Archive of SID

فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری‌های عفونی و گرمسیری
سال یازدهم، شماره ۳۲، صفحات ۳۵ تا ۴۳، بهار ۱۳۸۵

راه اندازی روش حساس تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR(ICC-RT-PCR) برای تشخیص انتروویروس‌ها از نمونه‌های تغلیظ شده فاضلاب شهر تهران

دکتر محمد کارگر[۱]، سارا صادقی پور*[۲] ، دکترمحبوبه ساریجلو[۳]، دکتر حمیده طباطبائی[۳]، دکتر رخشنده ناطق[۴]

۱. PhD میکروبیولوژی ، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۲. MSc میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۳. PhD ویروس شناسی ، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. PhD ویروس شناسی ، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

*آدرس برای مکاتبه : شیراز ـ خیابان ستارخان- کوچه ۱۸- پلاک ۲۳۰، Saramicro1@yahoo.com

دریافت مقاله: آذر هشتاد و چهار پذیرش برای چاپ: اسفند هشتاد و چهار

چکیده

سابقه وهدف : *انتروویروس‌ها از جمله پاتوژن‌های مهم انسانی خانواده پیکورناویریده هستند که بر اساس بیماری زایی به گروههای پولیوویروس، کوکساکی A و B، اکوویروس و انتروویروس‌های جدید طبقه‌بندی شده‌اند. این ویروس‌ها پس از تکثیر در دستگاه گوارش یا تنفسی و ورود به سیستم گردش خون می‌توانند عفونت سیستمیک را ایجاد کنند. هدف از این پژوهش ارزیابی مستقیم نمونه‌های فاضلاب تغلیظ شده با استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR جهت بررسی انتروویروس‌ها در فاضلاب شهر تهران می‌باشد.*

مواد وروش ها : *در این مطالعه توصیفی ۶۳ نمونه تهیه شده از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب شهر تهران پس از تغلیظ با روش Two-Phase مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تمامی نمونه‌ها به کشت‌های سلولی حساس RD و Hep-2 تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در حرارت ۳۶ درجه با استفاده از پرایمرهای Pan E.V و سپس با استفاده از پرایمرهای Pan P.V وپرایمرهای اختصاصی Sabin بر روی نمونه‌های کشت سلولی تست RT-PCR انجام شد.*

یافته‌ها: *از ۶۳ نمونه مورد بررسی، از ۴۱ نمونه (فراوانی ۶۵/۰۷٪) انتروویروس جداسازی گردید. در انتها نیز با انجام تست RT-PCR اختصاصی، فراوانی ویروس پولیو ۹/۵۲٪ تشخیص داده شد.*

نتیجه گیری : *حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس‌ها کمتر از 0.01 TCID50 ارزیابی گردید. این مساله می‌تواند نشان دهنده قابل قبول بودن و حساسیت قابل توجه این روش برای تشخیص انتروویروس‌های موجود در نمونه‌های فاضلاب باشد.*

واژگان کلیدی : ***انتروویروس‌ها ، فاضلاب ، ICC-RT-PCR***

مقدمه

انتروویروس‌ها درخانواده پیکورناویریده قرار دارند و شامل پولیوویروس‌ها ، کوکساکی ویروس‌های A وB، اکوویروس‌ها وانتروویروس‌های جدید ۶۸ تا ۷۱ می‌شوند. این ویروس‌ها بیماری هایی مانند فلج شل حاد (AFP)، گاستروانتریت،

www.SID.ir

Archive of SID

میوکاردیت، منتژیت آسپتیک، هرپانژین، پولیومیلیت، آنسفالیت، کاردیومیوپاتی را در انسان ایجاد می‌نمایند (٤-١).

افراد مسن، اطفال وافراد دارای سیستم ایمنی تضعیف شده استعداد بیشتری برای ابتلا به عفونت‌های شدیدتر انتروویروسی دارند (۵) .

از حدود نیم قرن پیش تاکنون هدف از تلاش‌های ویروس شناسان محیطی، شناسایی ویروس پولیو و سایر انتروویروس‌ها در نمونه‌های فاضلاب و آبهای آشامیدنی بوده است (۶). تمامی ویروس‌های بیماریزای شناخته شده موجود در محیط‌های آبی که نقش مهمی را در سلامت عمومی ایفا می‌نمایند، از راه مدفوعی- دهانی منتقل می‌گردد. انتروویروس‌ها به ویژه ویروس پولیو، پس از ورود از طریق دهان وتکثیر در بافت‌های لنفواپیتلیال، می‌توانند به مدت چند هفته به میزان 10^6 عدد در هرگرم مدفوع افراد عفونی، دفع و وارد فاضلاب گردند و بدین ترتیب امکان انتقال فرد به فرد و آلودگی آبهای آشامیدنی و مراکز پرورش صدف و ماهی وجود دارد (۵).

