

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

دکتر محمد کارگر^۱، سارا صادقی پور^۲، دکتر حمیده طباطبایی^۳، دکتر محبوبه ساریجلو^۴، مریم قدسی^۵، دکتر رخشنده ناطق^۶

^۱ استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

^۲ کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

^۳ استادیار گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران

^۴ استادیار گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران

^۵ کارشناس ارشد گروه ریاضی و آمار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

^۶ استادیار گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران

چکیده

سابقه و هدف: انتروویروس ها یکی از شاخصهای حساس گردش ویروس در اجتماع محسوب می گردند. یکی از روشهای عمده تشخیص انتروویروس ها استفاده از کشتهای سلولی حساس است. اما اخیراً با توجه به زمان بر بودن و همچنین نیاز به انجام تستهای تاییدی، استفاده از روشهای مستقیم مولکولی جهت تشخیص انتروویروس ها مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش به منظور ارزیابی روشهای مختلف حذف بازدارنده های آلی موجود در فاضلاب به منظور تشخیص انتروویروس ها 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 رده های سلولی RD و Hep-2 کشت داده شد. در مرحله بعد با ۱۲ روش مختلف حذف بازدارنده های آلی موجود در فاضلاب با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: از روشهای مورد بررسی تنها با استفاده از روش ICC-RT-PCR موفق به جداسازی تمام ویروس های مورد انتظار شدیم.

نتیجه گیری: با توجه به حساسیت $0.01TCID_{50}$ روش ICC-RT-PCR، انجام مطالعات گسترده تر در سطح کشور به منظور استفاده از این روش به عنوان یک روش حساس و سریع برای تشخیص انتروویروس های عفونی، نمونه های محیطی دارای غلظت کم ویروس و دارای ترکیبات بازدارنده پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: انتروویروس ها، بازدارنده های آلی فاضلاب، RT-PCR

مقدمه

عفونتهای انسانی انتروویروسی می تواند دامنه گسترده ای از علائم حاد را در ماهیچه اسکلتی و قلبی، سیستم عصبی مرکزی، پانکراس، پوست و غشاهای موقوسی را ایجاد نمایند. عفونتهای انتروویروسی با بعضی از بیماریهای مزمن مانند کاردیومیوپاتی، میوکارдит 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 می نماید (۱). 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

انتروویروس های انسانی به زیرگروههای پولیوویروس (۱ تا ۳)، کوکساکسی ویروسهای A (سروتیپ های ۱ تا ۲۲ و ۲۴) و B (سروتیپ های ۱ تا ۶)، اکوویروس ها (سروتیپ های ۱ تا ۷، ۹، ۱۱ تا ۲۷ و ۲۹ تا ۳۳) و انتروویروس های گروه جدید (ENV، ۶۸ تا ۷۱) طبقه بندی شده اند (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

کشت سلولی: برای جداسازی ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیرپولیویبی 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 جدا شده با استفاده از آنتی سرم Pooled Polio (PP)، آنتی‌سرم‌های کوکساکسی ویروس B1 تا B6 (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی‌سرمی مربوط به کوکساکسی 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 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 محتویات مرحله قبل وارد ستون اتصالی (Binding column) واجد لوله ۲ میلی لیتری گردید و در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد ستون اتصالی را به لوله‌های ۲ میلی لیتری جدید منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر بافر w1 (که قبلاً ۳۰ ml اتانل خالص به آن اضافه شده بود) به ستون اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس لوله‌های اتصالی به لوله‌های ۲ میلی لیتری جدیدی انتقال داده شد و ۵۰۰ میکرولیتر بافر W2 (که قبلاً ۸۰ ml اتانل خالص به آن اضافه شده بود) به آن اضافه و ۱ دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. به منظور حذف اتانل یک بار دیگر در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر، پس از انتقال ستون اتصالی به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری 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 ۸۰۰۰ rpm 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 ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس

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، BGM، Hela، HT-29، 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 و کوکساکسی ویروس‌های گروه A نیز به راحتی در کشت سلولی CPE ایجاد نمی‌کنند (۴-۶). 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 (۵، ۶). با استفاده از روش RT-PCR در مدت ۲۴ ساعت می‌توان کمتر از 1 PFU 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، Chelex 100-resin، Sephadex G-100، CTAB، Solvent extraction، Pro-cipitate، polyvinyl polypyrrolidone، 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).

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 ۴ درجه 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، سترات سدیم ۲۵ میلی-مولار (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 میلی-لیتر اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد. در مرحله آخر ۲۰ میکرولیتر آب DEPC به آن اضافه گردید.

