مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۶۹ تا ۷۷

Original Article

ارزیابی روشهای مختلف حذف بازدارنده های آلی جهت راه اندازی یک روش حساس به‌منظور پایش مستقیم بیماریهای عفونی انتروویروسی در نمونه‌های فاضلاب

دکترمحمدکارگر[۱]، ساراصادقی‌پور[۲]، دکترحمیده‌طباطبایی[۳]، دکترمحبوبه‌ساریجلو[۴]، مریم قدسی[۵]، دکتر رخشنده ناطق[۶]

[۱] استادیارگروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
[۲] کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
[۳] استادیارگروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران
[۴] استادیارگروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران
[۵] کارشناس ارشدگروه ریاضی و آمار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
[۶] استادگروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران

چکیده

سابقه و هدف: *انتروویروس‌ها یکی از شاخصهای حساس گردش ویروس در اجتماع محسوب می‌گردند. یکی از روشهای عمده تشخیص انتروویرس‌ها استفاده از کشتهای سلولی حساس است. اما اخیرا با توجه به زمان بر بودن و همچنین نیاز به انجام تستهای تاییدی، استفاده از روشهای مستقیم مولکولی جهت تشخیص انترویروس‌ها مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش به منظور ارزیابی روشهای مختلف حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب به منظور تشخیص انتروویروس‌ها به وسیله RT-PCR انجام گرفت.*

روش بررسی: *در این پژوهش مقطعی ۶۳ نمونه فاضلاب شهر تهران 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 با ۱۲ روش مختلف حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از روشهای مورد بررسی تنها با استفاده از روش ICC-RT-PCR موفق به جداسازی تمام ویروس‌های مورد انتظار شدیم.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به حساسیت 0.01TCID50 روش ICC-RT-PCR، انجام مطالعات گسترده‌تر در سطح کشور به منظور استفاده از این روش به عنوان یک روش حساس و سریع برای تشخیص انتروویروس‌های عفونی، نمونه‌های محیطی دارای غلظت کم ویروس و دارای ترکیبات بازدارنده پیشنهاد می‌گردد.*

واژگان کلیدی: *انتروویروس‌ها، بازدارنده‌های آلی فاضلاب، RT-PCR.*

مقدمه

انتروویروس‌های انسانی به زیرگروههای پولیوویروس (۱تا۳)، کوکساکی ویروسهای A (سروتیپ‌های ۱ تا ۲۲ و ۲۴) و B (سروتیپ‌های ۱ تا ۶)، اکوویروس‌ها (سروتیپ‌های ۱ تا ۷، ۹، ۱۱ تا ۲۷ و ۲۹ تا ۳۳) و انتروویروس‌های گروه جدید (ENV ، ۶۸ تا ۷۱) طبقه‌بندی شده‌اند (۱).

آدرس نویسنده مسئول: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر محمد کارگر
(**email**: mkaragarmicro418@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۲/۵

عفونتهای انسانی انتروویروسی می‌تواند دامنه گسترده‌ای از علائم حاد را در ماهیچه اسکلتی و قلبی، سیستم عصبی مرکزی، پانکراس، پوست و غشاهای موکوسی را ایجاد نمایند. عفونتهای انتروویروسی با بعضی از بیماریهای مزمن مانند کاردیومیوپاتی، میوکاردیت مزمن، سندرم خستگی مزمن، سندرم پس از پولیو، دیابت ملیتوس وابسته به انسولین و بیماریهای عصبی ارتباط دارد. همچنین گاهی بیماریهای منجر به مرگ را ایجاد می‌نماید (۱). عموماً افراد آلوده برای چندین هفته انتروویروس را در مدفوع خود دفع می‌نمایند. بدین ترتیب تعداد زیادی از ویروس‌های دفع شده در محیط، برای