Metcalf وهمکاران (۷) درسال ۱۹۹۵ نشان دادند، مقدار زیادی از ویروس‌های روده‌ای در آبهای دارای آلودگی مدفوعی با منشاء انسانی می‌تواند درصدف داران (Shellfish) مجتمع و پس از خوردن آن به صورت خام به انسان منتقل گردد. Poyry و همکاران (۸) درسال ۱۹۸۸ نشان دادند که چرخش ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیرپولیویی در جمعیت به سهولت از طریق فاضلاب می‌تواند انجام شود. همچنین تجزیه فاضلاب می‌تواند راه مناسبی برای ارزیابی کفایت عملکرد واکسیناسیون با واکسن OPV باشد.

یکی از روش‌های متداول تشخیص انتروویروس‌ها استفاده از رده‌های حساس مختلف کشت سلولی مانند L20B ، RD ، BGM ، Hep-2 و VERO است (۹،۲). اما به دلیل تنوع وتعدد انتروویروس‌ها، حساسیت رده‌های مختلف کشت سلولی برای جداسازی انتروویروس‌ها یکسان نیست و برای جداسازی تمامی انتروویروس‌ها در نمونه‌های بالینی و محیطی نیاز به استفاده همزمان از چند رده کشت سلولی وجود دارد. از طرفی هنوز هیچ رده سلولی حساسی برای تشخیص تمامی سروتیپ‌های شناخته شده انتروویروسی شناسایی نشده است. همچنین بعد از کشت سلولی نیاز به انجام تست‌های تاییدی مانند نوترالیزاسیون با استفاده از آنتی‌سرمهای اختصاصی برای هرکدام از انتروویروس‌ها وجود دارد. درمورد ویروس پولیو گذشته از روش نوترالیزاسیون اختصاصی جهت افتراق بین تیپی، بین سوش های وحشی و واکسن بایستی از تست‌هایی مانند الایزا، پروب هیبریدیزاسیون، RT-PCR و RFLP نیز استفاده نمود. به همین دلیل به طور کلی استفاده از روش کشت سلولی زمان بر و پرهزینه است (۱۰، ۱۱،۱۶).

با توجه به مشکلات یادشده استفاده از روش‌های مولکولی مانند RT-PCR مورد توجه ویروس شناسان محیطی برای تشخیص مستقیم انتروویروس‌ها وسایر ویروس‌های روده‌ای بوده است. اما به دلیل وجود بازدارنده‌های آلی موجود درفاضلاب استفاده از این روش مشکلات زیادی را به همراه داشته است. Chomczynski وهمکاران (۱۲) درسال ۱۹۸۷، Abbaszadegan و همکاران (۱۳) درسال ۱۹۹۳ ، Berger و همکاران (۱۴) در سال ۱۹۹۷ وهمچنین Bosh وهمکاران (۶) درسال ۱۹۹۸، از روش‌هایی مانند گوانیدینیوم تیوسیانات/ فنل ـ کلروفرم، Antigen Capture-، Chelex-100 resin، Sephadex G-200 PCR، Dialysis، Proteinase، Nucleic acid adsorption و Lyophilization جهت حذف باز دارنده‌ها به منظور تشخیص مستقیم انتروویروس‌ها استفاده نمودند.

برای اولین بار Reynolds وهمکاران (۱۵) درسال ۱۹۹۶، استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR ، (Integrated Cell-Culture-RT-PCR=ICC-RT-PCR) را به منظور تشخیص وجود انتروویروس‌ها در نمونه‌های فاضلاب در مدت ۲۴ ساعت پیشنهاد کردند. سپس Tougianidou وهمکاران (۱۶) درسال ۱۹۹۸، Chapron وهمکاران (۱۱) درسال ۲۰۰۰ ، Ballester و همکاران (۱۷) درسال ۲۰۰۳ و Dale و همکاران (۵) درسال

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰۰۳ از روش ICC-RT-PCR به منظور شناسایی انتروویروس‌ها، آستروویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و روتاویروس‌ها، در آبهای سطحی، رودخانه، دریا وفاضلاب استفاده نمودند.

ما در پژوهش‌های قبلی با استفاده از رده‌های کشت سلولی RD ، L20B و Hep-2 وهمچنین دو روش تغلیظ مختلف Pellet و Two-phase جهت پایش محیطی انتروویروس‌ها در فاضلاب و آب‌های سطحی شهر تهران و استان سیستان و بلوچستان استفاده نمودیم (۲۷،۲۶).

