افغانستان، پاکستان، هند، نیجر، نیجریه و مصر محدود شده است (۱ و ۴). در ایران برنامه ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال از سال ۱۹۹۲ آغاز شد و تاکنون علاوه بر واکسیناسیون جاری و اعلام چندین نوبت روزهای ملی ایمن‌سازی در مناطق پرخطر، چندین نوبت نیز ایمن‌سازی ناحیه‌ای[4] انجام شده است. در سال‌های ۱۹۹۶، ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ به‌ترتیب: ۱۲، ۱۳ و ۲ مورد ویروس پولیو وحشی در ایران جداسازی شده است. از مجموع ۱۵ مورد ویروس وحشی جدا شده در سال‌های۱۹۹۷ و ۱۹۹۸، ۱۳ مورد مربوط به استان سیستان و بلوچستان بوده است (۳). در بعضی از کشورهای دنیا مانند: مصر ، با وجود عدم جداسازی ویروس پولیوی وحشی از نمونه‌های بالینی، گردش خفته ویروس در نمونه‌های فاضلاب گزارش شده است (۶). به همین دلیل سازمان جهانی بهداشت به کشورهای واقع در نواحی پرخطر، پس از ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال، پایش محیطی را از نمونه‌های آب‌های سطحی و فاضلاب پیشنهاد نموده است (۹).

[1] National Immunization Days (NIDs)
[2] Acute Flaccid Paralysis (AFP)
[3] Mopping up
[4] Subnational Immunization Days (SNIDs)



Archive of SID
www.SID.ir

خوشبختانه از سال ۲۰۰۰ تاکنون هیچ‌کدام از ۳ سروتیپ ویروس وحشی پولیو در ایران جداسازی نشده است. اما به‌دلیل مجاورت ایران با دو کشور افغانستان و پاکستان در مرزهای شرقی (که دارای گردش ویروس پولیوی وحشی هستند)، خطر ورود ویروس پولیوی وحشی از این کشورها وجود دارد. با توجه به مسایل یاد شده به‌دلایل زیر در فاز اول پایش محیطی در ایران شهر تهران انتخاب گردید: داشتن بیشترین جمعیت در بین شهرهای کشور با نزدیک به ۲۰٪ از جمعیت کل کشور؛ نقل و انتقال مسافر و همچنین مهاجرت از سایر نقاط کشور به این شهر؛ و داشتن چندین سیستم تصفیه فاضلاب متمرکز.

هدف از این پژوهش، پایش محیطی فاضلاب و جداسازی و تشخیص سوش‌های واکسن، وحشی و سوش‌های مشتق از واکسن[1] ویروس پولیو و در نهایت تأیید ریشه‌کنی بیماری فلج اطفال در ایران است.

## روش کار

**نمونه‌گیری:** با همکاری شرکت آب و فاضلاب تهران از آذرماه ۱۳۸۱ تا آبان‌ماه ۱۳۸۲ از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران ۶۳ نمونه با روش Grab Sample تهیه شد. تمامی نمونه‌ها مربوط به فاضلاب خام بودند و از قسمت ورودی فاضلاب[2] جمع‌آوری شدند.

حجم تمامی نمونه‌های ارسالی یک‌لیتر بود و توسط ظروف پلاستیکی در پوش‌دار به آزمایشگاه ویروس‌شناسی مرکز کشوری فلج اطفال[3] واقع در انستیتو تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل می‌گردید. در تمامی موارد مشخصات نمونه فاضلاب ارسالی (محل نمونه‌برداری، 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 سانتی‌گراد انجام می‌گرفت.

