مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۸۴، صفحات ۵۱ تا ۵۷

Original Article

پایش محیطی ویروس پولیو در استان سیستان و بلوچستان و شناسایی ویروسهای جدا شده درکشت سلولی با روش میکرونوترالیزاسیون و افتراق بین تیپی توسط روشهای الایزا و پروب هیبریدیزاسیون

دکتر محمد کارگر*، سید حامد خدائی*، سعیده السادات رضوی*، دکتر حمیده طباطبائی، دکتر محبوبه ساریجلو**، دکتر شهره شاه محمودی**، بابک زارعیان*، دکتر رخشنده ناطق****

* گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
** گروه ویروس شناسی ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *در بعضی از کشورهای دنیا با وجود عدم جداسازی ویروس پولیوی وحشی از نمونه‌های کلینیکی، گردش خفته ویروس در نمونه‌های فاضلاب گزارش شده است. به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی جهت تایید نهایی ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال، پایش محیطی نمونه‌های فاضلاب و آبهای سطحی را پیشنهاد نموده است. در این پژوهش جهت اطمینان از ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی، پایش محیطی استان سیستان و بلوچستان انجام شده است.*

روش بررسی: *از فروردین تا اسفند ماه سال۱۳۸۳، ۸۶ نمونه از دو مرکز تصفیه فاضلاب، ۵ بیمارستان و آبهای سطحی چندین روستا با روش Grab sample جمع‌آوری و به صورت مستقیم و دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase وجود ویروس پولیو مورد بررسی قرار گرفت. 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، در ۱۸ مورد (۲۰/۹٪) ویروس پولیو جداسازی شد که خوشبختانه هیچ کدام ویروس وحشی نبودند. از این تعداد ۲ مورد (۲/۳٪)، ۸ (۹/۳٪) و ۱۳ مورد (۱۵/۱٪) به ترتیب با روش مستقیم، Pellet و Two-phase جداسازی شدند. بیشترین فراوانی ویروسهای جدا شده مربوط به پولیوی تیپ دو (با فراوانی ۷۲/۲٪) و پولیوی تیپ سه (با فراوانی ۲۷/۸٪) بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان دهنده سطح مناسب پوشش ایمن‌سازی در ایران به ویژه در منطقه پرخطر مورد بررسی و همچنین موید پایش مناسب موارد کلینیکی AFP در کشور بود.*

واژگان کلیدی: *پایش محیطی، ویروس فلج اطفال، فاضلاب.*

مقدمه

ویروس پولیو جزء جنس انتروویروس‌ها و خانواده پیکورناویریده است. این ویروس دارای ۳ سروتیپ می‌باشد و مهمترین پاتوژن انسانی عامل فلج شل حاد است (۱،۲).

تقریبا در یک درصد از موارد عفونت با ویروس پولیو، فلج اطفال ایجاد می‌گردد که عموما پس از ۴۸ ساعت علائم کلینیکی مشخصی ایجاد و پس از ۱۰ روز ضعف پیش رونده به صورت کامل نمایان می‌شود.۹۰ تا ۹۵ درصد ازعفونتهای ویروس پولیو فاقد علائم کلینیکی، ۴ تا ۸ درصد همراه با عوارضی مانند: عفونت تنفسی و گاستروانتریت یا بیماری شبه آنفلوانزا می‌باشد. همچنین در۱ تا ۲ درصد از موارد مننژیت آسپتیک ایجاد می‌شود. عموماً پولیومیلیت در مناطق معتدل

آدرس نویسنده مسئول: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، دکتر محمد کارگر
(**email**: mkaragarmicro418@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/٤/۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/۲/۱۷

در تابستان و پائیز و در مناطق گرمسیری در تمام فصول در میان کودکان شایع می‌باشد. ریسک ابتلا به عفونت مستقیما با فقر بهداشتی، تراکم جمعیت و سیستم تخلیه فاضلاب نامناسب به ویژه در جمعیتهای دارای پوشش نامناسب واکسیناسیون، در ارتباط است (۳).

در سال ۱۹۸۸ سازمان بهداشت جهانی طرحی را به منظور ریشه‌کنی ویروس پولیو تا سال ۲۰۰۰ تدوین نمود ولی به دلیل محقق نشدن ریشه‌کنی در بعضی کشورها این هدف تاکنون تحقق نیافته است (۴).

