ارزیابی چرخش محیطی انتروویروس‌های غیر پولیویی در فاضلاب و آب‌های سطحی استان سیستان و بلوچستان در رده‌های کشت سلولی **RD** و **Hep-2** به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ **Pellet** و **Two-phase**

دکتر محمد کارگر[۱], سعیده السادات رضوی[۲*], سید حامد خدائی[۲], دکتر محبوبه ساریجلو[۳], دکتر حمیده طباطبائی[۳], دکتر شهره شاه محمودی[۳], مهدی کارگر[۴], مریم قدسی[۵], طلعت مختاری آزاد[۶], دکتر رخشنده ناطق[۶]

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. BSc میکروبیولوژی ، کارشناس دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۵. MSc آمار ، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
۶. PhD ویروس شناسی ، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *انتروویروس‌ها از مهمترین ویروس‌های روده‌ای هستند و طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند مننژیت فلج شل حاد(AFP) میوکاردیت ورم ملتحمه عفونت نوزادان و گاهی دیابت را در انسان ایجاد می‌کنند. چرخش انتروویروس‌های غیرپولیویی در جمعیت به سهولت از طریق فاضلاب صورت می‌گیرد. بعد از ریشه‌کنی فلج اطفال این ویروس‌ها شاخص مناسبی جهت پایش محیطی و ارزیابی موفقیت آمیز بودن روش جداسازی و تغلیظ ویروس از نمونه‌های آب و فاضلاب می‌باشند. هدف از این پژوهش جداسازی و تعیین تیپ انتروویروس‌های غیرپولیویی از نمونه‌های فاضلاب و تعیین توزیع و چرخش محیطی آنها در استان سیستان وبلوچستان می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *۸۶ نمونه از ۸ محل در استان سیستان و بلوچستان به روش Grab sample در چهار فصل تهیه و به صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ : Two-phase و Pellet، انتروویروس‌های غیرپولیویی در رده‌های سلولی RD و Hep-2 جداسازی و سپس ویروس‌های جدا شده با روش میکرونوترالیزاسیون شناسایی گردید.*

یافته‌ها: *از مجموع نمونه‌های مورد بررسی با روش مستقیم Pellet وTwo-phase به ترتیب:۱۲/۷۹٪، ۳۶/۰۵٪ و ۵۱/۱۶٪ انتروویروس غیرپولیویی جداسازی شد. بیشترین فراوانی انتروویروس‌های غیرپولیویی جدا شده مربوط به E4 (۲۰٪) کوکساکی B (۱۶/۳۶٪) و E11 (۱۴/۵۵٪) بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این پژوهش تاییدی بر کفایت روش پیشنهاد شده Pellet و صحت پایش محیطی ویروس پولیو در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد. در پایان، بررسی ارتباط بیماری‌های ناشی از انتروویروس‌های غیرپولیویی با چرخش محیطی این ویروس‌ها در نقاط مختلف کشور پیشنهاد می‌گردد.*

واژگان کلیدی : ***پایش محیطی، انتروویروس غیرپولیویی(NPEV)، سیستان و بلوچستان, فاضلاب***

دریافت مقاله: مرداد هشتاد و چهار
پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و چهار

*آدرس برای مکاتبه: اصفهان ، پل بزرگمهر ، ابتدای خیابان بزرگمهر ، کوی گلبرگ ، پلاک ۱۹ ، کدپستی ۸۱۵۸۸
shkhmic@yahoo.com

مقدمه

انتروویروس‌ها از جمله پاتوژن‌های مهم انسانی هستند که در خانواده پیکورنا ویریده قرار دارند و بر اساس بیماری زایی به گروه‌های پولیو ویروس (۳ سروتیپ)، کوکساکی ویروس A (۲۳ سروتیپ)، کوکساکی ویروس B (۶ سروتیپ)، اکوویروس‌ها (۳۱ سروتیپ) و انتروویروس‌های جدید طبقه‌بندی می‌شوند (۱،۲). انتقال این ویروس‌ها معمولاً از مسیر مدفوعی

ـ دهانی یا از طریق دستگاه تنفسی صورت می‌گیرد. این ویروس‌ها پس از تکثیر در دستگاه گوارش یا تنفسی می‌توانند وارد سیستم گردش خون شده و عفونت‌های سیستمیک ایجاد کنند (۳). ورود انترووویروس‌ها به سیستم عصبی مرکزی ممکن است به صورت فلج شل حاد(Acute Flaccid Paralysis) تظاهر نماید. به همین دلیل با وجود ریشه کنی ویروس پولیو در اغلب کشورهای دنیا، فلج شل حاد ناشی از انترووویروس‌ها هنوز شایع است (۴).