**تیمار نمونه‌ها:** نمونه‌های فاضلاب به‌صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ رسوبی[4] و روش تغییر یافته دو فاز[5] مورد بررسی قرار گرفت. برای تغلیظ با روش رسوبی، ۵۰۰ میلی‌لیتر از فاضلاب تهیه شده را به ۱۰ لوله پلاستیکی (Nunc) ۵۰ میلی‌متری منتقل و در حرارت ۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم و سپس رسوب حاصل به دو قسمت مساوی تقسیم و در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. روش دو فاز، با استفاده از روش پیشنهادی هُوی[6] و همکارانش (۷) در سال ۲۰۰۱ به‌صورت زیر انجام شد: ۴۰۰ میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفوژ مرحله اول (روش رسوبی) را در داخل یک ارلن ۱۰۰۰ لیتری ریخته و PEG6000، ۳۰٪ (Merck) و دکستران ۲۰٪ مربوط به باکتری *Leuconostoc mesenteroides* (D5376, Sigma) و NaCl (Merck) ۵ مولار به‌ترتیب به‌میزان: ۱۳۳/۶گرم (W/V)، ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی‌لیتر (V/V) به آن اضافه گردید و پس ازتنظیم pH محلول در دامنهٔ ۷ تا ۸ با سود یک نرمال به‌مدت یک ساعت آنرا روی شیکر[7] با دور ۲۶۰ RPM قرار داده شد. سپس محتویات ارلن را به داخل یک قیف جدا کننده[8] ۴۰۰ میلی‌لیتری ریخته و یک شب[9] در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در مرحله بعد ۵ میلی‌لیتر از لایه رسوب انتهایی[10] و لایه تشکیل شده در بین دو فاز[11] جمع‌آوری شد و به یکی از لوله‌های Pellet مرحله قبل اضافه گردید. در مرحله آخر برای از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها به ۴ میلی‌لیتر از نمونه مستقیم فاضلاب، رسوب (Pellet) و مخلوط تغلیظ شده دو فاز، Pellet یک میلی‌لیتر کلروفرم (Merck) اضافه و ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰ RPM بر روی شیکر لوله قرار داده و در نهایت محتویات لوله به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ RPM و حرارت ۵ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ و مایع تیمار شده رویی در کرایو تیوب‌های استریل جمع‌آوری شد.

**کشت سلولی:** از رده‌های سلولی L20B، RD و Hep-2 برای جداسازی ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیر پولیویی استفاده شد. حساسیت رده‌های سلولی به‌وسیله انتروویروس‌های موجود در آزمایشگاه تعیین گردید. برای هر ۳ تیمار یک نمونه فاضلاب، ۶ لوله کشت سلولی L20B، RD و Hep-2 در نظر گرفته شد. میزان تلقیح فاضلاب به هر لوله کشت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بود و پس از تلقیح در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز نگهداری گردید. برای مشاهده CPE هر روز لوله‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی و نمونه‌های مثبت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردید. همچنین پس از ۷ روز، لوله‌های منفی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز و پس از گرم کردن در دمای اتاق پاساژ مجدد داده می‌شد (۸). برای مواردی که نمونه روی کشت سلولی RD مثبت ولی روی L20B منفی شده بود، پاساژ RD به L20B صورت گرفت (۱۱).

[1] Vaccine Derived Polioviruses (VDPV)
[2] Influent
[3] National poliovirus laboratory (NPL)
[4] Pellet
[5] Two-phase
[6] Hovi
[7] Horizontal shaker
[8] Separation funnel
[9] Overnight
[10] Bottom phase
[11] Interphase



Archive of SID
www.SID.ir

**تست نوترالیزاسیون:** پس از تعیین نتایج کشت سلولی نمونه‌هایی که بر روی L20B و Hep-2 مثبت‌شده بودند، مستقیماً برای انجام تست نوترالیزاسیون پولیو استفاده شدند. برای انجام تست نوترالیزاسیون از پلیت‌های میکروتیتر (میکرو پلیت) استفاده شد. برای هر ویروس پولیوی جداشده از آنتی‌سرم مجموع پولیو[1] و آنتی‌سرم‌های مخلوط PI وPII، PII و PIII، PI و PIII استفاده شد (۸).