هدف از این پژوهش راه اندازی واستفاده از روش مستقیم ICC-RT-PCR برای حذف بازدارنده‌ها، جهت تشخیص انتروویروس‌ها از نمونه‌های تغلیظ شده فاضلاب شهر تهران است.

مواد وروش‌ها

الف) نمونه گیری:

با همکاری شرکت آب و فاضلاب تهران از آذرماه 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) بوده و از قسمت ورودی فاضلاب (Inffluent) جمع آوری شدند. حجم تمامی نمونه‌های ارسالی یک لیتر بود و توسط ظروف پلاستیکی درپوش دار به آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز کشوری فلج اطفال (NPL) واقع درانستیتو دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل می‌گردید.در تمامی موارد مشخصات نمونه فاضلاب ارسالی (محل نمونه برداری، تاریخ، pH وحرارت نمونه) در پرسشنامه تنظیمی ثبت شد. در انتقال و نگهداری نمونه‌ها قبل از تلقیح کشت سلولی رعایت زنجیره سرد و نگهداری در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

ب) تیمار نمونه‌ها:

نمونه‌های فاضلاب با روش تغلیظ تغییر یافته Two-Phase مورد بررسی قرار گرفت. روش Two-Phase، با استفاده از روش پیشنهادی Hovi وهمکاران (۲۴) درسال ۲۰۰۱ به صورت زیر انجام شد:

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) در حرارت ۴ درجه نگهداری شد. سپس ۴۰۰ میلی لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ مرحله اول را داخل یک ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و PEG6000 ، ۳۰٪ (Merck) و دکستران ۲۰٪ مربوط به باکتری *Leuconostoc mesenteroides* (D5376,Sigma) و Nacl (Merk) 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 جداکننده (Separation funnel) ۴۰۰ میلی لیتری ریخته ویک شب (Overnight) در یخچال ۴ درجه نگهداری گردید. در مرحله بعد ۵ میلی لیتر از لایه رسوب انتهایی (bottom phase) ولایه تشکیل شده دربین دوفاز (Interphase) جمع آوری شد وبه یکی از لوله‌های Pellet مرحله قبل اضافه گردید. درمرحله آخر برای از بین بردن باکتری ها وقارچ ها به ۴ میلی لیتر از نمونه رسوب (Pellet) ومخلوط تغلیظ شده (Two-phase) فاضلاب ، یک میلی لیتر کلروفرم (Merk) اضافه و ۲۰ دقیقه در دور 2000 rpm بر روی شیکر لوله قرار دادیم و در نهایت محتویات لوله، برای مدت ۱۰ دقیقه در دور 2000 rpm حرارت ۵ درجه سانترفیوژ ومایع تیمار شده رویی در کرایوتیوب‌های استریل جمع آوری گردید (۲۲، ۲۳،۲۶،۲۷).

ج) تست Integrated Cell Culture RT-PCR(ICC-RT-PCR) :

برای انجام این روش، ابتدا رده‌های سلولی RD, Hep-2 برای جداسازی انتروویروس‌ها تهیه وسپس ۲۰۰ میکرولیتر از هرنمونه فاضلاب به چهار لوله کشت سلولی (هرکدام ۲ لوله) تلقیح

www.SID.ir

Archive of SID

گـردید. درابتدا به منظور یافتن مناسب‌ترین زمان انکوباسیون چند رده سـلولی تلقـیح شـده، بـه صـورت تصـادفی انـتخاب و در زمـان‌هـای صـفر، ۲۴ و ۴۸ سـاعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۶ درجـه بـا روش RT-PCR و پرایمـرهای اختصاصی مورد بررسی قـرار گرفـت. بـه دلـیل مناسب‌تر بودن زمان گرمخانه گذاری ۲۴ سـاعت، جهت ارزیابی تمامی نمونه‌های مورد بررسی از این زمان برای انجام تست استفاده گردید. بدین منظور هردو لوله مربوط به رده سـلولی RD و Hep-2 جداگانـه بـا هم مخلوط وپس از فریز کـردن دردمـای ۲۰- درجه وگرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) بـه مدت یک دقیقه در دورrpm 13200، سانترفیوژ و ۵ میکرولیـتر از مـایع رویی آن به منظور انجام RT-PCR جداسازی گـردید . برای انجام RT-PCR درابتدا پرایمرهای اختصاصی Pan E.V ، Pan P.V و Sabin (I ، II وIII)، طـبق توصـیه سـازمان بهداشـت جهانـی بـرای انـتهای حفاظت شده ´۵ انتروویروس‌ها طراحی و مطابق جدول ۱ طراحی و تهیه گردید.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی جهت تشخیص انتروویروس‌ها و ویروس پولیو

