Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۷
صفحات ۲۲-۱۵

مقایسه دو روش ICC-RT-PCR و کشت سلولی به منظور تشخیص انتروویروس‌ها در نمونه‌های فاضلاب

دکتر محمد کارگر*[۱]، سارا صادقی پور[۱]، دکتر حمیده طباطبایی[۲]، دکتر رخشنده ناطق[۲]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، [۲]گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: انتروویروس ها یکی از مهم ترین ویروس های روده ای هستند که طیف وسیعی از بیماری ها را در انسان ایجاد می کند. اخیراً با توجه به زمان بر بودن و همچنین نیاز به انجام تست های تائیدی، استفاده از روش های مولکولی جهت تشخیص انتروویروس ها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش ارزیابی روش های ICC-RT-PCR و کشت سلولی برای تشخیص انتروویروس‌های موجود درسیستم فاضلاب است.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۶۳ نمونه فاضلاب با روش Grab sample تهیه و با روش‌های Pellet و Two-Phase تغلیظ و در رده‌های سلولی RD و HEp-2 کشت داده شد. در مرحله بعد، تمامی نمونه‌ها به کشت‌های سلولی حساس RD و HEp-2 تلقیح و پس از ۲۴ساعت گرمخانه‌گذاری در حرارت ۳۶ درجه سانتی گراد، با استفاده از پرایمرهای Pan E.V، Pan P.V و پرایمرهای اختصاصی Sabin بر روی نمونه‌های کشت سلولی تست RT-PCR انجام شد.

یافته ها: از مجموع نمونه های مورد بررسی، با استفاده از روش کشت سلولی از ۳۳ نمونه انتروویروس (۵۲/۳۸ درصد) و توسط روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه انتروویروس (۶۵/۰۷ درصد) و از ۶ نمونه ویروس پولیو (۹/۵۲ درصد) جداسازی گردید.

نتیجه گیری: با آنالیز آماری مشخص شد که بین روش‌های کشت سلولی و ICC-RT-PCR ارتباط معنی داری در سطح ۰/۰۵ برای جداسازی انتروویروس‌ها وجود دارد. همچنین حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس‌ها کمتر از ۰/۰۱، TCID50 ارزیابی شد که می‌تواند نشان دهنده قابل قبول بودن و حساسیت این روش برای تشخیص انتروویروس‌های موجود در فاضلاب باشد.

واژگان کلیدی: انتروویروس‌ها، فاضلاب، ICC-RT- PCR، کشت سلولی.
دریافت مقاله: اردیبهشت ۱۳۸۷ پذیرش برای چاپ: تیر ۱۳۸۷

مقدمه

انتروویروس ها در خانواده پیکورناویریده قرار دارند و شامل: پولیوویروس ها، کوکساکی ویروس های A و B، اکوویروس ها و انتروویروس های تیپ ۶۸ تا ۷۱ می باشند(۱). عفونت های انتروویروسی با بعضی از بیماری‌های مزمن مانند: کاردیومیوپاتی، میوکاردیت مزمن، سندرم خستگی مزمن، سندرم پس از پولیو، دیابت شیرین و بیماری های عصبی در ارتباط بوده و همچنین گاهی نیز بیماری های منجر به مرگ را ایجاد می نمایند(۲). عموماً افراد آلوده برای چندین هفته انتروویروس را در مدفوع خود دفع می نمایند. بدین ترتیب تعداد زیادی از ویروس های دفع شده در محیط، برای مدت طولانی می توانند به صورت عفونی باقی بمانند. به همین دلیل با جستجوی انتروویروس ها در نمونه های محیطی و فاضلاب، می توان به نحوه انتشار ویروس و بررسی تقریبی افراد آلوده شده در یک جمعیت پی برد(۳).