انترووویروس‌ها به محدوده وسیعی از pH و دما مقاوم‌اند (۵،۶) و در شرایطی مانند: فقر بهداشتی، تراکم جمعیت و نامناسب بودن سیستم‌های تخلیه فاضلاب، انتقال عفونت‌های انترووویروسی افزایش می‌یابد (۴).

بسیاری از انترووویروس‌ها با سندرم‌های خاصی مرتبط می‌باشند. به عنوان نمونه، کوکساکی ویروس‌ها عامل اصلی ایجاد کننده بیماری‌های قلبی هستند. کوکساکی ویروس‌های گروه A معمولا عامل بیماری‌های دست، پا و دهان (HFM)، ورم ملتحمه هموراژیک (AHC)، فلج شل حاد، هرپانژین و بیماری‌های تنفسی می‌باشند. برای نمونه، ورم هموراژیک حاد ملتحمه اولین بار در سال ۱۹۶۹ در غنا و اندونزی شناسایی شد. همچنین اپیدمی ناشی از این بیماری در هند و جنوب شرقی آسیا و شیوع بیماری‌های دست، پا و دهان در مالزی (سال ۱۹۹۷) و کشورهای تایوان و چین (سال ۱۹۹۸) گزارش شده است.

کوکساکی ویروس‌های گروه B بیماری‌هایی مانند: مننگوانسفالیت، فلج اسپاسمی (Spastic paralysis)، میوکاردیت و پریکاردیت ایجاد می‌نماید. همچنین هر دو گروه کوکساکی ویروس‌های A و B می‌توانند مننژیت آسپتیک و دیابت ایجاد کنند. عفونت‌های اکوویروسی می‌تواند از یک سرماخوردگی معمولی همراه با تب تا مننژیت آسپتیک و ورم هموراژیک حاد ملتحمه متغیر باشد (۳،۵،۷).

شیوع بیماری‌های ناشی از انترووویروس‌های غیرپولیویی درکودکان کم سن و سال بیشتراست. به عنوان نمونه، هرپانژین در کودکان ۳ ماهه تا ۱۶ ساله و فلج شل حاد، در کودکان زیر ۱۵سال دیده می‌شود. مننژیت آسپتیک در کودکان نسبت به بالغین شایع‌تر است، اما ورم هموراژیک حاد ملتحمه بیشتر در افراد ۲۰ تا۵۰ ساله مشاهده می‌شود (۵).

الگوی اپیدمیولوژیکی بیماری‌های انترووویروسی با توجه به مناطق جغرافیایی و آب و هوا تغییر می‌کند. بیماری‌های انترووویروسی در مناطق معتدل، در تابستان و پاییز و در مناطق گرمسیری در تمامی فصول شایع است(۳).

برنامه جهانی ریشه کنی ویروس وحشی پولیو با نظارت سازمان بهداشت جهانی در حال انجام است. در این برنامه به صورت هم زمان دو هدف ایمن‌سازی گسترده با واکسن خوراکی پولیو (OPV) و پایش سیستمیک موارد فلج باقیمانده انجام می‌شود. برنامه پایش عمدتاً شامل پژوهش‌های اپیدمیولوژیک و ویرولوژیک موارد فلج شل حاد است. پایش تکمیلیAFP در بعضی کشورها با آنالیز چرخش ویروس پولیو در جمعیت‌های انسانی از طریق بررسی نمونه‌های فاضلاب آلوده با عناصر مدفوعی انسانی (پایش محیطی) و روش‌های تشخیصی متداول ویروس‌شناسی (پایش انترووویروس‌ها) انجام می‌شود (۸،۹).