اسم پرایمر	پرایمر	آمپلیکون	موقعیت
Pan.Enterovirus (Pan E.V)	5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3' 5'-TCCGGCCCCTG AATGCGGCTAATCC-3'	114 bp	335-448
Pan Poliovirus* (Pan P.V)	5'-TTIAIIGCRTGICCRTTRTT-3' 5'-CITAITCIMGITTYGAYATG-3'	79 bp	2875-2954
Sabin 1 (Sabins)	5'-TCCACTGGCTTCAGTGTT-3' 5'-AGGTCAGATGCTTGAAAGC-3'	97 bp	116-162
Sabin 2 (Sabins)	5'-CGGCTTTGTGTCAGGC-3' 5'-CCGTTGAAGGGATTACTAAA-3'	71 bp	116-162
Sabin 3 (Sabins)	5'-AGTATCAGGTAAGCTATCC-3' 5'-AGGGCGCCCTAACTTTG-3'	53 bp	116-162

* پرایمرهای دژنره : Inosin = I ; T ,C= Y ; G , A=R ; C , A = M

سـپس مخلـوط بافرهایA (شامل:Tris-Hcl ۳۳/۵ ml ۱ مولار، ml ۸/۵ سـولفات آمونـیوم ۱ مـولار، EDTA ۶ ml ۰/۵ مـولار، ml ۸ آب مقطـر دیونـیزه)، بافـر B (شـامل: ۲۵ میکرولیـتر بافـر A ، ۵ میکرولیـتر dNTPs، ۵ میکرولیـتر پرایمـر Pan E.V، ۵ میکرولیـتر پرایمـر Pan E.V، ۱۵۰ میکرولیـتر آب مقطـر دیونـیزه) و بافـر C (شـامل: ۱۳/۷۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ ۰/۲ مولار، ۰/۷ میکرولیتر DTT ۱ مـولار، ۶/۹ میکرولیتر RNase inhibitor ، ۳/۶ میکرولیتر AMV reverse transcriptase، ۱۳/۷ میکرولیتر Taq DNA Polymerase ۲۳۶/۳ میکرولیـتر آب مقطـر دیونـیزه) تهیه ودر فریزر۲۰- درجه نگهـداری شـد. درمـرحله بعـد ۱۹ میکرولیتر بافرB حاوی پرایمر Pan E.V بـه همـراه ۵ میکرولیتر مایع رویی کشت سلولی به کلیه ویالهـا اضـافه و ۵ دقـیقه دردمـای 95^0c دستگاه ترموسایکلر قرار داده شـد. درمرحله بعد، پس از سرد کردن(به مدت ۵ دقیقه روی یـخ) ۵ میکرولیـتر از بافـر C به هر ویال اضافه گردید. سپس با اسـتفاده از دسـتگاه ترموسـایکلر(Biometra) بـا شرایط زیر RT-PCR انجام شد:

I) واکـنش بـا آنـزیم RT بـه مدت ۲۰ دقیقه در حرارت 42^0c و غیرفعال کردن آن در حرارت 95^0c به مدت ۳ دقیقه.

II) PCR بـا پرایمـرهای غـیر دژنره Pan E.V در شرایط 95^0c، ۴۵ ثانـیه؛ 55^0c، ۴۵ ثانـیه؛ 70^0c، ۴۵ ثانـیه (بـرای ۳۶ سـیکل) و مرحله extention نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای 70^0c .

همچنیـن نمونه‌های مثبت شده با پرایمرهای Pan E.V، با استفاده از پرایمـرهای اختصاصـی Pan P.V مـورد بررسـی قـرار گرفتند. بدیـن مـنظور ۱۹ میکرولیـتر بافـر B حـاوی پرایمـر Pan P.V به همـراه ۵ میکرولیـتر مایع رویی کشت سلولی به کلیه ویالها اضافه و ۵ دقـیقه در دمـای 95^0c دسـتگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در مـرحله بعـد پـس از سـردکردن ویال ها روی یخ، ۵ میکرولیتر از بافـر C بـه هـر ویال اضافه گردید. درنهایت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) RT-PCR با شرایط زیر انجام شد:

I) واکـنش بـا آنزیم RT ، به مدت ۲۰ دقیقه درحرارت $42c^0$ و غیر فعال کردن آن در حرارت 95^0c به مدت ۳ دقیقه.

II) PCR بـا پرایمـرهای دژنـره Pan P.V در شـرایط 95^0c، ۴۵ ثانـیه؛ 42^0c، ۴۵ ثانـیه؛ 60^0c، ۴۵ ثانـیه (بـرای ۳۰ سـیکل).سپس جهـت افـتراق بیـن تیپـی سـوش واکسـن از وحشـی تمامـی ویـروس‌هـای پولیوی جداشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Sabin مورد بررسی قرار گرفتند.