**تست الایزا:** کیت اختصاصی الایزای پولیو (RIVM) توسط سازمان جهانی بهداشت در اختیار آزمایشگاه‌های فلج اطفال قرار می‌گیرد. در این تست چاهک‌های میکروپلیت که توسط IgG گاوی ضد پولیو ویروس‌های تیپ ۱، ۲ و۳ پوشیده شده با سوش معین پولیو مجاور می‌شوند. سپس انکوباسیون با آنتی‌سرم‌های خرگوشی جذب متقاطع شدهٔ[2] اختصاصی تیپ ادامه می‌یابد. پس از شستشوی آنتی‌سرم‌های خرگوشی متصل نشده، IgG ضدخرگوشی نشان‌دار شده با پراکسیداز[3] اضافه می‌شود تا آنتی‌سرم‌های خرگوشی را شناسایی نماید. در چاهک الف آنتی‌بادی خرگوشی ضدپولیو ویروس توتال (که هم با ویروس واکسن و هم با ویروس وحشی واکنش می‌دهند)، در چاهک ب آنتی‌بادی ضدپولیوی وحشی و در چاهک ج آنتی‌بادی ضدپولیوی واکسن ریخته می‌شود. هر کدام از چاهک‌های ب و ج که OD دو برابر و نیم دیگری را داشته باشند، نشان دهنده سوش ویروس مورد نظر است (۷ و ۸).

**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 نشان‌دار شده، برای افتراق بین ویروس واکسن از وحشی به کار می‌رود. همچنین از پروب دیگری که برای ناحیه غیرقابل ترجمه ۵′ ژنوم[4] ساخته شده و در تمامی انتروویروس‌ها حفاظت شده است نیز به‌عنوان شاهد استفاده می‌شود. 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 می‌شود. سپس پروب‌های نشان‌دار شده باDIG[5] به آن افزوده می‌شود. پروب‌های باند نشده طی مراحل شستشو، خارج و پروب‌های باند شده توسط واکنش آنزیم- سوبسترا شناسایی می‌گردد. واکنش مثبت به‌صورت مشاهده لکه خاکستری مشخص می‌شود (۷ و ۸).

آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده با نرم‌افزار SPSS13 و از طریق آزمون‌های آنالیز واریانس[6]، تی زوج شده[7]، کای دو[8] و فریدمن انجام شد.

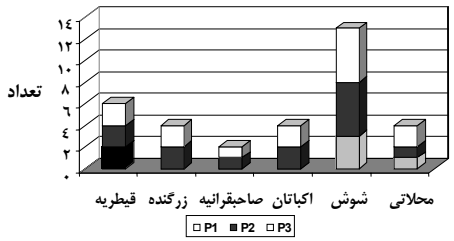
## نتایج

از آذرماه سال ۱۳۸۱، تا آبان‌ماه ۱۳۸۲، از ۶ تصفیه‌خانه قیطریه، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش و محلاتی شهر تهران، ۶۳ نمونه تهیه گردید. بیشترین جمعیت تحت پوشش فاضلاب مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب اکباتان در غرب شهر تهران با جمعیت یک‌میلیون نفر (۸۴/۲۵٪) و کمترین جمعیت مربوط به صاحبقرانیه در شمال تهران با جمعیت ۷ هزار نفر (۰/۵۹٪) بود. طبق توصیه سازمان جهانی بهداشت، نمونه‌گیری طوری طراحی شده بود که تقریباً از هر سیستم تصفیه فاضلاب هر ماه یک نمونه تهیه شود. به استثنای تصفیه خانه زرگنده (که به‌علت تعمیرات، از خردادماه سال ۱۳۸۲ امکان ادامه نمونه‌گیری از آن محل وجود نداشت)، در سایر موارد فراوانی توزیع نمونه‌برداری یکسان بود. در این پژوهش ویروس پولیو به‌صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ در رده‌های سلولی L20B، RD وHep-2 جداسازی گردید. سپس برای تعیین سه سروتیپ مختلف ویروس، تست میکرونوترالیزاسیون اختصاصی انجام شد. در مرحله بعد به‌منظور افتراق بین تیپ‌های وحشی[9] و واکسن[10] ویروس پولیو، از تست‌های آنتی‌ژنیک الایزا و ژنومیک پروب هیبریدیزاسیون استفاده گردید. از مجموع ۶۳ نمونه جمع‌آوری شده، ۳۸ نمونه (۶۰/۳۳٪) انتروویروس و ۱۴ نمونه (۲۲/۲۲٪) ویروس پولیو جدا گردید. با انجام تست‌های افتراق بین‌تیپی مشخص گردید که تمامی ویروس‌های پولیوی جدا شده مربوط به تیپ واکسن SL می‌باشند. بیشترین فراوانی جداسازی ویروس پولیو مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب شوش با درصد ۳۵/۷۱ از کل ویروس‌های پولیوی جداشده بود و با آزمون فرض کای دو این فرض که میزان جداسازی در این تصفیه‌خانه دو برابر سایر تصفیه‌خانه‌ها می‌باشد با میزان p= ۰/۵۸ رد نشد. بیشترین فراوانی جداسازی تیپ‌های مختلف ویروس پولیوی SL مربوط به P3 با ۱۰ مورد جداسازی (فراوانی ۷۱/۴۳٪) و سپس مربوط به P1 و P2 هر کدام با ۲ مورد جداسازی (فراوانی ۱۴/۲۸٪) بود. همچنین بیشترین تیپ ویروس جداشده از مناطق مورد پژوهش مربوط به P3 و تصفیه‌خانه شوش (فراوانی ۲۸/۵۷٪) بود (نمودار ۱).