متاسفانه تاکنون هیچ بررسی اپیدمیولوژیکی دقیقی در مورد چرخش انترووویروس‌های غیرپولیویی در ایران انجام نگرفته بود. هدف از این پژوهش جداسازی و تعیین تیپ انترووویروس‌های غیرپولیویی از نمونه‌های فاضلاب استان سیستان و بلوچستان جهت ارزیابی توزیع و چرخش محیطی انترووویروس‌های غیرپولیویی و همچنین تایید روش تغلیظ مورد استفاده جهت پایش محیطی ویروس پولیو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌گیری:

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، ۴۸ نمونه با روش grab sample تهیه

شد. تمامی نمونه‌ها مربوط به فاضلاب خام (Raw sewage) بودند و از قسمت ورودی فاضلاب(Inffluent) جمع‌آوری شدند.
حجم تمامی نمونه‌ها یک لیتر بود و توسط ظروف پلاستیکی در پوش دار به آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز کشوری فلج اطفال (NPL) واقع در انستیتو تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردید. در تمامی موارد مشخصات نمونه فاضلاب (محل نمونه برداری، 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.

ب) تیمار نمونه‌ها

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 لوله ها 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 لیتری ریخته و PEG6000، ۳۰٪ (Merk) و دکستران۲۰٪ مربوط به باکتری Leuconostoc mesenteroides (D5376, sigma) با وزن مولکولی 2000000 و ۵ مولار به ترتیب به میزان: ۱۳۳/۶ گرم (W/V)، NaCl(Merk) ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی لیتر (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 جدا کننده (Separation funnel) ۴۰۰ میلی‌لیتری ریخته و یک شب (Overnight) در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. در مرحله بعد ۵ میلی لیتر از لایه رسوب انتهایی (bottom phase) و لایهٔ تشکیل شده در بین دو فاز (Interphase) جمع آوری شد و به یکی از لوله‌های Pellet مرحله قبل اضافه گردید (۱۰) .
در مرحله آخر برای از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها به ۴ میلی لیتر از نمونه‌های مستقیم و تغلیظ رسوبی و دو فازی، یک میلی لیتر کلروفرم خالص (Merk) اضافه و ۲۰ دقیقه در دور 200RPM بر روی شیکر لوله قرار داده شد. سپس ۱۰ دقیقه محتویات لوله در دور۲۰۰۰RPM و حرارت ۵ درجه سانتریفیوژ و مایع تیمار شده رویی در کرایو تیوب‌های استریل جمع‌آوری گردید.

ج) کشت سلولی

از رده‌های سلولی RD وHep-2 برای جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی استفاده شد. حساسیت رده‌های سلولی به وسیله انترویروسهای موجود در آزمایشگاه تعیین گردید.
برای هر ۳ تیمار یک نمونه فاضلاب، ۶ لوله کشت سلولیRD 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 لوله ها با میکروسکوپ معکوس (Inverted Microscope) بررسی و نمونه‌های مثبت در دمای ۲۰- درجه نگهداری می‌گردید. 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 می شد.

د) تست نوترالیزاسیون

برای انجام این تست از پلیت‌های میکروتیتر (میکرو پلیت) استفاده شد. برای هر ویروس جدا شده از آنتی‌سرم pooled polio (PP)، آنتی سرم های کوکساکی ویروس‌های B1 تا B6 (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی‌سرمی مربوط به کوکساکی ویروسA9 و۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نام های A تا G استفاده شد.

نوترالیزاسیون ویروس با آنتی‌سرم PP، نشان دهندهٔ ویروس پولیو و خنثی شدن با آنتی سرم CP تأئید کننده وجود ویروس کوکساکی B می‌باشد(۱۰).