(VII) استخراج RNA با استفاده از Sephadex G-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 پروتئیناز-k به فاز رویی اضافه و پس از یک ساعت نگهداری در دمای ۴۵ درجه و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ۲۰۰ میکرولیتر فنل و مخلوط کردن آن و ۵ دقیقه نگهداری در فریزر -۲۰ درجه، در دور ۱۳۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل

مایع رویی جدا شده 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 در دمای 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 و NSP-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 از یک شب (overnight) نگهداری در فریزر -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 ایندرفر و اجد 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.

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 (هر کدام ۲ لوله) تلقیح گردید. در ابتدا به منظور یافتن مناسب‌ترین زمان انکوباسیون چند رده تلقیح شده کشت سلولی، به صورت تصادفی انتخاب و در زمانهای 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 ۱۳۲۰۰ rpm سانتریفیوژ و ۵ میکرولیتر از مایع رویی آن جداسازی گردید.

روش *RT-PCR*: 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 ۵' حفاظت شده انتروویروس‌ها مطابق جدول شماره ۱ طراحی و تهیه گردید.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده به منظور

تشخیص انتروویروس‌ها و ویروس پولیو

اسم پرایمر	پرایمر	آمپلیکون موقعیت
Pan. Enterovirus (Pan E.V)	5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGT TCC-3' 5'-TCCGGCCCTGAATGCGGCTAA TCC-3'	335-448 bp
Pan Poliovirus* (Pan P.V)	5'-TTIAIIGCRTGICCRTRTT-3' 5'-CITAATCIMGITTYGAYATG-3'	2875-2954 bp
Sabin 1 (Sabins)	5'-TCCACTGGCTTCAGTGT-3' 5'-AGGTCAGATGCTTGAAGC-3'	116-162 bp
Sabin 2 (Sabins)	5'-CGGCTTGTGTGTCAGGC-3' 5'-CCGTTGAAGGGATTACTAAA-3'	116-162 bp
Sabin 3 (Sabins)	5'-AGTATCAGGTAAGCTATCC-3' 5'-AGGGCGCCCTAACTTTG-3'	116-162 bp

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

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، ۵ ml آب مقطر دیونیزه)، بافر B (۲۵ میکرولیتر بافر A، ۵ میکرولیتر dNTPs، ۵ میکرولیتر پرایمر Pan E.V، ۵ میکرولیتر پرایمر Pan E.V، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه) و بافر C (۱۳/۷۵ میکرولیتر MgCl2 ۰/۲ مولار، ۰/۷ میکرولیتر DTT

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

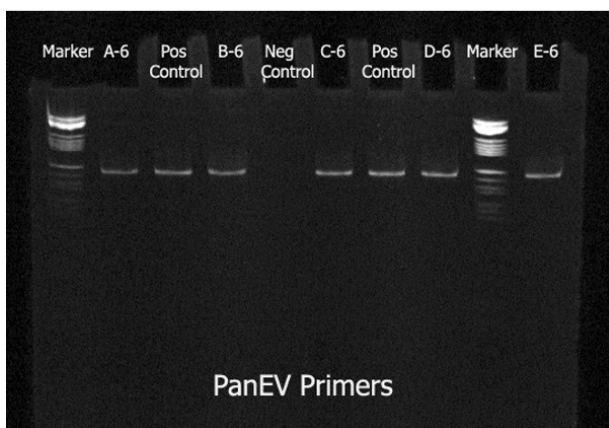
(VIII) *استخراج RNA با استفاده از کیت Bioneer و Sephadex G-120-200*: ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب با ۴۰۰ میکرولیتر بافر VB (۶۰ میلی لیتر PolyA + VB) در داخل لوله ۱/۵ ml مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به محتویات لوله اضافه و مخلوط گردید. سپس به منظور حذف بازدارنده‌های آلی موجود در فاضلاب، ۴۰۰ میکرولیتر Sephadex G-120-200 به ستون اتصالی (Binding column) واجد لوله ۲ میلی لیتری اضافه و در دور ۱۶۰۰ rpm 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 ۱۶۰۰ rpm، برای ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد پس از انتقال ستون اتصالی به لوله‌های ۲ میلی لیتری جدید و افزودن ۵۰۰ میکرولیتر بافر W1 به ستون، یک دقیقه در دور ۸۰۰ rpm 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 تغییر یافته Sephadex G-120-200* و کیت *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 ۱۳۲۰۰ rpm 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 *Bioneer*: به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده فاضلاب ۲۰۰ میکرولیتر Chelex G-100 اضافه و پس از ۵ دقیقه ورتکس، در دور ۱۳۲۰۰ rpm برای ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد.