در مرحله آخر۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ واجـد اتـیدیوم بـروماید منـتقل وپـس از الکـتروفـورز بـه وسـیـله دستگاه UV Transilluminator مورد بررسی قرار گرفت (۲۴،۲۵).

www.SID.ir

Archive of SID

د)آنجزیه و تحلیل آماری:

تجـزیه و تحلـیل آمـاری نتایج بـدست آمـــده با استفاده از نرم افزار SPSS Ver12 وآزمون Chi–Square Tests انجام شد. مرز معنی‌داری روی ۰/۰۵ قرار داده شد.

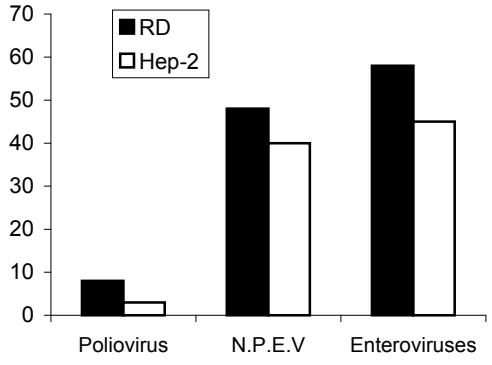
یافته‌ها

در ایـن پژوهش از آذرماه سال ۱۳۸۱ تا آبان ماه سال ۱۳۸۲، از ۶ تصـفیه خانـه قـیطریه، زرگـنده، صـاحبقرانیه، اکـباتان ، شـوش، محلاتـی، با روش Grab sample، ۶۳ نمونه تهیه گردید. بیشترین جمعیت تحت پوشش مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب اکباتان با یـک میلـیون نفر (۸۴/۲۵٪) وشوش با صد هزار نفر (۸/۴۲٪) بود. سـپس نمونه ها با روش Two-phase تغلیظ وبه منظور تشخیص انـتروویروس‌هـا با استفاده از روش ICC-RT-PCR مورد بررسی قـرار گرفتـند. از مجموع ۶۳ نمونه جمع آوری شده توسط روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه (۶۵/۰۷٪) انتروویروس و از ۶ نمونه (۹/۵۲٪) پولـیوویروس جداسـازی گـردید. بیشـترین فراوانـی جداسازی انتروویروس‌ها در روش ICC-RT-PCR از رده سلولی RD مـربوط به تصفیه خانه محلاتی (فراوانی ۱۴/۲۸٪) و بیشترین فراوانی جداسازی انتروویروس‌ها از رده سلولی Hep-2 مربوط به تصفیه خانه‌های اکباتان و شوش (فراوانی ۱۱/۱۱٪) بود. اما درکل مـیزان جداسـازی از رده سـلولی RD (فراوانی ۵۷/۱۲٪) اختلاف معنـی داری را بـا رده سـلولی Hep-2 (فراوانی۴۶/۰۱٪) در سطح ۰/۰۵ داشـــت. امـــا ارتـــباط مـــعنـــی داری بیـــن تعـــداد انـتروویروس‌هـای جدا شده ونواحی مورد پژوهش وجود نداشت (جدول ۲).

مطـابق بـا جـدول شـماره ۳ ، بیشـترین مـیزان جداسـازی انـتروویروس‌هـای غیرپولیویـی (۱۵/۸۷٪) از رده سـلولی RD درفصل پاییز و از رده سلولی Hep-2 (۱۴/۲۸٪) درفصل زمستان انجـام شد. همچنین بیشترین میزان جداسازی ویروس پولیو(۳/۱۷ ٪) از رده سـلولی RD در فصـول بهـار وپاییـز و از رده سـلولی Hep-2 (۱/۵٪) درفصل پاییز انجام گرفت .

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق تعداد ویروس‌های جدا شده با روش ICC-RT-PCR در دو رده سلولی

روش	ICC-RT-PCR		
رده سلولی	RD	Hep-2	مجموع
واحدهای پژوهش	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)
قیطریه	۵ (۷/۹۳)	۴ (۶/۳۴)	۶ (۹/۵۲)
زرگنده	۴ (۶/۳۴)	۲ (۳/۱۷)	۴ (۶/۳۴)
صاحبقرانیه	۶ (۹/۵۲)	۴ (۶/۳۴)	۷ (۱۱/۱۱)
اکباتان	۵ (۷/۹۳)	۷ (۱۱/۱۱)	۷ (۱۱/۱۱)
شوش	۷ (۱۱/۱۱)	۷ (۱۱/۱۱)	۸ (۱۲/۶۹)
محلاتی	۹ (۱۴/۲۸)	۵ (۷/۹۳)	۹ (۱۴/۲۸)
جمع	۳۶ (۵۷/۱۲)	۲۹ (۴۶/۰۱)	۴۱ (۶۵/۰۷)