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

مدت طولانی می‌توانند به صورت عفونی باقی بمانند. به همین دلیل با جستجوی انتروویروس‌ها در نمونه‌های محیطی و فاضلاب می‌توان به انتشار ویروس و بررسی تقریبی نسبت افراد آلوده شده در یک جمعیت پی برد (۲). یکی از روشهای متداول برای تشخیص انتروویروس‌ها، استفاده از رده‌های مختلف کشت سلولی مانند RD، VERO، Hep-2، L20B، Hela، BGM، HT-29 و Skco-1 است (۳). اگر چه اکثر ویروس‌های روده‌ای توانایی تکثیر بر روی رده‌های کشت سلولی را دارند، اما بعضی از ویروس‌های روده‌ای مانند هپاتیت A، نورواک ویروس‌ها، روتاویروس‌ها وکوکساکی ویروس‌های گروه A نیز به راحتی در کشت سلولی CPE ایجاد نمی‌کنند (۶-۴). استفاده از تکنیک مولکولی برای تشخیص انتروویروس‌ها به ویژه انتروویروس‌های غیرقابل کشت، به عنوان یک روش سریع و حساس مورد توجه ویروس‌شناسان محیطی بوده است (۶،۱،۵). با استفاده از روش RT-PCR در مدت ۲۴ ساعت می‌توان کمتر از 1PFU ویروس را تشخیص داد. به دلیل حساسیت بالای روش RT-PCR، کنترل و حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب اهمیت بسیار زیادی دارد (۵،۶). Chomczynski و همکاران (۷) در سال ۱۹۸۷، Graff و همکاران (۸) در سال ۱۹۹۳، Abbaszadegan و همکاران (۹) در سال ۱۹۹۳، Straub و همکاران (۱۰) در سال ۱۹۹۴، Atmar و همکاران (۱۱) در سال ۱۹۹۵، Shieh و همکاران (۱۲) در سال ۱۹۹۵، Toze (۱۳) در سال ۱۹۹۷ و Reynolds و همکاران (۱۴) در سال ۱۹۹۶ از روشهایی مانند GIT، AC-PCR، Sephadex G-100، Chelex 100-resin، CTAB، Pro-cipitate، پروتئیناز k، Solvent extraction، polyvinyl polypyrolidine، caesium chloride و ICC-RT-PCR به منظور حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب استفاده نمودند. هدف از این پژوهش مقایسه و ارزیابی ۱۲ روش مختلف حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب، برای تشخیص مستقیم انتروویروس‌ها به وسیله RT-PCR می‌باشد.

مواد و روشها

نمونه‌گیری و تغلیظ: با همکاری شرکت آب و فاضلاب شهر تهران ۶۳ نمونه از آذرماه ۱۳۸۱ تا خرداد ماه ۱۳۸۲ از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران (قیطریه، صاحبقرانیه، زرگنده، اکباتان، محلاتی و شوش) با روش Grab sample، تهیه و با دو روش تغلیظ رسوبی (Pellet) پیشنهاد شده توسط ما در پژوهشهای قبلی (۱۵،۱۶) و روش تغییر یافته Two-phase، مورد بررسی قرار گرفت (۱۷،۱۸).

کشت سلولی: برای جداسازی ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیرپولیویی از رده‌های سلولی RD و Hep-2 استفاده شد. میزان تلقیح فاضلاب به هر لوله کشت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بود و هر نمونه به ۲ لوله کشت سلولی تلقیح گردید. پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۶ درجه تمامی لوله‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس از نظر ظهور CPE مورد بررسی قرار گرفتند و سپس ویروس‌های جداشده با استفاده از آنتی سرم Pooled Polio(PP) ، آنتی‌سرم‌های کوکساکی ویروس B1 تا B6 (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی‌سرمی مربوط به کوکساکی ویروس A9 و ۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نامهای A تا G و روش میکرونوترالیزاسیون شناسایی گردید. در مرحله بعد ۱۲ نمونه تغلیظ شده که تیپ‌های مختلف انتروویروس از آن جداسازی شده بود، جهت انجام تست RT-PCR مستقیم انتخاب گردیدند (جدول ۳).

روشهای حذف بازدارنده‌های آلی:

I) *استخراج RNA با استفاده از کیت(Accuprep(Bioneer* :

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب با ۴۰۰ میکرولیتر بافر VB (۶۰ میلی لیتر Poly A + VB) در داخل لوله ml ۱/۵ مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به محتویات لوله اضافه و مخلوط گردید. سپس محتویات مرحله قبل وارد ستون اتصالی (Binding column) واجد لوله ۲ میلی لیتری گردید و در دور ۸۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد ستون اتصالی را به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر بافرw1 (که قبلاً ۳۰ml اتانل خالص به آن اضافه شده بود) به ستون اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس لوله‌های اتصالی به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری جدیدی انتقال داده شد و ۵۰۰ میکرولیتر بافر W2 (که قبلاً ml ۸۰ اتانل خالص به آن اضافه شده بود) به آن اضافه و ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. به منظور حذف اتانل یک بار دیگر در دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر، پس از انتقال ستون اتصالی به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری جدید، ۵۰ میکرولیتر (Elution buffer) بافر جداکننده، (در دمای ۶۵ درجه) به آن افزوده شد و پس از نفوذ بافر به ستون (حدود ۵ دقیقه) در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید.

II) *استخراج RNA با استفاده از کیت کیاژن*: به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب به ترتیب مقادیر ۲۰۰، ۵ و ۲ میکرولیتر NSP-1، پروتئیناز K و Carrier DNA/RNA اضافه و ۵ ثانیه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. سپس

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

مایع رویی جداشده برای ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر NSP-2 به آن اضافه و ۵ ثانیه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. با افزودن ۳۰ میکرولیتر ماده جاذب (sorbent) و ۱۰ دقیقه نگهداری دردمای اتاق (و به هم زدن مداوم آن) به مدت ۶۰ ثانیه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد شستشو با افزودن به ترتیب : ۵۰۰ میکرولیتر NSP-3 وNSP-4 (دوبار) و سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰rpm برای ۶۰ ثانیه و ۲ دقیقه انجام شد. پس از خشک شدن رسوب (Pellet) در حرارت ۳۷ درجه، مجدداً ۱۰۰ میکرولیتر NSP-5 به آن اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه نگهداری و سپس در دور ۱۲۰۰۰rpm، ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای افزایش میزان محصول ، مرحله آخر چند بار تکرار گردید.