[1] Pooled Polio (PP)
[2] Cross-absorbed
[3] Horseradish Peroxides (HRP)
[4] 5′ Non – translated region
[5] Digoxigenin

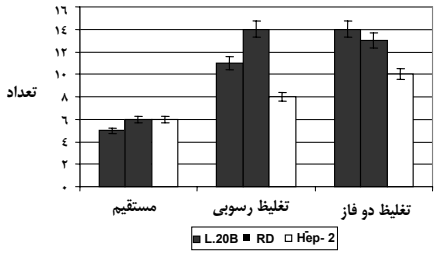
[6] ANOVA
[7] t- paired test
[8] Chi- Square
[9] Non Sabin Like (NSL)
[10] Sabin Like (SL)


www.SID.ir
Archive of SID




**نمودار ۱- توزیع فراوانی انواع ویروس‌های پولیوی جداشده از واحدهای مورد پژوهش**

ابتدا با آزمون فریدمن بین سه روش مستقیم، تغلیظ رسوبی و دو فاز در جداسازی ویروس پولیو تفاوت معناداری مشاهده شد ($p< ۰/۰۱$) و با آزمون تی نمونه‌های زوج شده به این نتیجه رسیدیم که این تفاوت تنها مربوط به روش مستقیم می‌باشد که با دو روش تغلیظ رسوبی و دو فاز متفاوت است ($p< ۰/۰۱$) و بین دو روش تغلیظ یاد شده نیز تفاوتی مشاهده نشد ($p= ۰/۱۸۲$). همچنین میزان همبستگی این دو روش تغلیظ ۰/۸۴۳ به‌دست آمد ($p< ۰/۰۱$). با آزمون فریدمن مشخص شد که جداسازی ویروس در سه رده سلولیL20B، RD و Hep-2 تفاوت معناداری را با یکدیگر ندارد ($p>۰/۰۵$). اما در رده سلولی RD میزان جداسازی ویروس با دو روش تغلیظ رسوبی و دو فاز، تفاوت معناداری را با روش مستقیم ($p< ۰/۰۱$) داشت (نمودار ۲). به‌طور کلی در این پژوهش، بین جداسازی ویروس پولیو در فصول مختلف، ارتباط معناداری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). همچنین میزان جداسازی ویروس پولیو با هر دو روش تغلیظ رسوبی و دو فاز در فصول بهار و تابستان (با فراوانی ۶/۳۵٪) یکسان بود.