یکی از روش های متداول تشخیص انتروویروس ها استفاده از رده های حساس سلولی مانند: HEp-2، RD، L20B،

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم،
mkaragarmicro418@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

VERO، BGM، Hela، SKCO1 و HT-29 است (۴). اگر چه اکثر ویروس های روده ای توانایی تکثیر بر روی رده های کشت سلولی را دارند، اما بعضی از ویروس های روده ای مانند: هپاتیت A، نورواک ویروس ها، روتاویروس ها و کوکساکی ویروس های گروه A به راحتی در کشت سلولی CPE ایجاد نمی کنند (۵، ۶). از طرفی هنوز هیچ رده سلولی حساسی برای تشخیص تمامی سروتیپ های شناخته شده انتروویروس شناسایی نشده است. با توجه به مشکلات یاد شده استفاده از روش های مولکولی مانند RT-PCR به منظور تشخیص مستقیم انتروویروس ها و سایر ویروس های روده ای مورد توجه ویروس شناسان محیطی بوده است. اما استفاده از این روش به دلیل وجود بازدارنده های آلی موجود در فاضلاب مشکلات زیادی را به همراه داشته است (۲، ۶و ۷). Chomczynski و همکاران (۸) در سال ۱۹۸۷، Abbaszadegan و همکاران (۹) در سال ۱۹۹۳، Berger و همکاران (۱۰) در سال ۱۹۹۴ و همچنین Bosh و همکاران (۱۱) در سال ۱۹۹۸، از روش هایی مانند: گوانیدین ایزو تیوسیانات/ فنل و کلروفرم، سفادکس G-100، رزین چیلاکس ـ ۱۰۰، دیالیز، پروتئیناز، جذب اسید نوکلئیک و لیوفیلیزاسیون جهت حذف بازدارنده ها به منظور تشخیص مستقیم انتروویروس ها استفاده نموده‌اند (۲، ۶، ۷ و ۹).

برای اولین بار Reynolds و همکاران در سال ۱۹۹۶، استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR(ICC-RT-PCR) را به منظور تشخیص وجود انتروویروس ها در نمونه های فاضلاب در مدت ۲۴ ساعت پیشنهاد کردند(۱۲). سپس Tougianidou و همکاران (۵) در سال ۱۹۹۸، Chapron و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۰۰، Ballester و همکاران (۱۴) در سال ۲۰۰۴ و Dale و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۳ از روش ICC-RT-PCR به منظور شناسایی انتروویروس ها، آستروویروس ها، آدنوویروس ها و روتاویروس ها، در آب های سطحی، رودخانه، دریا و فاضلاب استفاده نمودند. ما در پژوهش های قبلی با استفاده از رده‌های کشت سلولی RD، L20B و HEp-2 و همچنین دو روش تغلیظ مختلف Pellet و Two-Phase پایش محیطی انتروویروس ها در فاضلاب و آب های سطحی شهر تهران(۱۷و۱۹)، استان سیستان و بلوچستان (۱۵و ۱۶) و استان فارس(۲۰) را مورد بررسی قرار دادیم. همچنین در بررسی دیگری ۲۸ روش مختلف حذف بازدارنده های آلی، به منظور تشخیص انتروویروس ها با روش RT-PCR مستقیم ارزیابی شد(۱۸). هدف از این پژوهش، مقایسه دو روش ICC-RT-PCR و کشت سلولی برای تشخیص انتروویروس‌ها از نمونه های تغلیظ شده فاضلاب است.

مواد وروش ها

الف) نمونه برداری و تغلیظ: ۶۳ نمونه از آذرماه ۱۳۸۴ تا آبان ماه ۱۳۸۵ با همکاری شرکت آب و فاضلاب از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران (قیطریه؛ ۱۱، صاحبقرانیه؛ ۱۱، زرگنده؛ ۵، اکباتان؛ ۱۱، محلاتی؛ ۱۲ و شوش؛۱۳) با روش Grab sample تهیه و با روش تغییر یافته Two-Phase پیشنهاد شده توسط Hovi و همکاران در سال ۲۰۰۱ مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

ب) کشت سلولی و تست میکرونوترالیزاسیون: برای جداسازی ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیر پولیویی از رده‌های سلولی RD و HEp-2 استفاده شد. میزان افزودن فاضلاب به هر لوله کشت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بود و هر نمونه به ۲ لوله کشت سلولی تلقیح گردید. پس از ۷ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد تمامی لوله ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس از نظر ظهور اثرات مخرب سلولی (CPE) مورد بررسی قرار گرفت و سپس ویروس‌های جداشده با استفاده از آنتی سرم پولیو (Pooled PolioPP) و آنتی سرم های کوکساکی ویروس B1 تا B6 (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی سرمی مربوط به کوکساکی ویروس A9 و ۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نام های A تا G یا روش میکرونوترالیزاسیون شناسایی گردید(۲۲).