نمودار-۱ : توزیع فراوانی مطلق تعداد ویروس‌های جدا شده با روش ICC-RT-PCR در دو رده سلولی

بـا اسـتفاده از پرایمـرهای اختصاصـی Sabin مشخص گردید که همـه ویـروس‌هـای پولـیوی جداشـده، مـربوط به سوش واکسن (SL) مـی‌باشـند. از ۶ ویـروس پولـیوی جداشـده (SL)، ۱مورد ویـــروس P۱، ۱ مـــورد ویـــروس P۲ و ۴ مـــورد ویـــروس P۳ جداســـازی گـــردید. پـــس از بررســـی نـــتایج بـــا اســـتفاده از نـرم افـزار SPSS12 و انجـام آزمون Chi-Square Tests مشخص شـد کـه بیـن رده سـلولی RD (فراوانـی ۵۷/۱۲٪) و رده سـلولی Hep-2 (فراوانـــی ۴۶/۰۱٪) در روش ICC-RT-PCR در ســـطح ۰/۰۵ (P Value=۰) اختلاف معنی داری وجود دارد(نمودار۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق ونسبت (درصد) تعداد ویروس‌های جدا شده بر حسب فصل در روش ICC-RT-PCR

ویروس		پولیو ویروس		انتروویروس‌های غیرپولیویی		انتروویروس	
رده سلولی		RD	Hep-2	RD	Hep-2	RD	Hep-2
فصل		تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)
	بهار	۲ (۳/۱۷)	۰ (۰)	۵ (۷/۹۳)	۴ (۶/۳۴)	۸ (۱۲/۶۹)	۵ (۷/۹۳)
	تابستان	۰ (۰)	۰ (۰)	۶ (۹/۵۲)	۴ (۶/۳۴)	۷ (۱۱/۱۱)	۵ (۷/۹۳)
	پاییز	۲ (۳/۱۷)	۱ (۱/۵۸)	۱۰ (۱۵/۸۷)	۸ (۱۲/۶۹)	۱۲ (۱۹/۰۴)	۹ (۱۴/۲۸)
	زمستان	۱ (۱/۵۸)	۰ (۰)	۹ (۱۴/۲۸)	۹ (۱۴/۲۸)	۹ (۱۴/۲۸)	۱۰ (۱۵/۸۷)
	جمع	۵ (۷/۹۲)	۱ (۱/۵۸)	۳۰ (۴۷/۶۱)	۲۵ (۳۹/۶۸)	۳۶ (۵۷/۱۲)	۲۹ (۴۶/۰۱)

بحث

روش استاندارد کشت سلولی برای تشخیص ویروس‌های بیماری زای انسانی پرهزینه وزمان براست و برای تائید نتایج مثبت به یک ماه زمان نیاز دارد . گذشته از این به واسطه وجود بازدارنده های آلی وغیرآلی موجود درنمونه های محیطی امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب درکشت سلولی نیز وجود دارد . گذشته از این ویروس‌های روده ای مانند : هپاتیت A، روتاویروس‌ها ، نورواک ویروس‌ها وکوکساکی ویروس‌های گروه A به راحتی درکشت سلولی CPE ایجاد نمی کنند . روش RT-PCR مستقیم به دلیل حجم کم واکنش وبازدارنده های 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 وغیرعفونی امکان پذیر نیست .

برای اولین بار Reynolds وهمکاران (۱۵) درسال ۱۹۹۶ تکنیک ICC-RT-PCR را برای تشخیص انتروویروس‌ها درنمونه های فاضلاب پیشنهاد نمودند . محققین یاد شده با تهیه رقت های مختلف از ویروس پولیو ۱ وتلقیح آن به رده سلولی BGM در زمان های مختلف گرمخانه گذاری نشان دادند که حساسیت این روش پس از۲۴ساعت $۲/۸^{PFU}/_{ml}$ > می باشد . Margolin وهمکاران (۲۰) درسال ۱۹۹۹ و Wyn-jones وهمکاران (۲) درسال ۲۰۰۱ ، سه روش ICC-RT-PCR ، کشت سلولی و RT-PCR را برای تشخیص انتروویروس‌ها، هپاتیت A، روتاویروس‌ها در نمونه‌های آب و فاضلاب با هم مقایسه نمودند وپس از ۵ تا ۷ روز گرمخانه گذاری بهترین روش جداسازی انتروویروس‌ها را روش ICC-RT-PCR تعیین نمودند.