**نمودار ۲- توزیع فراوانی ویروس‌های پولیوی جداشده بر روی رده‌های سلولی L20B، RD و Hep-2 با سه روش مختلف**

## بحث و نتیجه‌گیری

تا ابتدای سال ۲۰۰۵ در ۱۸ کشور از ناحیه مدیترانه شرقی ویروس پولیوی وحشی ریشه‌کن شده است و تنها در کشورهای مصر، افغانستان و پاکستان این ویروس به‌صورت اندمیک باقی مانده است (۱ و ۱۳). ۹۹٪ موارد پولیو گزارش شده در سال ۲۰۰۲ مربوط به سه کشور هند، نیجریه و پاکستان بوده است (۱۴). یکی از موانع بزرگ ریشه‌کنی جهانی فلج اطفال، گردش ویروس وحشی در ۶ کشور افغانستان، پاکستان، هند، نیجر، نیجریه و مصر است (۴) که این مسأله می‌تواند برای مناطق هم‌جوار این کشورها خطرناک باشد. به‌عنوان نمونه پس از ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال در ۱۱ کشور: بنین، بوتسوانا، کامرون، گینه، مالی، عربستان سعودی، بورکینافاسو، جمهوری آفریقای مرکزی، چاد، ساحل عاج و سودان، در سال ۲۰۰۴ مجدداً موارد AFP پولیویی در این کشورها گزارش شد. با بررسی ژنوتیپ ویروس‌های جدا شده مشخص گردید که علت موارد AFP یاد شده، ورود ویروس‌های پولیوی بومی کشور نیجریه بوده است (۱۴). در پاکستان در ۶ ماه اول سال ۲۰۰۵، شش ناحیه گردش فعال ویروس پولیوی وحشی وجود داشته که متاسفانه بیشتر این مناطق در نزدیکی مرزهای ایران با کشورهای افغانستان و پاکستان قرار دارند (۱۳). در فلسطین اشغالی از سال ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۷، پایش محیطی ویروس پولیو با استفاده از نمونه‌های فاضلاب توسط مانوری[1] و همکارانش انجام شد. در این مطالعه در حالی که هیچ گزارشی از وقوع AFP در کشور وجود نداشت، ۵ شیوع ناشی از پولیوی تیپ ۱ و ۳ در سال‌های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۶ نشان داده شد (۶). همچنین دِشپانده[2] در سال ۱۹۹۹ تا۲۰۰۰، با پایش محیطی نمونه‌های فاضلاب در هند موفق به جداسازی ویروس پولیوی وحشی تیپ ۱ و ۳ با استفاده از روش تغلیظ دو فاز گردید (۱۲). این گزارش‌ها باعث شد که سازمان جهانی بهداشت پس از ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی از موارد AFP در مناطق پرخطر، پایش تکمیلی با استفاده از نمونه‌های فاضلاب و مدفوع افراد سالم را توصیه نماید (۹ و ۱۲).

مطابق توصیه سازمان جهانی بهداشت، معیار موفقیت‌آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مرحله آخر ریشه‌کنی فلج اطفال، تشخیص انتروویروس‌های غیر پولیویی در حداقل ۳۰٪ از نمونه‌های فاضلاب است (۹).

ما در این پژوهش برای اولین بار روش تغلیظ رسوبی را معرفی نمودیم و به‌صورت هم‌زمان روش تغلیظ رسوبی را به‌همراه روش تغلیظ دو فاز مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت استفاده نمودیم. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی به‌ترتیب با روش مستقیم،