ج) تست تلفیقی کشت سلولی و *RT-PCR(ICC-RT-PCR)*: برای جداسازی انتروویروس ها، ابتدا رده های سلولی RD, HEp-2 تهیه وسپس ۲۰۰ میکرولیتر از هرنمونه فاضلاب تغلیظ شده به چهار لوله کشت سلولی تلقیح گردید و در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد برای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بدین منظور هر دو لوله مربوط به رده سلولی RD و HEp-2 جداگانه با هم مخلوط و پس از فریز کردن در دمای ۲۰ـ درجه سانتی گراد و گرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) به مدت یک دقیقه در دور rpm 13200، سانتریفیوژ و ۵ میکرو لیتر از مایع رویی آن به منظور انجام RT-PCR جداسازی گردید. برای انجام RT-PCR در ابتدا پرایمرهای اختصاصی Pan E.V، Pan P.V و Sabin، (I، II و III)، طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی برای انتهای حفاظت شده۵ انتروویروس ها طراحی وتهیه گردید (۲۲و۲۳).

سپس مخلوط بافرهای A(شامل: ۳۳/۵ ml Tris-Hcl ۱ مولار، ۸/۵ ml سولفات آمونیوم ۱ مولار، ۶ ml EDTA ۰/۵ مولار،

www.SID.ir

Archive of SID

ml ۸ آب مقطر دیونیزه)، بافر B [شامل: ۲۵ میکرولیتر بافر A، ۵ میکرولیتر dNTPs، ۵ میکرولیتر پرایمر Pan E.V(Reverse)، ۵ میکرولیتر پرایمر Pan E.V(Forward)، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه] و بافر C(شامل: ۱۳/۷۵ میکرولیتر Mgcl2 ۰/۲ مولار، ۰/۷ میکرولیتر DTT ۱ مولار، ۶/۹ میکرولیتر بازدارنده RNase، ۳/۶ میکرولیتر ترانسکریپتاز معکوس AMV، ۱۳/۷ میکرولیتر DNA پلی مراز Taq، ۲۳۶/۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه) تهیه ودر فریزر۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. درمرحله بعد ۱۹ میکرولیتر بافر B حاوی پرایمر Pan E.V به همراه ۵ میکرولیتر مایع رویی کشت سلولی به تمامی ویال ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد دستگاه ترموسایکلر (Biometra) قرار داده شد. درمرحله بعد، پس از سرد کردن (به مدت ۵ دقیقه روی یخ) ۵ میکرولیتر از بافر C به هر ویال اضافه گردید. سپس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر RT-PCR انجام شد:

I) واکنش با آنزیم RT به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد و غیرفعال کردن آن در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه.

II) واکنش PCR با پرایمرهای غیر دژنره Pan E.V در شرایط ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۵۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۷۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه (برای ۳۶ سیکل) ومرحله گسترش نهایی(extention) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد. همچنین نمونه های مثبت شده با پرایمرهای Pan E.V، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Pan P.V مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور ۱۹ میکرولیتر بافر B حاوی پرایمر Pan P.V به همراه ۵ میکرولیتر مایع رویی کشت سلولی به کلیه ویال ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. درمرحله بعد پس از سردکردن ویال ها روی یخ، ۵ میکرولیتر از بافر C به هرویال اضافه گردید. درنهایت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر RT-PCR با شرایط زیر انجام شد:

I) واکنش با آنزیم RT، به مدت ۲۰ دقیقه درحرارت ۴۲ درجه سانتیگراد وغیرفعال کردن آن در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه.