انجام استراتژی‌های ریشه‌کنی با پوشش گسترده ایمن‌سازی، اعلام روزهای ملی ایمن‌سازی، پایش موارد AFP و لکه‌گیری (Mopping up) (۵) منجر به ریشه‌کنی کامل ویروس وحشی در سال ۱۹۹۴ از آمریکا، در سال ۲۰۰۰ از غرب اقیانوس آرام و در سال ۲۰۰۲ از اروپا گردیده است (۶). بدین ترتیب 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 (۶،۷).

در ایران برنامه ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال از سال۱۹۹۲ آغاز شد و تاکنون علاوه بر واکسیناسیون جاری و اعلام چندین نوبت روزهای ملی ایمن‌سازی در مناطق پر خطر نیزچندین نوبت Subnational Immunization Days یا همان SNIDs انجام شده است. در سالهای ۱۹۹۶، ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ به ترتیب ۱۲، ۱۳ و ۲ مورد ویروس پولیو وحشی در ایران جداسازی گردیده است. از مجموع ۱۵ مورد ویروس وحشی جدا شده در سالهای ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸، سیزده مورد مربوط به استان سیستان و بلوچستان بوده است.

در بعضی از کشورهای دنیا مانند: مصر و اسرائیل، با وجود عدم جداسازی ویروس پولیوی وحشی از نمونه‌های کلینیکی، گردش خفته ویروس در نمونه‌های فاضلاب گزارش شده است (۸،۹). به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی به کشورهای واقع در نواحی پرخطر، پس از ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال، پایش محیطی را از نمونه‌های آبهای سطحی و فاضلاب پیشنهاد نموده است (۴). خوشبختانه از سال ۲۰۰۰ تاکنون هیچکدام از ۳ سروتیپ ویروس وحشی پولیو در ایران جداسازی نشده است.

به دلیل مجاورت ایران با دو کشور افغانستان و پاکستان در مرزهای شرقی (که دارای گردش ویروس پولیوی وحشی هستند (۱۰)، استان سیستان و بلوچستان جزء مناطق پرخطر جهت ورود ویروس وحشی پولیو به کشور است. هدف از این پژوهش، پایش محیطی فاضلابها و آبهای سطحی استان سیستان و بلوچستان جهت بررسی وجود ویروس پولیوی وحشی و مشتق از واکسن (VDPV) و در نهایت تایید ریشه‌کنی ویروس پولیو در ایران می‌باشد.

مواد و روشها

با همکاری مرکز مدیریت بیماریهای وزارت بهداشت و مسئولین مراکز بهداشت زاهدان، چابهار و زابل از فروردین تا اسفند سال ۱۳۸۳ از ۲ سیستم تصفیه فاضلاب، ۵ بیمارستان و روستاهای اطراف چابهار ۸۶ نمونه با روش grab sample، تهیه شد. تمامی‌نمونه‌هامربوط به فاضلاب خام (Raw sewage) بودند و از قسمت ورودی فاضلاب (Inffluent) جمع‌آوری شدند.

حجم تمامی نمونه‌ها یک لیتر بود و توسط ظروف پلاستیکی درپوش‌دار به آزمایشگاه ویروس‌شناسی مرکز کشوری فلج اطفال (NPL) واقع در انستیتو تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردید. در تمامی موارد مشخصات نمونه فاضلاب (محل نمونه‌برداری، تاریخ، PH و دمای نمونه) در پرسشنامه تنظیمی ثبت شد. در انتقال و نگهداری نمونه‌ها قبل از تلقیح به کشت سلولی رعایت زنجیره سرد و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

نمونه‌های فاضلاب به صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ رسوبی (Pellet) و روش تغییر یافته Two-phase مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ظرف محتوی نمونه برای چند ساعت به صورت ثابت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع رویی به یک ارلن استریل انتقال یافت. برای تغلیظ با روش Pellet، از باقیمانده فاضلاب ۷۵ میلی‌لیتر به ۵ لوله پلاستیکی استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و در دمای ۵ درجه و دور 5000 RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس لوله‌ها را برای استفاده در مراحل بعدی در دمای ۴ درجه نگهداری گردید.