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 صد هزار 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 جدا شده مربوط به N.T.E.V، E25 و E11 بود. ویروس کوکساکسی B تنها در رده سلولی Hep-2 و فقط با روش Pellet جداسازی گردید. به منظور ارزیابی روشهای مختلف حذف بازدارنده‌ها، ۱۲ انتروویروس جدا شده 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 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 نمونه‌های مثبت با سایز ۱۱۴ bp می‌باشند (حساسیت 0.01TCID50)

مولار، ۶/۹ میکرولیتر RNase-inhibitor، ۳/۶ میکرولیتر Taq DNA AMV reverse transcriptase، ۱۳/۷ میکرولیتر 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. در مرحله بعد پس از سرد کردن ویال‌ها روی یخ، ۵ میکرولیتر از بافر C به هر ویال اضافه گردید. در نهایت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر RT-PCR با شرایط زیر 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 دژنره Pan P.V در شرایط ۹۵ درجه، ۴۵ ثانیه؛ ۴۲ درجه، ۴۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه، ۴۵ ثانیه (برای ۳۰ سیکل). سپس جهت افتراق بین تپیی سوش واکسن از وحشی تمامی ویروس‌های پولیوی جدا شده 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 قیطره، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش

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

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

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

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

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 آزمون‌های 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 ریبونوکلازها، 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) از ستون کروماتوگرافی Sephadex G-50، Chelex-100 resin و Sephadex G-200، Sephadex G-100 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 فنل-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 - کلروفرم (۱:۱) برای ۳ دقیقه ورتکس و در دور $14000 \times g$ 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 $14000 \times g$ 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

Chelex و دوبار استخراج با فنل-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 پولیو-۲ توسط کشت سلولی و RT-PCR ارزیابی نمودند. نتایج نشان داد که خاک رس، هومیک اسید ($150-50/mg$) 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 gel filtration و Chelex به منظور حذف بازدارنده‌های از نمونه‌های محیطی پیشنهاد شده است. Ehler و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۰۴ از روش TRIZOL به منظور استخراج RNA انتروویروس‌ها 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 $12000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از فاز آبی به لوله‌های اپندرف واحد ۳۰ میکرولیتر از استات سدیم ۳ مولار (pH ۵/۲) و ۶۰۰ میکرولیتر اتانل خالص منتقل گردید و یک شب در فریزر -20 درجه نگهداری و سپس در دور $12000 \times g$ برای ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب RNA با ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ (Merk) شستشو و در دور $12000 \times g$ 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 -70 درجه فریز شد. در این پژوهش نیز حذف بازدارنده‌ها با استفاده از ترکیبات Sephadex G-120-200، Chelex-100-resin و TRIZOL 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 (Ca^{2+} ، Mg^{2+}) مانع فعالیت کوفاکتوری کاتیونهای یاد شده در PCR گردد. همچنین کوآنزیم‌های مورد استفاده در RT-PCR نسبت به آلودگیها و مواد بازدارنده

به دلیل جداسازی طیف متفاوتی از انتروویروس‌ها در هر کدام از این دو رده سلولی، استفاده هم‌زمان از این دو رده سلولی برای افزایش حساسیت روش ICC-RT-PCR پیشنهاد می‌شود. همچنین حساسیت این روش برای تشخیص انتروویروس‌ها کمتر از 0.01TCID_{50} 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.

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 انتروویروس‌ها و ویروس هپاتیت A در نمونه‌های محیطی استفاده نمودند. در پژوهش انجام شده توسط این محققین با استفاده از روش ICC/PCR و تلقیح ≥ 10 PFU انتروویروس 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 ۱ PFU و کمتر از ۱ PFU 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 جدا شده با دو روش تغلیظ یاد شده پیشنهاد می‌گردد جهت افزایش کارایی از هر دو روش به صورت هم‌زمان استفاده شود. نتایج بدست آمده نشان دهنده حساسیت بیشتر رده سلولی RD نسبت به Hep-2 می‌باشد. اما

REFERENCES

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

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 پولیووی 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 ۳۳-۴۰.
۱۶. کارگر م، ساریجلو م، طباطبایی ح. چرخش محیطی انتروویروسهای غیر پولیووی 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 ۳۷-۴۸.
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.