II) PCR با پرایمرهای دژنره Pan P.V درشرایط ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۴۲ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه (برای ۳۰ سیکل). سپس جهت افتراق بین تیپی سوش واکسن از وحشی تمامی ویروس های پولیوی جداشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Sabin مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله آخر ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه UV Transilluminator مورد بررسی قرار گرفت (۲۴).

د)آنالیز آماری: آنالیز آماری نتایج بدست آمده با استفاده از نسخه دوازدهم نرم افزار *SPSS* وآزمون مربع کای انجام گرفت و مرز معنی داربودن نتایج $p = ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این پژوهش از آذرماه سال ۱۳۸۴ تا آبان ماه سال ۱۳۸۵، از ۶ تصفیه خانه قیطریه، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش، محلاتی با روش Grab sample، ۶۳ نمونه تهیه گردید. بیشترین جمعیت تحت پوشش مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب اکباتان با یک میلیون نفر (۸۴/۲۵٪) و شوش با صد هزار نفر (۸/۴۲٪) بود. سپس نمونه ها با روش Two-Phase تغلیظ و به منظور تشخیص انتروویروس ها با استفاده از روش های کشت سلولی و RT-PCR-ICC مورد بررسی قرار گرفتند. در روش کشت سلولی از ۶۳ نمونه مورد بررسی در رده سلولی RD از ۲۸ نمونه (فراوانی ۴۴/۴۴٪) و با روش ICC-RT-PCR از ۳۶ نمونه (فراوانی ۵۷/۱۴٪) انتروویروس جداسازی شد. همچنین در رده سلولی HEp-2 در روش کشت سلولی از مجموع نمونه های مورد بررسی از ۱۴ نمونه (فراوانی ۲۲/۲۲٪) و با روش ICC-RT-PCR از ۲۹ نمونه (فروانی ۴۶/۰۳٪) انتروویروس جداسازی گردید. اما در مجموع بدون در نظر گرفتن رده سلولی خاصی در روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه (فراوانی ۶۵/۰۷٪) و با روش کشت سلولی از ۳۳ نمونه (فراوانی ۵۲/۳۸٪) انتروویروس جداسازی شد. بیشترین میزان جداسازی انتروویروس با روش ICC-RT-PCR از سیستم تصفیه فاضلاب محلاتی و در روش کشت سلولی از سیستم تصفیه فاضلاب شوش انجام گرفت. (جداول ۱و۲ و نمودار ۱). انتروویروس های غیر قابل تیپ (NTEVs)، E13, E25 , E11 به ترتیب بیشتر از انتروویروس‌های دیگر جداسازی شد. همچنین با روش کشت سلولی (۱۵/۸۷٪) و با روش ICC-RT-PCR (۹/۵۲٪) پولیوویروس با استفاده از پرایمرهای Sabin جداسازی شد. از ویروس‌های پولیوی جداشده با روش ICC-RT-PCR، ۱ مورد ویروس P1، ۱ مورد ویروس P2 و ۴ مورد ویروس P3 شناسایی گردید. به طور کلی در این پژوهش، میزان جداسازی انتروویروس‌ها در رده سلولی RD با روش ICC-RT-PCR

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱) مقایسه دو روش کشت سلولی و *ICC-RT-PCR* درنواحی مورد پژوهش

نواحی نمونه گیری	ICC-RT-PCR (RD)	ICC-RT-PCR (HEp-2)	ICC-RT-PCR (Total)	Cell Culture (RD)	Cell Culture (HEp-2)	Cell Culture (Total)
قیطریه	۵/۱۱	۴/۱۱	۶/۱۱	۳/۱۱	۰/۱۱	۳/۱۱
زرگنده	۴/۵	۲/۵	۴/۵	۲/۵	۲/۵	۳/۵
صاحبقرانیه	۶/۱۱	۴/۱۱	۷/۱۱	۲/۱۱	۲/۱۱	۳/۱۱
اکباتان	۵/۱۱	۷/۱۱	۷/۱۱	۶/۱۱	۲/۱۱	۷/۱۱
شوش	۷/۱۳	۷/۱۳	۸/۱۳	۹/۱۳	۵/۱۳	۹/۱۳
محلاتی	۹/۱۲	۵/۱۲	۹/۱۲	۶/۱۲	۳/۱۲	۸/۱۲
جمع	۳۶/۶۳	۲۹/۶۳	۴۱/۶۳	۲۸/۶۳	۱۴/۶۳	۳۳/۶۳

عدد سمت راست خط کسری(/) مربوط به تعدادکل نمونه هاو عددسمت چپ مربوط تعداد نمونه های مثبت است.

اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۵ با روش کشت سلولی (p =۰/۰۱) داشت. با استفاده از نرم افزار *SPSS*12 و با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس آزمون مربع کای مشخص شد که میزان جداسازی در روش ICC-RT-PCR در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری را با روش کشت سلولی نشان می‌دهد (p = ۰/۰۰۴) (جدول ۲).

بحث

روش استاندارد کشت سلولی برای تشخیص ویروس‌های بیماری زای انسانی پر هزینه و زمان بر است و برای تایید نتایج مثبت به یک ماه زمان نیاز دارد. علاوه بر این به واسطه وجود بازدارنده های آلی و غیر آلی موجود در نمونه های محیطی امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب در کشت سلولی نیز وجود دارد. روش RT-PCR مستقیم به دلیل حجم کم واکنش و بازدارنده‌های طبیعی موجود در نمونه های تغلیظ شده فاضلاب، حساسیت لازم را برای جداسازی ویروس‌های روده ای ندارد. از طرفی با این روش، افتراق بین ویروس‌های عفونی و غیر عفونی امکان پذیر نیست. Margolin و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Wyn-Jones و همکاران در سال ۲۰۰۱، سه روش ICC-RT-PCR، کشت سلولی و RT-PCR را برای تشخیص انتروویروس ها، هپاتیت A و روتاویروس ها، نمونه های آب و فاضلاب را با هم مقایسه و پس از ۵ تا ۷ روز گرمخانه گذاری بهترین روش جداسازی انتروویروس‌ها را روش ICC-RT-PCR تعیین نمودند(۲۵). Reynolds و همکاران در سال ۲۰۰۱ از روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس‌ها و ویروس هپاتیت A در نمونه های محیطی استفاده نمودند (۲۶).

در پژوهش انجام شده توسط این محققین با استفاده از روش ICC-RT-PCR و تلقیح PFU ۱۰ انتروویروس به کشت سلولی، پس از ۵ ساعت در ۴ فلاسک از ۵ فلاسک مورد بررسی و پس از ۱۰ ساعت در تماس فلاسک ها، نتایج مثبت PCR حاصل گردید. همچنین پس از ۲۰ و ۲۵ ساعت به ترتیب ۱PFU و کمتر از ۱PFU ویروس با استفاده از روش ICC-RT-PCR شناسایی گردید.

هدف از این پژوهش، ارزیابی حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص اختصاصی و سریع ویروس‌های سیتوپاتوژنیک و غیرسیتوپاتوژنیک در نمونه‌های فاضلاب و مقایسه آن با نتایج کشت سلولی بود. در این پژوهش، پس از تلقیح نمونه‌های تغلیظ شده فاضلاب با روش Two-Phase از دو رده سلولی RD و HEp-2 استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان دهنده حساسیت بیشتر رده سلولی RD نسبت به HEp-2 می‌باشد. اما به دلیل جداسازی طیف متفاوتی از انتروویروس ها در هرکدام از این دو رده سلولی، استفاده هم زمان از این دو رده سلولی برای افزایش حساسیت روش ICC-RT-PCR پیشنهاد می‌شود. همچنین حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس‌ها با TCID50 کمتر از ۰/۰۱ ارزیابی شد که این مسأله می‌تواند نشان دهنده قابل قبول بودن و حساسیت قابل توجه این روش برای تشخیص انتروویروس‌های موجود در فاضلاب باشد. معیار موفقیت آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مراحل آخر ریشه‌کنی فلج اطفال، تشخیص انتروویروس های غیر پولیویی در نمونه های فاضلاب است. مطابق بولتن ارائه شده توسط WHO در سال ۲۰۰۳ حداقل ۳۰٪ از نمونه های فاضلاب تغلیظ شده از یک