روش Two-phase با استفاده از روش پیشنهادی Hovi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ به صورت زیر انجام شد: ۴۰۰ میلی‌لیتر از مایع رویی فاضلاب که در مرحله اول جدا شده بود را در داخل یک ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته و PEG6000، ۳۰٪ (Merk) ودکستران۲۰٪ مربوط به باکتری Leuconostoc mesenteroides (D5376, sigma) با وزن مولکولی ۲۰۰۰۰۰۰ و NaCl (Merk) ۵ مولار به ترتیب به میزان: ۱۳۳/۶گرم (W/V)، ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی‌لیتر(V/V) به آن اضافه گردید. پس ازتنظیم PH محلول در دامنهٔ ۷ تا ۸ با سود یک

نرمال، ارلن محتوی مواد فوق به مدت یک ساعت بر روی شیکر (Horizonatal shaker) با دور 260 RPM قرار داده شد. سپس محتویات ارلن را به داخل یک قیف جداکننده (Separation funnel) ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و یک شب (Overnight) در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. در مرحله بعد ۵ میلی‌لیتر از لایه رسوب انتهایی (bottom phase) و لایهٔ تشکیل شده در بین دو فاز (Interphase) جمع‌آوری شد و به یکی از لوله‌های Pellet مرحله قبل اضافه گردید (۷). در مرحله آخر برای از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها به ۴ میلی‌لیتر از نمونه‌های مستقیم و تغلیظ رسوبی و دو فازی یک میلی‌لیتر کلروفرم خالص (Merk) اضافه و ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰RPM بر روی شیکر لوله قرار داده شد. سپس ۱۰ دقیقه محتویات لوله در دور۲۰۰۰RPM و دمای ۵ درجه سانتریفیوژ و مایع تیمار شده رویی در کرایوتیوب‌های استریل جمع‌آوری گردید.

از رده‌های سلولی L20B، RD و Hep-2 برای جداسازی ویروس پولیو و انترویروس‌های غیر پولیویی استفاده شد. حساسیت رده‌های سلولی به وسیله انترویروس‌های 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 به مدت ۷ روز نگهداری گردید. برای مشاهده CPE هر روز لوله‌ها با میکروسکوپ معکوس (Inverted microscope) بررسی و نمونه‌های مثبت در دمای ۲۰- درجه نگهداری می‌شدند. همچنین پس از ۷ روز، لوله‌های منفی در دمای ۲۰- درجه فریز و پس از گرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) پاساژ مجدد داده شد.

برای مواردی که نمونه روی RD مثبت شده ولی روی L20B منفی شده بود، پاساژ RD به L20B صورت گرفت.

تست نوترالیزاسیون: پس از تعیین نتایج کشت سلولی برای نمونه‌های مثبت تست نوترالیزاسیون اختصاصی پولیو انجام شد. برای انجام تست نوترالیزاسیون از پلیت‌های میکروتیتر (میکروپلیت) استفاده شد. برای هر ویروس پولیوی جدا شده از آنتی سرم pooled polio (PP) و آنتی‌سرم‌های مخلوط PI وPII، PII وPIII، PI وPIII استفاده شد (۱۱).

تست الایزا: کیت اختصاصی الایزای پولیو (RIVM) توسط سازمان بهداشت جهانی در اختیار آزمایشگاههای فلج اطفال قرار می‌گیرد. در این تست چاهک‌های میکرو پلیت که توسط IgG گاوی ضد پولیو، ویروس‌های تیپ ۱ و۲ و۳ پوشیده شده با سوش معین پولیو مجاور می شوند . سپس انکوباسیون با آنتی سرم‌های خرگوشی جذب متقاطع شده اختصاصی تیپ (cross-absorbed) ادامه می‌یابد. پس از شستشوی آنتی‌سرم‌های خرگوشی متصل نشده، IgG ضد خرگوشی نشان‌دار شده با پرواکسیداز(HRP) اضافه می‌شود تا آنتی‌سرم‌های خرگوشی را شناسایی نماید. در چاهک A آنتی‌بادی خرگوشی ضد پولیو ویروس توتال (که هم با ویروس واکسن و هم با ویروس وحشی واکنش می‌دهند)، در چاهک B آنتی‌بادی ضد پولیوی وحشی و در چاهک C آنتی‌بادی ضد پولیوی واکسن ریخته می‌شود. از چاهک‌های B و C هر کدام که OD دو برابر و نیم دیگری را داشته باشند، نشان دهندهٔ سوش ویروس مورد نظر است (۱۱).