هدف از این پژوهش ، ارزیابی حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص اختصاصی وسریع ویروس‌های سیتوپاتوژنیک و غیر سیتوپاتوژنیک در نمونه های فاضلاب بود. بدین منظور از رده های سلولی RD و Hep-2 به دلیل تکثیر طیف وسیع تر انتروویروس‌ها استفاده گردید. Reynolds و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۰۱ از روش ICC/PCR برای تشخیص انتروویروس‌ها و ویروس هپاتیت A درنمونه های محیطی استفاده نمودند. درپژوهش انجام شده توسط این محققین با استفاده از روش ICC/PCR و تلقیح PFU ۱۰< انتروویروس به کشت سلولی پس از ۵ ساعت در $۵/^{۴}$ از فلاسک های مورد بررسی وپس از ۱۰ ساعت گرمخانه گذاری درتمامی فلاسک ها ، نتایج مثبت PCR حاصل گردید. همچنین پس از ۲۰ و ۲۵ ساعت به ترتیب: ۱PFU وکمتر از ۱PFU با استفاده از روش ICC-RT-PCR شناسایی گردید . Lee وهمکاران (۲۱) درسال ۲۰۰۴، جداسازی آدنوویروس‌ها وانتروویروس‌ها درآب رودخانه با استفاده از روش ICC-RT-PCR در رده سلولی A549 و BGMK

www.SID.ir

Archive of SID

را انجـام دادنـد. محققین یاد شده نشان دادند که تعداد نمونه های مثبت انتروویروس در هر دو رده سلولی با هم مشابه است .

دراین پـژوهش،پس از تلقـیح نمونه های تغلیظ شده فاضلاب با روش Two-phase از دورده سـلولی RD و Hep-2 اسـتفاده گـردید. نـتایج بدسـت آمـده نشـان دهـنده حساسـیت بیشتر رده سلولی RD نسبت به Hep-2 می‌باشد. اما به دلیل جداسازی طیف متفاوتـی از انـتروویروس‌هـا در هـر کـدام از ایـن دورده سلولی، اسـتفاده هـم زمـان از ایـن دو رده سلولی برای افزایش حساسیت روش ICC-RT-PCR پیشـنهاد می‌شود. همچنین حساسیت روش ICC-RT-PCR بـرای تشـخیص انـتروویروس‌هـا کمـتر از 0.01TCID50 ارزیابـی شـد کـه ایـن مساله می‌تواند نشان دهنده قـابل قبول بودن و حساسیت قابل توجه این روش برای تشخیص انـتروویروس‌هـای موجـود در فاضلاب باشد. معیار موفقیت آمیز بـودن پایش محیطی ویروس پولیو در مراحل آخر ریشه کنی فلج اطفـال، تشـخیص انـتروویروس‌هـای غـیر پولیویی در نمونه‌های فاضـلاب اسـت. مطـابق بولتـن ارائـه شـده توسط WHO درسال ۲۰۰۳ حداقـل ۳۰٪ از نمونـه هـای فاضـلاب تغلـیظ شده از یک Grab sample بایسـتی واجـد انـتروویروس‌هـای غیرپولیویـی (NPEV) باشند.

دراین پـژوهش از کـل نمونـه هـای مـورد بررسـی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Pan E.V در روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونـه انـتروویروس جداسازی گردید که پس از استفاده مجدد از پرایمـرهای اختصاصـی Pan P.V، در۶ نمونـه ویـروس پولـیو تشـخیص داده شـد . در آخـر پس از بررسی مجدد با پرایمرهای اختصاصـی Sabin مشـخص شـد که همگی ویروس‌های پولیوی جداشـده مـربوط بـه سـویه واکسن می باشند . این مساله نیز می تواند تائید دیگری بر ریشه کنی ویروس پولیوی وحشی وپوشش مناسـب ایمنـی در منطقه مورد پژوهش باشد . سپس به طور کلی روش پیشـنهاد شـده ICC-RT-PCR بـه دلـیل حساسـیت زیـاد وکفایـت لازم جهـت حـذف بـازدارنده‌های آلی می‌تواند راه حل مناسـبی جهـت پـایش محیطـی و ارزیابی اپیدمیولوژیکی بیماری های انتروویروسی در کشور باشد

تشکر وقدردانی

نویسـندگان ایـن مقالـه مراتـب سـپاس وقدردانی خود را به دلیل حمایـت هـای مالـی واجرائـی قطـب علمـی انسـتیتو تحقـیقات بهداشـتی دانشـگاه علـوم پزشـکی تهـران ابـراز مـی دارنـد .