[1] Manory
[2] Deshpande



Archive of SID
www.SID.ir

تغلیظ رسوبی و دو فاز:۱۳ (۲۰/۶۳٪)، ۲۵ (۳۹/۸۷٪) و ۲۷ (۴۲/۸۵٪) انتروویروس غیرپولیویی جدا شد که این مسأله می‌تواند نشان‌دهنده مقبولیت دو روش تغلیظ یاد شده برای جداسازی ویروس پولیو باشد. با توجه به متفاوت بودن نوع و تعداد ویروس‌های پولیو جداشده، استفاده هم‌زمان از این دو روش تغلیظ جهت پایش دقیق‌تر محیطی پیشنهاد می‌گردد. از سال ۱۹۹۸ سلول‌های L20B (سلول‌های موشی که ژن گیرنده سلول انسانی برای ویروس پولیو را بیان می‌کند) جایگزین رده سلولی Hep-2 گردید که می‌تواند در صورت استفاده هم‌زمان با سلول RD، سرعت عمل، دقت و اطمینان در تشخیص ویروس پولیو را بالا ببرد (۱۱). به‌همین دلیل ما در این بررسی از رده سلولی L20B به‌همراه RD و Hep-2 استفاده کردیم. در این پژوهش، تمامی ۱۴ ویروس پولیو واکسن بر روی سلول L20B (۱۰۰٪)، ۱۳ مورد بر روی RD (۹۲/۸۵٪) و ۱۰ ویروس بر روی رده سلولی Hep-2 (۷۱/۴۲٪) جداسازی شدند. در این تحقیق مانند نمونه‌های بالینی موارد مثبت شده بر روی RD به L20B تلقیح شدند تا در صورتی که ویروس پولیو با تیتر پایین در نمونه موجود می‌باشد، در L20B تکثیر کرده و جداسازی گردد. دو مورد از نمونه‌های روش مستقیم و چهار مورد از نمونه‌های روش تغلیظ، پس از پاساژ RD به L20B مثبت شدند. این مسأله می‌تواند تأییدکننده نقش مکملی این دو رده سلولی برای جداسازی انتروویروس‌ها و ویروس پولیو باشد. پایش محیطی همچنین ابزار بالقوه‌ای برای نمایش گردش ویروس پولیو مشتق از واکسن می‌باشد (۹). در سال‌های اخیر اپیدمی‌های کوچکی از پولیومیلیت مرتبط با گردش سوش واکسن جهش یافته در بین کودکان غیرواکسینه مشاهده شده که به آن، ویروس پولیوی در حال چرخش مشتق از واکسن[1] می‌گویند و اغلب توالی VP1 آنها بین ۳ -۲٪ با سوش واکسن سابین تفاوت نشان می‌دهد. به گونه‌ای که درسال ۲۰۰۲ سوش مشتق از واکسن تیپ ۱ در هائیتی، فیلیپین، جمهوری دومینیکن و تیپ ۲ مشتق از واکسن در ماداگاسکار یافت شد (۱۴). در همین سال بلومکویست[2] و همکارانش در استونی از فاضلاب، VDPV تیپ ۳ جداسازی نمودند (۱۵). مهمترین ویژگی زیستی سوش‌های CVDPVs، قابلیت ایجاد فلج و انتقال فردبه‌فرد آن مانند ویروس‌های وحشی است (۴).

در این پژوهش تمامی سوش‌های پولیوی جداشده از نظر آنتی‌ژنیک با آنتی‌بادی جذب متقاطع شده سوش‌های واکسن و وحشی و از نظر ژنومیک با روش پروب هیبریدیزاسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. خوشبختانه تمامی ۱۴ ویروس پولیوی جداشده سوش SL بودند همچنین در روش الایزا جواب‌هایی مانند: Non-reactive، Double reactive، Non vaccine like (که ویژگی سوش‌های مشتق از واکسن VDPV است) نیز مشاهده نگردید. علاوه بر این، خوشبختانه در پایش محیطی استان سیستان و بلوچستان سوش‌های وحشی و VDPV ویروس پولیو جداسازی نشد. این مسأله می‌تواند نشان‌دهنده سطح مناسب پوشش ایمن‌سازی در کشور و همچنین تأیید دیگری بر پایش مناسب و حساس موارد بالینی AFP و در نهایت ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال در ایران باشد.

به‌طور کلی در اغلب کشورهای دنیا و همچنین ایران میزان آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در بدن افراد جامعه بر علیه تیپ ۲ ویروس پولیو بیشتر از تیپ ۱ و میزان آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده تیپ ۱ بیشتر از تیپ ۳ می‌باشد (P2 > P1 > P3). یکی از دلایل اصلی سطح بالاتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده علیه تیپ ۲ ویروس پولیو، آنتی‌ژنیسیتی بیشتر و در معرض بودن آنتی‌ژن‌های سطحی این تیپ از ویروس می‌باشد. به‌همین دلیل ویروس وحشی تیپ ۲، اولین ویروس پولیویی بوده که ریشه‌کن شده است. از این‌رو پس از واکسیناسیون همگانی با OPV، گردش ویروس‌های واکسن تیپ ۲ به‌دلیل سطح بیشتر آنتی‌بادی در بدن کمتر است. این مسأله می‌تواند دلیلی بر سطح پایین‌تر ایمنی نسبت به این تیپ از ویروس در افراد ساکن در مناطق جنوب شهر تهران باشد. نتیجه این که، علت جداسازی تعداد بیشتر ویروس‌های تیپ ۳ از محیط، سطح پایین‌تر آنتی‌بادی خنثی‌کننده در بدن افراد جامعه و در نتیجه گردش بیشتر این ویروس است. از طرفی جداسازی بیشتر ویروس پولیو در فصول بهار و تابستان می‌تواند به‌دلیل واکسیناسیون ناحیه‌ای در زمان پژوهش (در ماه‌های اردیبهشت و خرداد) در بعضی از مناطق پرخطر کشور و همچنین مهاجرت به شهر تهران و گردش بیشتر ویروس در فصول یاد شده باشد. به‌دلیل جداسازی مقادیر یکسان از ویروس با هر دو روش تغلیظ رسوبی و دو فاز می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در هنگام واکسیناسیون عمومی، امکان جداسازی ویروس با هر دو روش تغلیظ وجود دارد.