III) *استخراج RNA با محلول RNX PLUS*: ۵۰۰ میکرولیتر RNX PLUS با ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه فاضلاب تغلیظ شده مخلوط و ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و پس از مخلوط کردن و ۵ دقیقه نگهداری در فریزر ۲۰-درجه، در دور ۱۳۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد ۳۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانل و ۲ میکرولیتر گلیکوژن به فاز رویی اضافه و پس ازیک شب (overnight) نگهداری در فریز ۲۰- درجه، ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm و حرارت ۴ درجه، سانتریفیوژ و مایع رویی آن دور ریخته شد. سپس رسوب حاصل با ۴۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵٪ شستشو و ۸ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه، سانتریفیوژ و مایع رویی خارج گردید. در مرحله آخر به رسوب حاصل ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

IV) *استخراج RNA با استفاده از TRIZOL*: ۱۲۰ میکرولیتر از نمونه فاضلاب تغلیظ شده با ۵۰۰ میکرولیتر TRIZOL مخلوط و در حرارت ۲۵ درجه ۵ دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merk) به آن اضافه و پس از مخلوط کردن و نگهداری در حرارت ۲۵ درجه در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از فاز آبی به لوله‌های اپندرف واجد ۳۰ میکرولیتر از استات سدیم ۳ مولار (pH=۵/۲) و ۶۰۰ میکرولیتر اتانل خالص منتقل گردید و یک شب در فریزر ۲۰- درجه نگهداری و سپس در دور ۱۲۰۰۰rpm برای ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب RNA با ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ (Merk) شستشو و در دور ۱۲۰۰۰rpm در حرارت ۴ درجه، ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در انتها، ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب حاصل اضافه گردید.

V) *استخراج RNA با استفاده از فنل-کلروفرم*: به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه فاضلاب تغلیظ شده، ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ۲۰۰ میکرولیتر فنل اضافه و پس از ۵ دقیقه نگهداری در فریزر ۲۰- درجه در دور ۱۳۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به مایع رویی ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل و ۲ میکرولیتر گلیکوژن اضافه و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در فریزر ۲۰- درجه در دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی مایع رویی، شستشوی رسوب حاصل با اتانل ۷۵ درصد و ۸ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm در ۴ درجه انجام گردید. در انتها پس از جداسازی مایع رویی، ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب خشک شده اضافه گردید.

VI) *استخراج RNA با استفاده از گوانیدین تیوسیانات*: ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب با ۵۰۰ میکرولیتر محلول استخراج (شامل گوانیدین تیوسیانات ۴ مولار، سیترات سدیم ۲۵ میلی‌مولار (pH=۷)، N– لوریل سارکوزین ۰/۵٪، بتامرکاپتواتانل ۰/۱ مولار)، ۵۰ میکرولیتر استات سدیم ۲ مولار (pH=۵/۲) و ۶۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱: ۲۴: ۲۵) مخلوط و در دور ۱۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس فاز آبی حاوی RNA جدا و هم حجم آن، اتانل خالص و ۲ میکرولیتر گلیکوژن اضافه و یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد و ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد پس از جداسازی مایع رویی، ۳۰۰ میکرولیتر محلول استخراج و ۶۰۰ میکرولیتر اتانل خالص به آن اضافه و ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ و پس از یک ساعت نگهداری در فریزر ۲۰- درجه با یک میلی‌لیتر اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد. در مرحله آخر ۲۰ میکرولیتر آب DEPC به آن اضافه گردید.

VII) *استخراجRNA بااستفاده از SephadexG-120-200، پروتئیناز-k و فنل- کلروفرم*: ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه فاضلاب تغلیظ شده با ۸۰ میکرولیتر Sephadex G-120-200 مخلوط و پس از ۵ دقیقه ورتکس در دور ۱۳۲۰۰rpm، به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، ۲۵ میکرولیتر پروتئینازk به فاز رویی اضافه و پس از یک ساعت نگهداری در دمای ۴۵ درجه و افزودن ۱۰۰ میکرولیترکلروفرم و ۲۰۰ میکرولیتر فنل و مخلوط کردن آن و ۵ دقیقه نگهداری در فریزر۲۰- درجه، در دور ۱۳۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

۲ میکرولیتر گلیکوژن به فاز رویی اضافه و پس از یک شب (overnight) نگهداری در فریزر ۲۰- درجه، ۱۵ دقیقه در دور ۱۳۲۰۰rpm و حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ و مایع رویی آن دور ریخته شد. سپس رسوب حاصل با ۴۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵٪ شستشو و در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ و مایع رویی خارج گردید. در مرحله آخر به رسوب حاصل ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