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه دوروش کشت سلولی ICC-RT-PCR در دو رده سلولی HEp-2 و RD

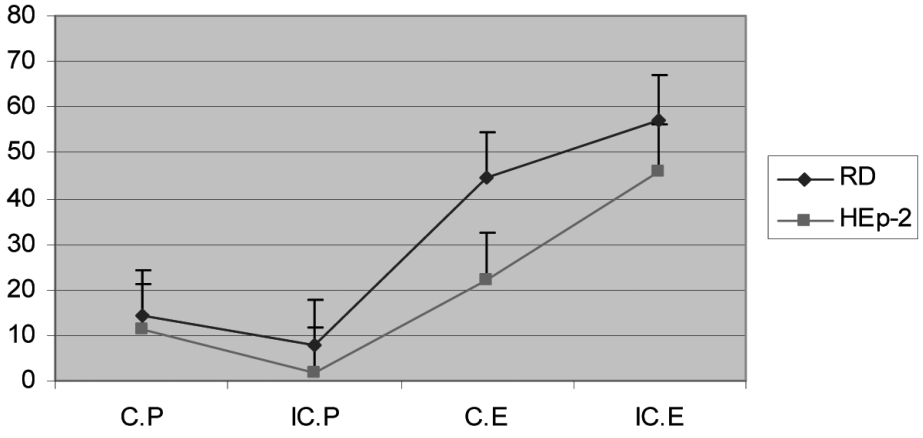
رده سلولی	RD		HEp-2		جمع کل	
روش مورد بررسی	Cell Culture	ICC-RT-PCR	Cell Culture	ICC-RT-PCR	Cell Culture	ICC-RT-PCR
نوع ویروس	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد
Poliovirus	۹ ۱۴/۲۸	۵ ۷/۹۳	۷ ۱۱/۱۱	۱ ۱/۵۸	۱۰ ۱۵/۸۷	۶ ۹/۵۲
Enteroviruses	۲۸ ۴۴/۴۴	۳۶ ۵۷/۱۴	۱۴ ۲۲/۲۲	۲۹ ۴۶/۰۱	۳۳ ۵۲/۳۸	۴۱ ۶۵/۰۷

Grab Sample بایستی واجد انتروویروس‌های غیر پولیویی (N.P.E.V) باشد(۲۷).

در این پژوهش از کل نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Pan E.V در روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه انتروویروس جداسازی گردید و پس از ارزیابی با پرایمرهای Pan PV از ۶ نمونه ویروس پولیو جداسازی شد. در انتها، با پرایمرهای اختصاصی Sabin مشخص شد که همگی ویروس های پولیوی جدا شده مربوط به سویه واکسن می باشند. این مسأله نیز می تواند تایید دیگری بر ریشه کنی ویروس پولیوی وحشی و پوشش مناسب ایمنی در این منطقه باشد. پس به طور کلی روش پیشنهاد شده ICC-RT-PCR به دلیل حساسیت زیاد و کفایت لازم جهت حذف بازدارنده های آلی می تواند راه حل مناسبی جهت پایش محیطی و ارزیابی اپیدمیولوژیکی بیماری های انتروویروس باشد. در این پژوهش با توجه به کیفیت و دقت بالاتر، از روش نمونه گیری Grab sample استفاده شده و از ۶۳ نمونه فاضلاب مورد بررسی، ۲۸ انتروویروس با روش کشت سلولی (۴۴/۴۴٪) و ۳۶ انتروویروس غیرپولیویی با استفاده از روش(۵۷/۱۴٪) ICC-RT-PCR جداسازی شد. این مساله نشان دهنده کیفیت مناسب نمونه گیری و کارایی هر دو روش تشخیص کشت سلولی و ICC-RT-PCR برای جداسازی انتروویروس‌هایی می‌باشد. در پژوهش های بعدی، کاربرد همزمان رده های مختلف کشت سلولی مانند: A549، BGMK، CACO-2، VERO، L20B به منظور تشخیص انتروویروس های توسط روش RT-PCR-ICC و مقایسه آن با نتایج کشت سلولی و ارزیابی حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص روتاویروس‌ها و آدنوویروس‌ها، انتروویروس ها در نمونه های فاضلاب پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری