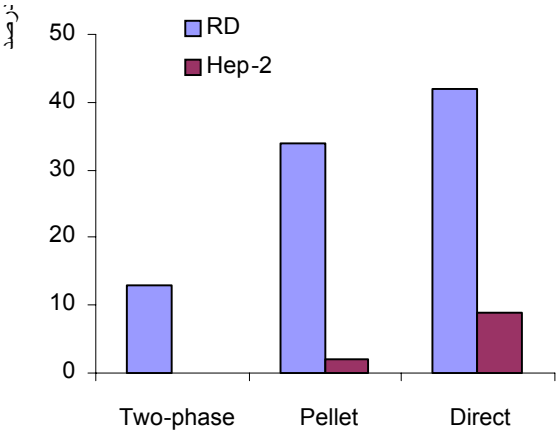
در مورد اکـــوویـروس‌ها، هر مــجموعه آنتـــی‌ســـرمی (pooled) شامل چندین آنتی‌بادی عـلیه انـتروویروس‌هـای مخـتلف اسـت و معـمولاً نوترالیزاسیون با دو آنتی سرم A تا G صورت می‌گیرد و نوع ویروس با استفاده از جدول راهنمای WHO تعیین گردید. اگر نمونه انتروویروس احتمالی با هیچ کدام از آنتی‌سرم‌ها خنثی نشود، نشان دهندهٔ وجود مخلوطی از چند ویروس و یا وجود انتروویروس غیر قابل تیپ (N.T.E.V) با آنتی‌سرم‌های موجود در کیت است.

ه) آنالیز آماری

آنالیز آماری نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS Ver 13 و آزمون‌های آنالیز واریانس وLSD انجام شد. مرز معنی‌داری روی $P < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته ها

از فروردین تا اسفند ماه سال ۱۳۸۳، ۸۶ نمونه از فاضلاب دو سیستم تصفیه فاضلاب زابل و جام جم زاهدان، ۵ بیمارستان شامل امیرالمومنین زابل، تامین اجتماعی، خاتم الانبیاء و علی بن ابیطالب 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 فاضلاب زابل با یکصد و بیست هزار نفر (۵۴/۹۷٪) و جام جم زاهدان با پنجاه هزار نفر (۲۲/۹۰٪) بود . نمونه گیری طوری طراحی شده بود که فراوانی توزیع نمونه برداری از واحدهای مورد پژوهش تقریبا یکسان باشد. به طور متوسط در هر فصل ۲۱ نمونه جمع آوری و انتروویروس‌های غیر پولیویی به صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase در رده‌های سلولی حساس RD و Hep-2 جداسازی گردید. از مجموع ۸۶ نمونه جمع‌آوری شده ، از ۴۹ نمونه (۵۶/۹۸٪) انتروویروس و از ۴۶ نمونه (۵۳/۴۹٪) نیز صرفاً انتروویروس‌های غیرپولیویی جداسازی گردید. بیشترین فراوانی جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی به ترتیب مربوط به مرکز تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان با فراوانی ۱۶/۲۸٪ و مرکز تصفیه فاضلاب زابل با فراوانی ۱۲/۷۹٪ بود. از مجموع انتروویروس‌های غیرپولیویی جدا شده ۱۱ مورد با روش مستقیم (۱۲/۷۹٪) و به ترتیب ۳۱ (۳۶/۰۵٪) و ۴۴ (۵۱/۱۶٪) مورد با روش Pellet و Two-phase جداسازی گردید. بیشترین فراوانی انتروویروسهای غیرپولیویی جدا شده مربوط به E4، Cox-B و E11 به ترتیب با فراوانی ۲۰، ۱۶/۳۶ و ۱۴/۵۵٪ بود. پس از بررسی نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS13 و انجام آزمون آنالیزواریانس (ANOVA) و سپس Post Hoc مشخص شد که بین روش مستقیم و دو روش تغلیظ Pellet وTwo-phase در جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). میزان جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی در رده سلولی RD اختلاف معنی داری با رده سلولیHep-2 نشان داد(نمودار ۱).



نمودار ۱ : توزیع فراوانی مطلق انتروویروس های غیر پولیویی جدا شده بر روی رده های سلولی RD و Hep-2 با سه روش مختلف

ویروس کوکساکی B تنها در رده سلولی Hep-2 و بیشتر با روش Two-phase (۹/۳۰٪) جداسازی گردید. مطابق جدول ۲، میزان جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی در فصول پاییز و زمستان (با هر سه روش) الگوی مشابهی را نشان می‌دهد. بیشترین میزان جداسازی ویروس با روش Pellet در فصل

زمستان (۱۵/۱۲٪) و با روش Two-phase در فصل پاییز (۱۸/۶۰٪) صورت گرفت .