VIII) *استخراج RNA با استفاده از کیت Bioneer و Sephadex G-120-200*: ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب با ۴۰۰ میکرولیتر بافر VB (۶۰ میلی‌لیتر PolyA + VB) در داخل لوله ۱/۵ ml مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به محتویات لوله اضافه و مخلوط گردید. سپس به منظور حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب، ۴۰۰ میکرولیتر Sephadex G-120-200 به ستون اتصالی (Binding column) واجد لوله ۲ میلی‌لیتری اضافه و در دور ۱۶۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. این مرحله دو بار تکرار گردید. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول آماده شده در مرحله قبل شامل نمونه فاضلاب بافر VB و ایزوپروپانل وارد ستون اتصالی واجد Sephadex شد و در دور ۱۶۰۰rpm، برای ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد پس از انتقال ستون اتصالی به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری جدید و افزودن ۵۰۰ میکرولیتر بافرW1 به ستون، یک دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ و بقیه مراحل مانند روش I تا انتها انجام گرفت.

IX) *استخراج RNA توسط Trizol و پروتئیناز k*: به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه فاضلاب، ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و ۱ ساعت در دمای ۴۵ درجه گرمخانه‌گذاری شد. سپس استخراج RNA با استفاده از محلول TRIZOL انجام گرفت.

X) *استخراج RNA توسط روش تغییریافته Sephadex G-120-200 و کیت استخراج Bioneer*: به ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه فاضلاب تغلیظ شده، ۵۰ میکرولیتر Sephadex G-120-200 اضافه و پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن در دور ۱۳۲۰۰rpm برای یک دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد RNA پس از جداسازی مایع رویی، با استفاده از روش Bioneer استخراج گردید.

XI) *استخراج RNA توسط Chelex G-100 و کیت استخراج Bioneer*: به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب ۲۰۰ میکرولیتر Chelex G-100 اضافه و پس از ۵ دقیقه ورتکس، در دور ۱۳۲۰۰rpm برای ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی مایع رویی RNA با استفاده از کیت Bioneer استخراج گردید.

XII) *روش Integrated Cell Culture RT-PCR(ICC-RT-PCR)*: برای انجام این روش، ابتدا رده‌های سلولی Hep-2 و RD برای جداسازی انتروویروس‌ها تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه فاضلاب به چهار لوله کشت سلولی (هرکدام ۲ لوله) تلقیح گردید. در ابتدا به منظور یافتن مناسب‌ترین زمان انکوباسیون چند رده تلقیح شده کشت سلولی، به صورت تصادفی انتخاب و درزمانهای صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۶ درجه گرمخانه‌گذاری و با روش RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل مناسب‌تر بودن زمان گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعت، جهت ارزیابی تمامی نمونه‌های مورد بررسی از این زمان برای انجام تست استفاده گردید. بدین منظور هر دو لوله مربوط به رده‌های سلولی RD و Hep-2 جداگانه با هم مخلوط و پس از فریز در دمای ۲۰- درجه و گرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) به مدت یک دقیقه در دور ۱۳۲۰۰rpm سانتریفیوژ و ۵ میکرولیتر از مایع رویی آن جداسازی گردید.

روش RT-PCR: برای انجام RT-PCR درابتدا پرایمرهای اختصاصی Pan E.V، Pan P.V و Sabin (I، II وIII)، طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی برای انتهای ´۵ حفاظت شده انتروویروس‌ها مطابق جدول شماره ۱ طراحی و تهیه گردید.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده به منظور تشخیص انتروویروس ها و ویروس پولیو

اسم پرایمر	پرایمر	آمپلیکون	موقعیت
Pan. Enterovirus (Pan E.V)	5'ACACGGACACCCAAAGTAGTCGT TCC-3' 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAA TCC-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

سپس مخلوط بافرهایA (شامل:Tris-Hcl ۳۳/۵ ml ۱ مولار، ۸/۵ ml سولفات آمونیوم ۱ مولار، EDTA ۶ ml ۰/۵ مولار، ۸ ml آب مقطر دیونیزه)، بافر B (۲۵ میکرولیتر بافر A، ۵ میکرولیتر dNTPs، ۵ میکرولیتر پرایمرPan E.V، ۵ میکرولیتر پرایمرPan E.V، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه) و بافر C (۱۳/۷۵ میکرولیتر Mgcl2 ۰/۲ مولار، ۰/۷ میکرولیتر DTT ۱