به طور کلی روش پیشنهاد شده ICC-RT-PCR به دلیل حساسیت زیاد و کفایت لازم جهت حذف بازدارنده های آلی می‌تواند راه حل مناسبی جهت پایش محیطی و ارزیابی اپیدمیولوژیکی بیماری های انتروویروسی درکشور باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که تشخیص انتروویروس ها درفاضلاب توسط روش ICC-RT-PCR نیازی به مرحله استخراج ندارد و بدون



نمودار ۱) مقایسه ICC-RT-PCR و کشت سلولی در رده‌های سلولی RD و HEp-2, C.P=Cell Culture (Poliovirus), IC.P=ICC-RT-PCR (Poliovirus)

C.E=Cell Culture (Enterovirus), IC.E=ICC-RT-PCR (Enterovirus)

www.SID.ir

Archive of SID

تقبل هزینه و مشکلات ناشی از استخراج، امکان تکثیر ژنوم انتروویروس‌های موجود در فاضلاب با تکنیک PCR وجود خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی برای پشتیبانی مالی در اجرای این طرح پژوهشی کمال امتنان را دارد.

References

1. Pallansch, M. and Roos, R.-P, Enteroviruses; Polioviruses, Coxackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In Filds. B.N et al (ed.), Fileds virology, 4th ed, Lippincott Raven., New Yourk, 2001; PP: 723-776.
2. Muir, P., Kammerer, U., Korn, K., et al, Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. Clinical Microbiology reviews, 1998; 11, PP: 202-227.
3. Warden, P.-S., Ballester, N.-A., Moore, A.-E., et al, Detection of Enteric viruses in Archived ICR sample concentrates using and integrated cell culture-Nested PCR Technique. Research and Development. Drinking water, 1999; PP: 1-4.
4. Federal - Provincial - Territorial committee on Drinking water, Virological Quality of Drinking water.Draft drinking water Guidelines for viruses,2003; PP:1-24.
5. Tougianidou, D. and Botzenhart, K, Molecular techniques for the detection of Enteroviruses in water. OECD workshop Molecular methods for safe drinking water, 1998; PP: 1-4.
6. Abbaszadegan, M., Stewart, P.and Lechevallier, M, A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl. Environ. Microbiol,1999 ; 65 , PP: 444-449.
7. Abbaszadegan, M, Advanced Detection of viruses and protozoan parasites in water.Reviews in Biology and Biotechnology, 2001; 1, PP: 21-26.
8. Chomczynski, P. and Sacchi, N, Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocynate - phenol - chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987; 162, PP: 156-159.
9. Abbaszadegan, M., Huber, M.-S., Gerba, C.-P., et al, Detection of Enteroviruses in groundwater with the Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ. Microbiol, 1993; 59, PP: 1318-1324.
10. Berger, M, Movement toward making the Ground water (Disinfection) Rule a reality, OECD, 1997; PP: 1-8.
11. Bosh, A, Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Internal Microbial 1998; 1, PP: 191-196.
12. Reynolds, K.-A., Gerba, C.-P. and Pepper, I.-L, Detection of Infectious Enteroviruses by an integrated cell culture -PCR procedure. Appl. Environ. Microbiol, 1996; 62, PP: 1424-1427.
13. Chapron, C.-D., Ballester, N.-A., Fontaine, J.-H., et al, Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenovirus Type 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture - Nested PCR procedure. Appl. Environ. Microbiol, 2000; 66, PP: 2520-2525.
14. Ballester, N.-A., Rex, A.-C. and Coughlin, K.-A, Study of anthropogenic viruses in Boston Harbar , charles river , cottage form CSO Treatment facility and deer island treatment plant 1995-2003. MWRA virus Report, 2004; PP: 15-57.