تست پروب هیبریدیزاسیون: در این تست از اختلافات موجود در ژنوم ویروس واکسن و ویروس وحشی استفاده می‌شود. پروب مناسب که برای قسمت VP1/2A ویروس واکسن ساخته و نشان‌دار شده، برای افتراق بین ویروس واکسن از ویروس وحشی به کار می‌رود. همچنین از پروب دیگری که برای ناحیهٔ غیرقابل ترجمهٔ ´5 ژنوم (5ŃTR) ساخته شده و در تمامی انترویروس‌ها حفاظت شده، به عنوان 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 با DIG (Digoxigenin) 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 مشاهدهٔ لکهٔ خاکستری مشخص می‌شود (۱۱).

آنالیز آماری نتایج بدست آمده با نرم‌افزار SPSS (ver.13, SPSS Inc. USA) انجام شد.

یافته‌ها

از فروردین تا اسفند سال ۱۳۸۳، جمعا ۸۶ نمونه از فاضلاب دو سیستم تصفیه فاضلاب زابل و جام‌جم زاهدان، ۵ بیمارستان امیرالمومنین زابل، تامین اجتماعی، خاتم الانبیاء و علی‌بن‌ابیطالب زاهدان و بیمارستان بزرگ چابهار و آبهای سطحی تعدادی از روستاهای چابهار با روش grab sample تهیه گردید. بیشترین جمعیت تحت پوشش به ترتیب مربوط

به سیستم تصفیه زابل با یکصد و بیست هزار نفر (۵۴/۹٪) و جام جم زاهدان با پنجاه هزار نفر (۲۲/۹٪) بود (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبت (درصد) واحدهای مورد پژوهش بر حسب جمعیت و محل نمونه گیری

محل نمونه گیری	جمعیت یا ظرفیت اسمی (به نفر)		۱۳۸۳ سال	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بیمارستان امیرالمومنین زابل	۶۵۰۰	۲/۹	۷	۸/۱
مرکز تصفیه فاضلاب زابل	۱۲۰۰۰۰	۵۴/۹	۱۰	۱۱/۶
بیمارستان تامین اجتماعی زاهدان	۱۸۰۰۰	۸/۳	۱۰	۱۱/۶
بیمارستان خاتم الانبیا زاهدان	۷۰۰۰	۳/۲	۱۰	۱۱/۶
بیمارستان علی ابن ابیطالب زاهدان	۶۰۰۰	۲/۸	۱۰	۱۱/۶
مرکز تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان	۵۰۰۰۰	۲۲/۹	۱۰	۱۱/۶
بیمارستان بزرگ چابهار	۹۰۰۰	۴/۲	۱۱	۱۲/۸
روستاهای چابهار	۱۸۰۰	۰/۸	۱۸	۲۰/۹
جمع	۲۱۸۳۰۰	۱۰۰	۸۶	۱۰۰

فراوانی توزیع نمونه‌برداری از واحدهای مورد پژوهش تقریبا یکسان بود و به طور متوسط در هر فصل ۲۱ نمونه جمع‌آوری و ویروس‌های پولیو به صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ در رده‌های سلولی L20B، RD و Hep-2 جداسازی گردید. سپس برای تعیین سه سروتیپ مختلف ویروس پولیو تست میکرونوترالیزاسیون اختصاصی انجام شد. در مرحله بعد جهت‌افتراق‌بین‌تیپهای وحشی(Non Sabin Like =NSL) و واکسن (Sabin Like=SL)، از تستهای آنتی‌ژنیک الایزا و ژنومیک پروب هیبریدیزاسیون استفاده گردید.

از مجموع ۸۶ نمونه جمع‌آوری شده، ۴۹ نمونه (۵۶/۹٪) حاوی انتروویروس بود و از ۱۸ نمونه (۲۰/۹٪) ویروس پولیو جدا شد و با انجام تستهای افتراق بین تیپی مشخص گردید که تمام ویروسهای پولیوی جدا شده مربوط به تیپ واکسن (SL) می‌باشند. بیشترین فراوانی جداسازی ویروس پولیو مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان با فراوانی ۸/۱٪ و سیستمهای تصفیه فاضلاب زابل و بیمارستان چابهار هر کدام با فراوانی ۴/۷٪ بود. بیشترین تیپهای مختلف ویروس پولیوی L جدا شده مربوط به PII (۷۲/۳٪) و PIII (۲۷/۸٪) بود.