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

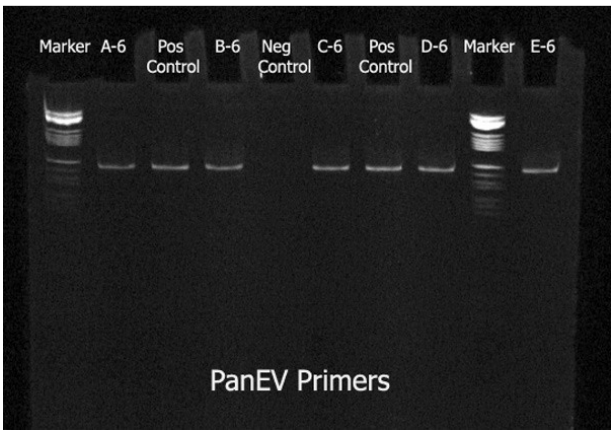
مولار، ۶/۹ میکرولیتر RNase-inhibitor، ۳/۶ میکرولیتر AMV reverse transcriptase، ۱۳/۷ میکرولیتر Taq DNA Polymerase، ۲۳۶/۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه) تهیه و در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد. در مرحله بعد ۱۹ میکرولیتر بافر B حاوی پرایمر Pan E.V به همراه ۵ میکرولیتر مایع رویی کشت سلولی یا (محصول استخراج) به کلیه ویال‌ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. 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(Biometra) با شرایط زیر RT-PCR انجام شد:

الف) واکنش با آنزیم RT به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴۲ درجه و غیرفعال کردن آن در حرارت ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه. ب) PCR با پرایمرهای غیردژنره Pan E.V در شرایط ۹۵ درجه، ۴۵ ثانیه؛ ۵۵ درجه، ۴۵ ثانیه؛ ۷۰ درجه، ۴۵ ثانیه (برای ۳۶ سیکل) و مرحله Extention نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه. همچنین نمونه‌های 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 یا (محصول استخراج) به کلیه ویال‌ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. درمرحله بعد پس از سردکردن ویال‌ها روی یخ، ۵ میکرولیتر از بافر C به هر ویال اضافه گردید. درنهایت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر RT-PCR با شرایط زیر انجام شد:

الف) واکنش با آنزیم RT، به مدت ۲۰ دقیقه درحرارت ۴۲ درجه و غیرفعال کردن آن در حرارت ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه. ب) PCR با پرایمرهای دژنره Pan P.V درشرایط ۹۵ درجه، ۴۵ ثانیه؛ ۴۲ درجه، ۴۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه، ۴۵ ثانیه (برای ۳۰ سیکل). سپس جهت افتراق بین تیپی سوش واکسن از وحشی تمامی ویروس‌های 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 (۱۹،۲۰).

یافته‌ها

در این پژوهش از آذرماه سال ۱۳۸۱ تا آبان ماه سال ۱۳۸۳، از ۶ تصفیه خانه قیطریه، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش و 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 صدهزار نفر (۸/۴۲٪) بود. از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده ۳۲ نمونه انتروویروس (فراوانی ۵۰/۷۹٪) در رده سلولی RD از روش تغلیظ Pellet و ۳۴ نمونه انتروویروس از روش تغلیظ Two-phase (فراوانی ۵۳/۹۶٪) جداسازی گردید. مطابق جدول شماره ۲، بیشترین میزان جداسازی انتروویروس مربوط به رده سلولی RD (فراوانی ۵۳/۹۶٪) بود. با آزمون Fisher exact مشخص شد که بین روش تغلیظ Pellet و Two-Phase در این رده سلولی ارتباط معنی‌داری ($p<0/001$) وجود دارد. همچنین مقایسه روش تغلیظ Two-Phase در رده سلولی RD و Hep-2، نشان دهنده ارتباط معنی‌دار ($p=0/001$) بود. بیشترین فراوانی انتروویروس‌های جداشده مربوط به N.T.E.V، E25 و E11 بود. ویروس کوکساکی B تنها در رده سلولی Hep-2 و فقط با روش Pelletجداسازی گردید. به منظور ارزیابی روشهای مختلف حذف بازدارنده‌ها، ۱۲ انتروویروس جداشده با دو روش تغلیظ Pellet و Two-Phase به صورت تصادفی انتخاب و سپس با ۱۲ روش حذف بازدارنده‌ها، قبل از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. از تمامی روشهای مورد بررسی تنها با روش ICC-RT-PCR موفق به جداسازی تمامی انتروویروس‌های مورد بررسی شدیم (جدول ۳). مطابق شکل ۱، باندهای مورد انتظار با سایز bp ۱۱۴ با استفاده از روش ICC-RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی PanE.V مشاهده می‌گردد.