بحث

هر آبی که در معرض فاضلاب قرار گیرد و همچنین آب‌های سطحی، زیر زمینی و آب‌های لوله‌کشی پتانسیل آلودگی با انترویروس‌ها را دارند. به همین دلیل جداسازی انترویروس‌ها در فاضلاب یکی از شاخص‌های حساس گردش ویروس در اجتماع محسوب می‌شود(۱۱).

تحقیقات در آمریکا نشان می‌دهد که انترویروس‌های غیرپولیویی سالیانه عامل ایجاد ۱۰ تا ۱۵ میلیون عفونت دارای علائم بالینی می‌باشند و بر اساس داده‌های جمع‌آوری شده در طول ۱۴ سال (سال های ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۳)، بیشترین سروتیپ گزارش شده E11بوده است. بررسی‌های انجام شده در سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۰ در کشور آلمان نشان می‌دهد که سروتیپ های غالب انترویروسی جداشده مربوط به E30 ، Cox-B و E11 و به صورت موردی E4 و E13 بوده است (۱۲). همچنین در دانمارک فراوان ترین انترویروس جداشده در سال ۲۰۰۰ ، E30 گزارش شده است (۱۳). در سال ۱۹۹۶، Hovi و همکارانش با مقایسه انترویروس‌های جدا شده از فاضلاب و نمونه‌های کلینیکی در کشور فنلاند به این نتیجه رسیدند که ویروس‌های E6, E11, CB5, CB4 به ترتیب سروتیپ‌های غالب موجود در فاضلاب می‌باشند، در حالی که بیشترین سروتیپ جداشده از نمونه‌های کلینیکی CA9, E30 و E22 بود (۱۴).

در این پژوهش بیشترین فراوانی انترویروس‌های غیرپولیویی جدا شده به ترتیب مربوط به Cox-B، E4 و E11 بود.

مطالعات انجام شده بر روی انترویروس‌ها در ژاپن نشان می‌دهد که در سال ۱۹۹۱،E17، E6 و CB5 ، در سال ۲۰۰۰، E9 ، E71 ، E25 و E11 و در سال ۲۰۰۱، E11 و CB5 نقش اصلی را در ایجاد اپیدمی‌های مننژیت آسپتیک در این کشور داشته‌اند. همچنین در سال ۲۰۰۲، بیشترین انترویروس غیرپولیویی جدا شده در موارد مننژیت آسپتیک، E11 بوده است. در صورتی که E71 اغلب با موارد انسفالیت حاد ارتباط داشت (۱۵). به دنبال شیوع گسترده مننژیت آسپتیک حاد در سال ۲۰۰۰ در کوبا تحقیقات انجام گرفته در این کشور وجود Cox-A9 و Cox-A11 و اغلب تیپ‌های معمول اپیدمیک از جمله E11, E4 را نشان داد (۱۶).

با توجه به طیف گسترده عفونت‌های انترویروسی و متغیر بودن الگوهای اپیدمیولوژیکی مانند محدوده جغرافیایی، فصل و سن (۱۲)، ضرورت بررسی‌های بیشتر در مورد ارتباط بیماریهای ناشی از انترویروس‌های غیرپولیویی با چرخش محیطی این ویروس‌ها در مناطق مختلف ایران پیشنهاد می‌شود. این چنین مطالعاتی می‌تواند زمینه ساز تهیه واکسن مناسب در آینده به منظور پیشگیری از عفونت‌های شایع انترویروسی در مناطق پرخطر کشور باشد.

مطابق بولتن ارائه شده توسط WHO در سال ۲۰۰۳، معیار موفقیت آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مراحل آخر ریشه کنی فلج اطفال تشخیص انترویروس‌های غیرپولیویی در حداقل ۳۰٪ از نمونه‌های فاضلاب است (۱۰).

از ۸۶ نمونه جمع‌آوری شده در این پژوهش، ۱۲/۷۹٪ انترویروس‌های غیرپولیویی با روش مستقیم، ۳۶/۰۵٪ با روش Pellet و ۵۱/۱۶٪ با روش Two–phase جداسازی گردید که این نشان دهنده مقبولیت دو روش Pellet و Two–phase برای جداسازی انترویروس‌های غیرپولیویی می‌باشد

ما در این پژوهش برای اولین بار روش کم هزینه Pellet را که می‌تواند در زمان بسیار کم کارآیی لازم جهت تغلیظ انترویروس‌ها داشته باشد را معرفی کردیم. با توجه به متفاوت بودن نوع و تعداد انترویروس‌های جدا شده با این دو روش در بعضی از موارد، استفاده هم زمان از دو روش Pellet و Two–phase جهت پایش دقیق تر محیطی پیشنهاد می‌گردد.