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی مجموع پولیوویروس‌ها و انتروویروس‌های جدا شده با سه روش مختلف بر حسب کل نمونه

واحد مورد پژوهش	پولیوویروس						انتروویروس					
	Direct		Pellet		Two-phase		Direct		Pellet		Two-phase	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بیمارستان امیرالمومنین زابل	۱	۱/۲	۰	۰	۰	۰	۳	۳/۵	۳	۳/۵	۵	۵/۸
مرکز تصفیه فاضلاب زابل	۰	۰	۲	۲/۳	۴	۴/۷	۵	۵/۸	۱۰	۱۱/۶	۱۵	۱۷/۴
بیمارستان تامین اجتماعی زاهدان	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱/۲	۲	۲/۳	۲	۲/۳
بیمارستان خاتم الانبیا زاهدان	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۲/۳	۲	۲/۳
بیمارستان علی ابن ابیطالب زاهدان	۰	۰	۱	۱/۲	۱	۱/۲	۰	۰	۷	۸/۲	۶	۶/۹
مرکز تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان	۰	۰	۳	۳/۵	۵	۵/۸	۳	۳/۵	۱۰	۱۱/۶	۱۸	۲۰/۹
بیمارستان بزرگ چابهار	۱	۱/۲	۲	۲/۳	۳	۳/۵	۱	۱/۲	۴	۴/۷	۸	۹/۳
روستاهای چابهار	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱/۲	۱	۱/۲
جمع	۲	۲/۳	۸	۹/۳	۱۳	۱۵/۱	۱۳	۱۵/۱	۳۹	۴۵/۴	۵۷	۶۶/۳

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی ویروسهای پولیوی جدا شده بر روی رده سلولی با سه روش مختلف بر حسب کل نمونه

ویروس	رده سلولی																	
	L20B						RD						Hep-2					
	Direct		Pellet		Two-phase		Direct		Pellet		Two-phase		Direct		Pellet		Two-phase	
	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪
Polio 1	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
Polio 2	۱	۱/۲	۷	۸/۱	۷	۸/۱	۱	۱/۲	۵	۵/۸	۵	۵/۸	۱	۱/۲	۱	۱/۲	۴	۴/۷
Polio3	۰	۰	۱	۱/۲	۴	۴/۷	۰	۰	۱	۱/۲	۴	۴/۷	۰	۰	۰	۰	۱	۱/۲
جمع	۱	۱/۲	۸	۹/۳	۱۱	۱۲/۸	۱	۱/۲	۶	۶/۹	۹	۱۰/۵	۱	۱/۲	۱	۱/۲	۵	۵/۸

جدول ۴-توزیع فراوانی مطلق و نسبی تعداد پولیوویروس ها و انتروویروس های جدا شده بر حسب فصل به سه روش مختلف

فصل	ویروس پولیو						انتروویروس					
	Direct		Pellet		Two-phase		Direct		Pellet		Two-phase	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بهار	۱	۱/۲	۱	۱/۲	۲	۲/۳	۱	۱/۲	۲	۲/۳	۵	۵/۸
تابستان	۰	۰	۱	۱/۲	۵	۵/۸	۲	۲/۳	۹	۱۰/۵	۲۰	۲۳/۳
پاییز	۰	۰	۴	۴/۷	۳	۳/۵	۴	۴/۷	۱۳	۱۵/۱	۱۹	۲۲/۱
زمستان	۱	۱/۲	۲	۲/۳	۳	۳/۵	۶	۶/۹	۱۵	۱۷/۴	۱۳	۱۵/۱
جمع	۲	۲/۳	۸	۹/۳	۱۳	۱۵/۱	۱۳	۱۵/۱	۳۹	۴۵/۴	۵۷	۶۶/۳

ویروس پولیوی تیپ یک (SL) از هیچ یک از واحدهای مورد پژوهش جداسازی نشد. پس از بررسی نتایج با انجام آزمون آنالیز واریانس و سپس Post Hoc مشخص گردید که بین جداسازی ویروس پولیو با روش مستقیم و Two-phase (در سطح ۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین جداسازی ویروس در رده L20B و Hep-2 اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود داشت. (جدول ۳). با روش مستقیم، Pellet و Two-phase به ترتیب ۲، ۸ و ۱۳ ویروس پولیو جداسازی گردید (جدول ۲). باتوجه به جدول ۴ میزان جداسازی ویروس پولیو با روش مستقیم در هر دو فصل زمستان و بهار ۱/۲ درصد بود و بیشترین میزان جداسازی این ویروس با روش Pellet، در فصل پاییز (۴/۷٪) و با روش Two-phase ، در فصل تابستان (۵/۸٪) صورت گرفت.