REFERENCES

1.Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking water.Virological Quality of Drinking water . Draft Drinking water Guidelines for viruses. 2003; 1-24.

2.Wyn-Jones A.P, sellwood J , Enteric viruses in the aquatic environment , journal of Applied Microbiology , 2001; 91, 945-962 .

3.Safferman R.S, Method for viruses from sludges, soils, sediment and solid.USEPA Manual of Methods for Virology. Chapter 7.1989 .

4.Semler B.L ,Wimner E,Moleculer Biology of picornaviruses , pathogenicity, ASM, 2002 : 357-448 .

5.Dale W.G, kim A.D, John H.P, Joan B.R, pathogenic human viruses in coastal waters , Clinical Microbiology Reviews , 2003; 16: 129-143 .

www.SID.ir

Archive of SID

6.Bosch A, Human enteric viruses in the water environment : a minireview , Internal Microbiol, 1998; 1:191-196 .

7.Metcalf T.G, Melnick J.L, Estes M.K, Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by Isolation to Identification by Molecular biology Annual Rev Microbiol, 1995.49;461-487.

8.Poyry T, Stenvik M, virus in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent natione wide oral poliovirus vaccination campain in Finland, Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54; 371-374 .

9.Metzler A, Tabisch A, Metzler N,Wild P,Schraner E, Molecular characterization of Enteric viruses detected in surface water, OECD workshop Molecular for safe Drinking water, 1998; 1-10 .

10.Joyce M.P,Russell D.A, Managing urban watershed pathogen contamination, 2003; 2-5.

11.Chapron C.D, Ballester N.A, Fontaine J.H 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, Applied and Environmental Microbiology, 2000; 66: 2520-2525 .

12.Chomczynski p, Sacchi N, Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform Extraction, 1987; 162 : 156-159

13.Abbaszadegan M, Huber M.S, Gerba C.P,Pepper I.L, Detection of Enteroviruses in Groundwater with the polymerase chain Reaction, Journal of Applied and Environmental Microbiology, 1993; 59,1318-1324.

14.Berger P, Movement toward making the Ground water (Disinfection) Rule a reality, Microbial Issues in Groundwater Disinfection Rule, 1997; 1-8 .

15.Reynolds K.A, Gerba C.P, Pepper I.L, Detection of Infectious Enteroviruses by an Integrated Cell Culture-PCR procedure, Journal of Applied and Environmental Microbiology, 1996; 62,1424-1427.

16.Tougianidou D, Botzenhart k, Molecular techniques for detection of enteroviruses in water , OECD Workshop Molecular Methods for safe Drinking water, 1998; 1-4 .

17.Ballester N.A, Rex A.C, Coughlin K.A, study of anthropogenic viruses in Boston Harbor, charles River, cottage Farm CSO Treatment Facility and Deer Island Treatment plant 1995-2003, MWRA virus Report, 2004; 15-57 .

18.Reynolds K.A,Gerba C.P, Abbaszadegan M,Pepper L, ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples , can J.Microbiol, 2001; 47: 153-157 .

19.Warden P.S, Ballester N.A, Detection of Enteric viruses in Archived ICR sample Concentrates using an Integrated Cell Culture-Nested PCR Technique. 1999; 1-4.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Margoline A, Viral Analyses , Analytical services, 1999; 1-3 .

21.Lee C, Lee S.H, Han E, kim S.J, Use of Cell Culture-PCR Assay Based on combination of A549 and BGMK Cell Lines and Molecular Identification as a tool to Monitor Infectious Adenoviruses and Enteroviruses in River water Applied and Evironmental Microbiology, 2004; 70: 6695-6705 .

22.WHO/V&B/03.03, Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, 2003;03.03: 1-19 .

23.Hovi. T, et al, Poliovirus surveillance by examining sewage specimens . Quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. Epidemiology and Infection, 2001;127:101-106 .

24. Who, Poliovirus Diagnostic PCR, kuwait polio ITD workshop, 1999 .

25.Kilpatrick D.R, Nottay B, yang C.F, yang S.J, Mulders M, Group spesefic Identification of polioviruses by PCR using primers containing Mixed-Base or Deoxyinosine Residues at positions of codon Degeneracy. Journal of clinical Microbiology, 1996;34: 2990-2996 .

۲۶. ارزیابی چرخش محیطی انتروویروس‌های 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 . کارگر محمد، رضوی سعیده السادات ، خدایی سید حامد ، مجله بیماری های عفونی وگرمسیری ، شماره ۳۰ ، سال دهم ۱۳۸۴ ، ۴۰-۳۳ .

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

www.SID.ir