شکل ۲- نمایش محصول ICC-RT-PCR توسط پرایمرهای اختصاصی Pan E.V بر روی ژل پلی آکریل آمید، باندهای مشاهده شده در ردیفهای A-6، B-6، C-6 و D-6 مربوط به نمونه های مثبت با سایز bp ۱۱۴ می باشند (حساسیت0.01TCID50)

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی انتروویروسهای جدا شده در روش کشت سلولی بر روی رده های RD,Hep-2

رده سلولی / تیمار	RD				Hep-2			
	Pellet		Two-Phase		Pellet		Two-Phase	
نوع ویروس	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
P1	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹
P2	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	—	—	—	—
P3	۵	۷/۹۳	۶	۹/۵۲	۵	۷/۹۳	۶	۹/۵۲
N.T.E.V	۶	۹/۵۲	۶	۹/۵۲	—	—	۲	۳/۱۷
E1	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹	—	—	—	—
E6	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹	—	—	—	—
E7	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	—	—	—	—
E11	۳	۴/۷۶	۴	۶/۳۵	۲	۳/۱۷	۳	۴/۷۶
E13	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹
E20	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹
E21	۱	۱/۵۹	۱	۱/۵۹	—	—	—	—
E25	۴	۶/۳۵	۴	۶/۳۵	—	—	—	—
E27	۲	۳/۱۷	۲	۳/۱۷	—	—	—	—
COX-B	—	—	—	—	۳	۴/۷۶	—	—
جمع	۳۲	۵۰/۷۹	۳۴	۵۳/۹۶	۱۳	۲۰/۶۳	۱۴	۲۲/۲۲

جدول ۳- مقایسه سه روش مختلف کشت سلولی RT-PCR مستقیم و ICC-RT-PCR در نواحی مختلف نمونه گیری

نمونه	محل نمونه گیری	روش تغلیظ		ویروس جداشده در کشت سلولی	Direct RT-PCR	ICC-RT-PCR	
		Pellet	Two-phase		Enteroviruses	Enteroviruses	Poliovirus
۱	قیطریه	❋	-	PI	A	P	P
۲	صاحبقرانیه	-	❋	E25	A	P	A
۳	اکباتان	❋	-	COX-B	A	P	A
۴	محلاتی	❋	-	E4	A	P	A
۵	شوش	-	❋	PIII	A	P	P
۶	زرگنده	❋	-	E6	A	P	A
۷	قیطریه	-	❋	E13	A	P	A
۸	صاحبقرانیه	-	❋	E11	A	P	A
۹	اکباتان	-	❋	PII	A	P	P
۱۰	محلاتی	❋	-	E1	A	P	A
۱۱	شوش	-	❋	E20	A	P	A
۱۲	زرگنده	❋	-	E27	A	P	A