بحث

تا ابتدای سال ۲۰۰۵، ویروس پولیوی وحشی در ۱۸ کشور از ناحیه مدیترانه شرقی ریشه‌کن شده است و تنها در سه کشور این ناحیه یعنی مصر، افغانستان و پاکستان این ویروس به صورت اندمیک باقی مانده است (۱۲). ۹۹ درصد موارد پولیو گزارش شده در سال ۲۰۰۲ مربوط به سه کشور هند، نیجریه و پاکستان بوده است (۶). 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 مساله می‌تواند برای مناطق هم جوار این کشورها خطرناک باشد. به عنوان نمونه پس از ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال در ۱۱ کشور: بنین، بوتسوانا، کامرون، گینه، مالی، عربستان صعودی، بورکینافاسو، جمهوری آفریقای مرکزی، چاد، ساحل عاج و سودان در سال ۲۰۰۴، مجدداً مواردAFP پولیویی در این کشورها گزارش شد. با بررسی ژنوتیپ ویروسهای جداشده مشخص گردید که علت موارد AFP یاد شده ورود ویروسهای پولیوی بومی کشور نیجریه بوده است (۱۳).

در پاکستان در ۶ ماه اول سال ۲۰۰۵ ، شش ناحیه با گردش فعال ویروس پولیوی وحشی وجود داشته که متاسفانه بیشتر این مناطق در نزدیکی مرزهای ایران با کشورهای افغانستان و پاکستان قرار دارند (۱۲). در اسرائیل از سال ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۷ پایش محیطی ویروس پولیو با استفاده از نمونه‌های فاضلاب توسط Manory 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 ۱و۳ در سالهای ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۶ نشان داده شد (۸). همچنین Deshpande در سال ۱۹۹۹ تا۲۰۰۰، با پایش محیطی نمونه‌های فاضلاب در هند موفق به جداسازی ویروس پولیوی وحشی تیپ ۱و۳ با استفاده از روش تغلیظ Two-phaseگردید. این گزارشها باعث شد که سازمان بهداشت جهانی 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 (۱۴).

مطابق توصیه سازمان بهداشت جهانی معیار موفقیت‌آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مرحله آخر ریشه‌کنی فلج اطفال تشخیص انتروویروس‌های غیر پولیویی در حداقل ۳۰٪ از نمونه‌های فاضلاب است. در این پژوهش ما برای اولین بار روش تغلیظ Pellet را معرفی نمودیم و به صورت همزمان با این روش تغلیظ، از روش مورد تایید سازمان بهداشت جهانی (Two-phase) استفاده نمودیم. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش به ترتیب با روش مستقیم، Pellet و Two-phase: ۱۱(۱۲/۸٪)، ۳۱(۳۶/۱٪)و۴۴(۵۱/۲٪) انتروویروس غیرپولیویی جدا شد که این مساله نشان دهنده مقبولیت دو

روش تغلیظ یاد شده برای جداسازی ویروس پولیو می‌باشد. با توجه به متفاوت بودن نوع و تعداد ویروسهای پولیو جدا شده با این دو روش، استفاده همزمان از این دو روش تغلیظ جهت پایش دقیق‌تر محیطی پیشنهاد می‌گردد(۷).

از سال ۱۹۹۸ سلولهای L20B (سلولهای موشی که ژن رسپتور 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 (۱۵،۱۶). لذا ما در این بررسی از رده سلولی L20B به همراه Hep-2 وRD استفاده کردیم. در این پژوهش تمام ۱۸ ویروس پولیو واکسن بر روی سلول L20B (۱۰۰٪)، ۱۴ مورد بر روی RD (۷۷/۸٪) و ۶ ویروس بر روی رده سلولی Hep-2 (۳۳/۳٪) جداسازی شدند. در این تحقیق مانند نمونه‌های کلینیکی موارد مثبت شده بر روی RD به L20B تلقیح شدند تا در صورتی که ویروس پولیو با تیتر پائین در نمونه موجود می‌باشد در L20B تکثیر کرده و جداسازی گردد.