در حال حاضر ۶۴ سروتیپ از انترویروس‌ها شناخته شده اند که از لحاظ آنتی‌ژنی و قدرت رشد بر روی رده‌های سلولی با یکدیگر متفاوت‌اند (۱۲). تاکنون هیچ رده سلولی که قادر به جداسازی همه انترویروس‌ها باشد، شناسایی نشده است. تحقیقات انجام شده در سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۲ در Wisconsin و Milwaukee آمریکا نشان داد که رده سلولیRD بهترین محیط کشت سلولی برای جداسازی اکوویروس‌ها می‌باشد (۱۷). همچنین مطالعات

مشابه نشان داده که برای جداسازی کوکساکی ویروس‌های گروه B بهترین رده سلولی Hep-2 می‌باشد (۱۸).
به همین دلیل در این پژوهش به منظور شناسایی طیف گسترده تری از انترووویروس‌های غیرپولیویی از هر دو رده سلولی RD و Hep -2 استفاده شد.
نتایج بدست آمده نشان دهنده جداسازی ۵۳/۴۹ ٪ و ۱۰/۴۷ ٪ از انترووویروس‌های غیر پولیویی به ترتیب بر روی رده‌های سلولی RD و Hep-2 می‌باشد. بدین ترتیب نتایج این پژوهش نیز تایید کننده افزایش توان جداسازی انترووویروس‌های غیر پولیویی با استفاده هم زمان از دو رده سلولی RD و Hep-2 می‌باشد.
به دلیل مقاومت انترووویروس ها به فرآیند تصفیه فاضلاب، امکان شیوع عفونت‌های انترووویروسی از این طریق وجود دارد. به همین دلیل انجام مطالعات گسترده جهت طراحی سیستم‌های کارآمدتر تصفیه پیشنهاد می‌گردد.
به دنبال ریشه کنی ویروس وحشی پولیو در کشورهای پیشرفته مانند آمریکا و کانادا به دلیل تنوع، گستردگی و شیوع بیماری‌های انترووویروسی، مراکز ملی پایش انترووویروس‌ها (US National Enteroviruses surveillance system) دایر شده است (۱۶). با توجه به حذف کامل ویروس وحشی پولیو از نمونه‌های کلینیکی، به منظور ارزیابی اپیدمیولوژیک بیماری‌های انترووویروسی ضرورت برنامه‌ریزی مدون جهت پایش محیطی و کلینیکی انترووویروس‌ها وجود دارد. امید است که این پژوهش زمینه‌ساز ارزیابی گسترده‌تر در این مورد در نقاط مختلف 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 تهران ابراز می‌دارند. همچنین از جناب آقای دکتر گویا ریاست محترم مرکز مدیریت بیماری‌های وزارت بهداشت و مسؤولین محترم مراکز بهداشت زاهدان، زابل و چابهار نیز صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. Semler B.L, Wimner E, Molecular Biology of Picornaviruses , pathogenicity , ASM , 2002 .537-450.
2. Pallansch M, Roos RP, Fileds Virology ,Enteroviruses:Polioviruses,Coxackieviruses , Echoviruses and Newer Enteroviruses, 4thed. 2001 24723-776.
3. WHO , Enteroviruses-non polio, Media center, 2005 ; 1-12 .
4. Wyn-Jones A.P, Sellwood J, Enteric viruses in the aquatic environment, Journal of Applied Microbiology, 2001; 91:945-962.
5. Dua P, Enteroviruses, eMedicine Instant Access to the Minds of Medicine , 2005; 1-12 .
6. Abbaszadegan m, Advanced Detection of Viruses and Protozoan Parasites in Water , Reviews in Biology and Biotechnology, 2001;1(2):21-26 .
7. Tougianidou D, Botzenhart K. , Molecular techniques for the detection of enteroviruses in water , OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water , Interlaken 98 , 1998;1-4 .
8. Blomqvist S, Savolainen C, Hovi T, Characterization of a Highly Evolved Vaccine-Derived Poliovirus Type 3 Isolated from Sewage in Estonia , Journal of Virology , 2004;78(9):4876-4883 .
9. WHO, Global Polio Eradication Initiative: strategic plan 2004-2008 . WHO Publications, 2003;1-40 .
10. WHO/V&B/03.03, Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, Vaccines and Biologicals, 2003 ;1-19.
11. Bosch A, Human enteric viruses in the water environment : a minireview , Internatl Microbiol , 1998;1:191–196.