۱۵. کارگر. محمد، خدایی. سید حامد، رضوی. سعیده السادات و همکاران، پایش محیطی ویروس پولیو در استان سیستان و بلوچستان و شناسایی ویروس های جدا شده در کشت سلولی با روش های میکرونوترالیزاسیون و افتراق بین تیپی توسط روش های الایزا و پروب هیبریدیزاسیون. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران. دوره۱، شماره۲، پی در پی۴۰، تابستان ۱۳۸۴، صفحات ۵۱-۵۸.

۱۶. کارگر. محمد، رضوی. سعیده السادات، خدایی. سید حامد و همکاران، ارزیابی چرخش محیطی انتروویروس های غیرپولیویی درفاضلاب وآب های سطحی استان سیستان وبلوچستان در رده های کشت سلولی RD و Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase. مجله بیماری های عفونی وگرمسیری، سال دهم، شماره ۳۰، ۱۳۸۴، صفحات۳۳ تا۴۰.

۱۷. کارگر. محمد، ساریجلو. محبوبه، طباطبائی. حمیده و همکاران، چرخش محیطی انتروویروس های غیرپولیویی درفاضلاب های شهر تهران در رده های کشت سلولی RD و Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase. مجله دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی. سال سوم، شماره ۲، ۱۳۸۳، صفحات ۳۷ تا ۴۸.

۱۸. کارگر. محمد، صادقی پور. سارا، طباطبایی. حمیده و همکاران، ارزیابی روش های مختلف حذف بازدارنده های آلی جهت راه اندازی یک روش حساس به منظور پایش مستقیم بیماری های عفونی انتروویروسی در نمونه های فاضلاب. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران،دوره۱۶،شماره ۲،پی در پی۴۴،تابستان ۱۳۸۵،صفحات۶۹تا۷۷.

۱۹. کارگر. محمد، طباطبایی. حمیده، ساریجلو. محبوبه، صادقی پور. سارا و همکاران، پایش محیطی ویروس پولیو در فاضلاب های شهر

www.SID.ir

Archive of SID

تهران و شناسایی ویروس جدا شده در کشت سلولی با روش میکرونوترالیزاسیون و افتراق بین تیپی توسط روش های الیزا و پروب هیبریدیزاسیون، مجله پژوهشی حکیم، دوره ۱۰، شماره ۲، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۴۳ تا۴۹.

۲۰. کارگر. محمد، خدایی. سید حامد، رضوی. سعیده السادات و همکاران، پایش ویروس پولیو و انتروویروس های غیر پولیویی از نمونه های فاضلاب و آب های سطحی استان فارس. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نهم، شماره، یک، ۱۳۸۴، صفحات ۱۵۹-۱۶۶.

21. Hovi, T., Stenvik, M. and_Partanen, M, Poliovirus Surveillance by examining sewage specimens, Quantitative recovery of virus after introduction into sewage at remove upstream location. Epidemiology and Infection, 2001; 127, PP: 101-106.
22. World Health Organization, Polio Laboratory Manual, under revision; available on the Internet at http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/poliomanual%20Version1 -May01.pdf. (2001).
23. C.D.C,Poliovirus Diagnostic PCR, Kuwait Polio ITD Workshop. EVS/ CDC 11/02, 1999; PP: 1-13.
24. Kilpatric, D.-R., Nottay, B., Yang, C.-F., Yang, S.-J,. et al,Group_Specific Identification Of Poliovirus by PCR using primers containing mixed Base or Deoxyinosine Residues at positions of codone Degeneracy. J of Clinical Microbiol, 1996; 34, PP: 2990-2996.
25. Wyn-Jones, A.-P. and Sellwood, J, Entric viruses in aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol, 2001; 91, PP: 945-962.
26. Reynolds, K.-A., Gerba, C. - P., Abbaszadegan, M., et al,ICC-PCR detection of Enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. Can. J. Microbiol, 2001; 47, PP: 153-157.
27. World Health Organization, Guidelines for environmental surveillance of polioviruse circulation, under revision; available on the Internet at http://www.who.int/vaccines-documents /WHO/V&B 03.03,2003.

www.SID.ir