پایش محیطی همچنین ابزار بالقوه‌ای برای نمایش گردش ویروس پولیو مشتق از واکسن می‌باشد(۷). در سالهای اخیر اپیدمی‌های کوچکی از پولیومیلیت مرتبط با گردش سوش واکسن جهش یافته در بین کودکان غیر واکسینه مشاهده شده‌که‌به‌آن‌ویروس‌پولیودرحال‌چرخش‌مشتق‌از واکسن (Circulating Vaccine Derived Polioviruses = cVDPVs) می‌گویند که اغلب توالی VP1 آنها بین ۲ تا ۳ درصد با سوش واکسن سابین تفاوت نشان می‌دهد. مهمترین ویژگی زیستی سوش‌های cVDPVs، قابلیت ایجاد فلج و انتقال فرد به فرد آن مانند ویروسهای وحشی است (۱۷).

یکی دیگر از موانع ریشه‌کنی سراسری پولیو افزایش شیوع پولیو به علت گردش ویروس پولیو مشتق از واکسن (VDPV) است(۷). 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(۶). در همین سال Blomqvist و همکارانش در استونی از فاضلاب VDPV تیپ ۳ جداسازی نمودند (۱۸).

در این پژوهش تمامی سوش‌های پولیوی جداشده از نظر آنتی‌ژنیک با آنتی‌بادی، جذب متقاطع شده سوش‌های واکسن و وحشی از نظر ژنومیک با روش پروب هیبریدیزاسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. خوشبختانه تمامی ۱۸ ویروس پولیوی جداشده سوش SL بودند همچنین در روش الایزا جوابهایی مانند Non-reactive Double reactive و Non vaccine like (که ویژگی سوش‌های مشتق از واکسن VDPV است) مشاهده نگردید. این مساله می‌تواند نشان دهنده سطح مناسب پوشش ایمن‌سازی در ایران به ویژه در منطقه پرخطر مورد بررسی و همچنین تایید دیگری بر پایش مناسب و حساس موارد کلینیکی AFP در کشور ما باشد (۷).

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

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایتهای مالی و اجرائی قطب علمی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران ابراز می‌دارند. همچنین از جناب آقای دکتر گویا ریاست محترم مرکز مدیریت بیماریهای وزارت بهداشت و مسئولین محترم مراکز بهداشت زاهدان، زابل و چابهار صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. Semler BL, Wimner E, editors. Molecular biology of picornaviruses. ASM, Washington, 2002; p:537-40.
2. Pallansch M, Roos RP, editors. Fields virology. 4th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001; p: 723-76.
3. Australian Government Department of Health and Ageing. Poliovirus laboratory case definition. 2004, Version 1, p:1-7.
4. WHO. Global Polio Eradication Initiative: strategic plan 2004-2008. WHO publications, 2003;p:1-40.
5. Harris BN, Dürrheim DN, Ogunbanjo GA. Polio eradication; the validity of surveillance indicators. Tropical Medicine & International Health 2003;8(5):386-93.
6. CDC. Progress toward global eradication of poliomyelitis, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2003;52(16):366-9.

7. WHO/V&B/03.03. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, vaccines and biological. 2003;p:1-19.

8. Manor Y, Handsher R. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. J Clin Microbiol 1999;37(6):1670-75.

9. CDC. Progress towards poliomyelitis eradication, Egypt, 2003—2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2004;53(35):820-2 .

10. CDC. Wild poliovirus transmission in bordering areas of Iran, Iraq, Syria, and Turkey, 1997-98. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998;47(28):588-92.

11. WHO. Polio laboratory manual; Department of vaccines and biologicals. 2001; p:1-133.

12. Report of an informal technical consultation on polio eradication in Pakistan, 2005. available at: http://www.polioeradication.org/content/general/PAK_May_05%20Inf_tech_consult_report.pdf.

13. CDC. Progress toward poliomyelitis eradication, poliomyelitis outbreak in Sudan, 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005;54(4):97-9.

14. Deshpande JM, Shetty SJ, Siddiqui ZA. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. Appl Environ Microbiol 2003;69(5):2919-27.

15. WHO. L20B cells support multiplication of group A Coxsackieviruses. Polio Lab Network 2002;8(4):1-4.

16. WHO. Distribution of L20B cells is underway. Polio Lab Network 1998;4(2):1-4.

17. Kohler KA, Kaushik B. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in India during 1999: decreased risk despite massive use of oral polio vaccine. Bull World Health Organ 2002;80(3):210–6.

18. Blomqvist S, Savolainen C, Hovi T. Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. J Virol 2004;78(9):4876-83.