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

بحث

روش استاندارد کشت سلولی برای تشخیص ویروس‌های بیماری‌زای انسانی پرهزینه و زمان بر است و برای تایید نتایج مثبت نیز نیاز به یک ماه زمان وجود دارد. گذشته از این به واسطه وجود بازدارنده‌های آلی و غیرآلی موجود در نمونه‌های محیطی امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب در کشت سلولی نیز وجود دارد. با توجه به وجود بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب و حساس بودن آنزیم‌های موجود در روش RT-PCR نسبت به بازدارنده‌ها و همچنین مقدار کم ویروس، انجام RT-PCR مستقیم بر روی نمونه‌های تغلیظ شده فاضلاب با موانع و مشکلات بسیاری همراه بوده است. برای اولین بار Chomczynski و همکاران (۷) در سال ۱۹۸۷ از روش GIT-Phenol-Chloroform به منظور حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب استفاده نمودند. گوانیدینیوم ایزوتیوسیانات و کلرید نقش مهمی را در واسرشت شدن (Denaturation) پروتئین‌ها دارند. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد استفاده از ترکیب GIT-CSCL، علاوه بر حذف ریبونوکلئازها، قادر به استخراج مقادیر زیادی از RNA سالم از نمونه‌ها می‌باشد. Abbaszadegan و همکاران (۹) در سال ۱۹۹۳ برای حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب (هومیک اسید و فولویک اسید) ازستون‌کروماتوگرافیSephadexG-50، Sephadex G-100، Sephadex G-200 و Chelex-100 resin استفاده نمودند. نتایج نشان داد ترکیب Sephadex G-100 و Chelex -100 resin موثرترین روش برای خارج کردن عوامل بازدارنده به منظور شناسایی انتروویروس‌های موجود در نمونه‌های تغلیظ شده آب توسط روش RT-PCR می‌باشد. Abbaszadegan و همکاران (۶) در سال ۱۹۹۹ از روش فنل‌ـ کلروفرم، Sephadex G-100, Chelex -100 resin به منظور استخراج RNA و حذف بازدارنده‌ها استفاده کردند. محققین یادشده نمونه فاضلاب را در ابتدا با فنل ـ کلروفرم (۱:۱) برای ۳ دقیقه ورتکس و در دور ۱۴۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودند و در مرحله بعد پس از خارج کردن فاز آبی با حجم مساوی از کلروفرم ترکیب و در دور ۱۴۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد پس از عبور فاز آبی از ستونهای حاوی ۵ میلی لیتر Sephadex G-120، ۷۵۰ میکرولیتر از محصول نهایی مرحله قبل به لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۵۰ میکرولیتر Chelex -100 resin منتقل و سپس RT-PCR انجام شد. همچنین نشان داده شد استفاده همزمان از Sephadex و Chelex و دوبار استخراج با فنل‌ـ کلروفرم تا حد زیادی باعث حذف بازدارنده‌ها می‌گردد. Lewis و همکاران (۲۱) در سال ۲۰۰۰، تاثیر خاک رس، هومیک اسید، UV و باقی‌مانده‌های بافت صدف داران (shellfish) را در نمونه‌های محیطی برای تشخیص ویروس پولیو۲ توسط کشت سلولی و RT-PCR ارزیابی نمودند. نتایج نشان داد که خاک رس، هومیک اسید (۱۵۰/mg-۵) و بافتهای صدف داران، حساسیت شناسایی ویروس توسط روش RT-PCR را بین ۱ تا ۸ واحد لگاریتم کاهش می‌دهد. به همین دلیل استفاده از روشهایی مانند Sephadex و Chelex gel filtaraion به منظور حذف بازدارنده‌های از نمونه‌های محیطی پیشنهاد شده است. Ehler و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۰۴ از روش TRIZOL به منظور استخراج RNA انترووویروس‌ها استفاده نمودند. در این مطالعه ۱۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های تغلیظ شده فاضلاب با ۵۰۰ میکرولیتر TRIZOL مخلوط و در حرارت ۲۵ درجه، ۵ دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merk) به آن اضافه و پس از مخلوط کردن و نگهداری در حرارت ۲۵ درجه در دور ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از فاز آبی به لوله‌های اپندرف واجد ۳۰ میکرولیتر از استات سدیم ۳مولار (pH ۵/۲) و ۶۰۰ میکرولیتر اتانل خالص منتقل گردید و یک شب در فریزر ۲۰- درجه نگهداری و سپس در دور ۱۲۰۰۰×g برای ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب RNA با ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ (Merk) شستشو و در دور ۱۲۰۰۰×g در حرارت ۴ درجه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در انتها ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب حاصل اضافه گردید و به منظور بررسی بیشتر در دمای ۷۰- درجه فریز شد. در این پژوهش نیز حذف بازدارنده‌ها با استفاده از ترکیبات Sephadex G-120-200، Chelex-100- resin، TRIZOL و GIT مورد ارزیابی قرار گرفت اما به دلیل آلودگی زیاد فاضلاب خانگی و وجود بازدارنده‌هایی مانند هومیک اسید، ذرات خاکی، مولکول‌های پلی‌فنلیک و یونهای فلزی (Ca^{2+} ، Mg^{2+}) قادر به تشخیص انتروویروس‌ها توسط RT-PCR نشدیم. هومیک اسید قادر به اتصال به مواد آلی دیگری مانند مواد خاکی و مولکول‌های پلی‌فنلیک می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک اسید ضعیف با تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی(Mg^{2+}، Ca^{2+}) مانع فعالیت کوفاکتوری کاتیونهای یاد شده در PCR گردد. همچنین کوآنزیم‌های مورد استفاده در RT-PCR نسبت به آلودگیها و مواد بازدارنده

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

موجود در نمونه‌های محیطی مانند مواد آلی و یونهای فلزی حساسیت بالایی دارند. مواد آلی به ویژه هومیک اسید می‌تواند با اتصال به پروتئین‌ها با جایگاه فعال آنزیم به صورت فضایی و شیمیایی رقابت نماید. همچنین نتایج سایر پژوهشها نشان می‌دهد که یونهای فلزی می‌توانند باعث کاهش ویژگی اتصال و در نتیجه تکثیر غیراختصاصی ژنوم ویروس‌های مورد بررسی گردد. Reynolds و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۰۱ از روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویرس‌ها و ویروس هپاتیت A در نمونه‌های محیطی استفاده نمودند. در پژوهش انجام شده توسط این محققین با استفاده از روش ICC/PCR و تلقیح PFU ۱۰≥ انتروویرس به کشت سلولی پس از ۵ ساعت در نیمی از فلاسک‌های مورد بررسی و پس از ۱۰ ساعت در تمامی فلاسک‌ها نتایج مثبت PCR حاصل گردید. همچنین پس از ۲۰ و ۲۵ ساعت به ترتیب PFU ۱ و کمتر از PFU ۱ با استفاده از روش ICC-RT-PCR شناسایی گردید.