با توجه به اینکه ترکیه آخرین کشور اروپایی است که پولیوی وحشی در آن ریشه‌کن شده است و همچنین به‌علت وضعیت نابسامان عراق و تردد زائران ایرانی، انجام پایش محیطی در نمونه‌های فاضلاب استان‌های آذربایجان غربی،

[1] Circulating Vaccine Derived Polioviruses (CVDPVs)
[2] Blomqvist


www.SID.ir
Archive of SID

کرمانشاه و کردستان نیز پیشنهاد می‌گردد. به امید روزی که ویروس پولیو از سراسر جهان ریشه کن شود.

## تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله، مراتب سپاس و قدردانی خود را از حمایت‌های مالی و اجرایی قطب علمی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران ابراز می‌دارند. همچنین از جناب آقای مهندس عباس حاج حریری، سرکار خانم مهندس نشاط مجد و سرکار خانم مهرنوش مطلبی در حوزه معاونت نظارت بر بهره‌برداری فاضلاب استان تهران و امور نظارت بر کیفیت آب آزمایشگاه‌های استان تهران صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## References

1- Semler BL, Wimmer E. Molecular biology of Picornaviruses. Wash DC: ASM publications; 2002: 537-450.

2- Pallansch M, Roos RP. Enteroviruses: Polioviruses, Coxackieviruses, Echoviruses and newer Enteroviruses. In: Filds BN. *Fileds virology*. 4th ed. Chapter 24. New York: Lippincott Raven; 2001: 723-776 .

3- CDC. Wild Poliovirus transmission in bordering areas of Iran, Iraq, Syria, and Turkey, 1997 to June 1998. MMWR 1998; 47(28):588-592 .

4- WHO Global Polio eradication initiative: strategic plan 2004-2008. WHO Publications; 2003:1-16 .

5-CDC. Progress towards Poliomyelitis eradication in Egypt, 2003—2004. MMWR 2004; 53 (35): 820-822.

6- Manor Y, Handsher R. Detection of Poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in the Palestinian authority. J Clin Microbiol 1999; 37 (6): 1670-1675.

7- Renta J, Hovi T, Arjas E. Poliovirus surveillance by examining sewage water specimens: studies on detection probability using simulation models. Risk Anal 2001; 21(6): 1087-1096 .

8- World Health Organization. Polio laboratory manual. Geneva; Switzerland: WHO; 2001.

9- WHO. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Vaccines and Biologicals 2003: 1-19.

10- Harris BN, Dürrheim DN, Ogunbanjo GA. Polio eradication: The validity of surveillance indicators. Trop Med Int Health 2003; 8(5):386.

11- WHO. L20B cells support multiplication of group A Coxsackieviruses. Polio Lab Network 2002; 3 (4):1-5.

12- Deshpande JM, Shetty SJ, Siddiqui ZA. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. Appl Environ Microbiol 2003; 69(5): 2919-2927.

13- CDC. Progress toward polionyelitis eradication: polionyelitis outbreak in Sudan 2004. MMWR 2005; 54 (4): 97-99.

14- CDC. Progress toward global eradication of Poliomyelitis, 2002. MMWR 2003; 52 (16): 366-369.

15- Blomqvist S, Saainen C, Hovi T. Characterization of a highly eved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. J Virol 2004; 78 (9): 4876-4883.

Archive of SID



www.SID.ir