در این پژوهش ما پس از بررسی روشهای مختلف حذف بازدارنده‌ها تنها با استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR(ICC-RT-PCR) موفق به جداسازی تمام ویروس‌های مورد انتظار شدیم. پس از تلقیح نمونه‌های تغلیظ شده فاضلاب با روشهای Pellet و Two-Phase، از دو رده سلولی RD و Hep-2 استفاده گردید. با توجه به متفاوت بودن نوع و تعداد انتروویروس‌های جداشده با دو روش تغلیظ یاد شده پیشنهاد می‌گردد جهت افزایش کارایی از هر دو روش به صورت هم زمان استفاده شود. نتایج بدست آمده نشان دهنده حساسیت بیشتر رده سلولی RD نسبت به Hep-2 می‌باشد. اما به دلیل جداسازی طیف متفاوتی از انتروویروس‌ها در هر کدام از این دو رده سلولی، استفاده هم زمان از این دو رده سلولی برای‌افزایش حساسیت روش ICC-RT-PCR پیشنهاد می‌شود. همچنین حساسیت این روش برای تشخیص انتروویروس‌ها کمتر از 0.01TCID50 ارزیابی گردید که این مساله می‌تواند نشان‌دهنده قابل قبول بودن و حساسیت قابل توجه این روش برای تشخیص انتروویروس‌های موجود در فاضلاب باشد. در ابتدا تمام نمونه‌های مورد بررسی با روش ICC-RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Pan.EV و در مورد ویروسهای پولیو با استفاده از پرایمرهای PanP.V مورد بررسی قرار گرفتند. خوشبختانه پس از بررسی مجدد با پرایمرهای اختصاصی Sabin مشخص شد که همه ویروس‌های پولیوی مورد بررسی مربوط به سوش واکسن (SL) می‌باشند. این مساله نیز می‌تواند تایید دیگری بر ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی و پوشش مناسب ایمنی در منطقه مورد پژوهش باشد. پس به طور کلی روش پیشنهاد شده ICC-RT-PCR به دلیل حساسیت زیاد و کفایت لازم جهت حذف بازدارنده‌های آلی می‌تواند راه حل مناسبی جهت پایش محیطی و ارزیابی اپیدمیولوژیکی بیماریهای انتروویروسی در کشور باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایتهای مالی و اجرائی قطب علمی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Muir P, Kammerer U, Korn K. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. Clin Microbiol Rev 1998;11:202-27.
2. Warden PS, Ballester NA. Detection of enteric viruses in archived ICR sample concentrates using and integrated cell culture-nested PCR technique. Research and Development Drinking Water 1999;121-25.
3. Federal–Provincial–Territorial committee on Drinking water. Virological quality of drinking water. Draft drinking water guidelines for viruses. 2003;1-24.
4. Tougianidou D, Botzenhart K. Molecular techniques for the detection of enteroviruses in water. OECD workshop molecular methods for safe drinking water 1998;1-4.
5. Abbaszadegan M. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. Rev Biol Biotech 2001;1:21-26.
6. Abbaszadegan M, Stewart P. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl Environment Microbiol 1999;65:444-49.
7. Chomczynski P, Sacchi N. Single–step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-phenol–chloroform extraction. Analyt Biochem 1987;162:156-59.
8. Graff J, Ticehurst J. Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. Appl Environment Microbiol 1993;59:3165-70.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]

9. Abbaszadegan M, Huber MS. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. Appl Environment Microbiol 1993;59:1318-24.

10. Straub TM, Abbaszadegan M. A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR, Appl Environment Microbiol 1994;60:1014-17.

11. Atmar RL, Neili FH. Detection of norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl Environment Microbiol 1995;61:3014-18.

12. Shieh YSC, Wait D. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enteroviruses detection by the polymerase chain reaction. J Virol Methods 1995;45:51-66.

13. Toze S. Microbial pathogens in wastewater. Technical Report 1997;1:111-43.

14. Reynolds KA, Gerba C. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture–PCR procedure. Appl Environment Microbiol 1996;62:1424-27.

۱۵. کارگر م، رضوی س، خدایی ح. ارزیابی چرخش محیطی انتروویروسهای غیر پولیویی در فاضلاب و آبهای سطحی استان سیستان و بلوچستان در رده های کشت سلولی RD ، Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase . مجله بیماریهای عفونی و گرمسیری، ۱۳۸۴؛ شماره ۳۰، سال دهم، صفحات ۴۰-۳۳.

۱۶. کارگر م، ساریجلو م، طباطبایی ح. چرخش محیطی انتروویروسهای غیر پولیویی در فاضلاب شهر تهران در رده های کشت سلولی RD، Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، ۱۳۸۳؛ شماره ۲، سال سوم، صفحات ۴۸-۳۷.

17. Hovi T. Poliovirus surveillance by examining sewage specimens. Ruantitire recovery of virus after introduction in to sewerage at remote upstream location. Epidemiol Infect 2001;127:101-6.

18. World Health Organization. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. 2003;03.03.:1-19.

19. World Health Organization. Poliovirus diagnostic PCR. Kuwait polio ITD workshop. 1999.

20. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Mulders M. Group specific identification of poliovirus by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine. Residues at positions of codone degeneracy. J Clin Microbiol 1996;34:2990-96.

21. Lewis GD, Molloy SL. Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell-culture. J Appl Microbiol 2000; 88:633-40.

22. Ehlers M, Zyl WB. Random survey of the microbial quality of bottled water in south Africa. Water SA 2004;30:203-10.

23. Reynolds KA, Gerba CP, Abbaszadegan M, Pepper L. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. Can J Microbiol 2001;47:153-57.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-07-19]