12. Diedrich S, Schreier c, Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13 , BMC Infectious Diseases , 2001;1(14):1-7 .
13. Vestergaard H.T, Johnsen C.K, An unusual enterovirus outbreak in Denmark: clinical characteristics and molecular epidemiology , Scandinavian Journal of Infectious Diseases , 2004;36(12):840 – 847.
14. Poyry T, Hovi T, Virus in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in finland , Applied and Environmental Microbiology, 1988 ;54:371-374 .
15. IASR , The trend of enterovirus isolation in association with aseptic meningitis, 1999-2002, 2002 ;23(8):93-194 .
16. Sarmiento L. , Mas P. , Goyenechea A. , First Epidemic of Echovirus 16 Meningitis in Cuba , CDC , 2001;7(5):1-4 .
17. Sedmak G. , Bina D. , Assessment of an Enterovirus Sewage Surveillance System by Comparison of Clinical Isolates with Sewage Isolates from Milwaukee, Wisconsin, Collected August 1994 to December 2002 , Applied and Environmental Microbiology , 2003;69(12): 7181-7187 .
18. WHO , Polio Laboratory Manual , Department of vaccines and Biologicals , 2001;1-133 .

جدول ۱ : توزیع فراوانی مطلق و نسبت (درصد) مجموع انتروویروس های غیرپولیویی و انتروویروس های جدا شده با سه روش مختلف بر حسب کل نمونه

ویروس	انتروویروس های غیر پولیویی			انتروویروس		
روش	**Direct**	**Pellet**	**Two-phase**	**Direct**	**Pellet**	**Two-phase**
واحد مورد پژوهش	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)
بیمارستان امیرالمومنین زابل	(۲/۳۳)۲	(۳/۴۹)۳	(۵/۸۱)۵	(۳/۴۹)۳	(۳/۴۹)۳	(۵/۸۱)۵
مرکز تصفیه فاضلاب زابل	(۵/۸۱)۵	(۹/۳۰)۸	(۱۲/۷۹)۱۱	(۵/۸۱)۵	(۱۱/۶۳)۱۰	(۱۷/۴۴)۱۵
بیمارستان تامین اجتماعی زاهدان	(۱/۱۶)۱	(۲/۳۳)۲	(۲/۳۳)۲	(۱/۱۶)۱	(۲/۳۳)۲	(۲/۳۳)۲
بیمارستان خاتم الانبیا زاهدان	(۰)۰	(۲/۳۳)۲	(۲/۳۳)۲	(۰)۰	(۲/۳۳)۲	(۲/۳۳)۲
بیمارستان علی ابن ابیطالب زاهدان	(۰)۰	(۶/۹۸)۶	(۵/۸۱)۵	(۰)۰	(۸/۱۴)۷	(۶/۹۸)۶
مرکز تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان	(۳/۴۹)۳	(۸/۱۴)۷	(۱۵/۱۳)۱۳	(۳/۴۹)۳	(۱۱/۶۳)۱۰	(۲۰/۹۳)۱۸
بیمارستان بزرگ چابهار	(۰)۰	(۲/۳۳)۲	(۵/۸۱)۵	(۱/۱۶)۱	(۴/۶۵)۴	(۹/۳۰)۸
روستاهای چابهار	(۰)۰	(۱/۱۶)۱	(۱/۱۶)۱	(۰)۰	(۱/۱۶)۱	(۱/۱۶)۱
جمع	(۱۲/۷۹)۱۱	(۳۴/۰۵)۳۱	(۵۱/۱۶)۴۴	(۱۵/۱۲)۱۳	(۴۵/۳۵)۳۹	(۶۶/۲۸)۵۷

جدول ۲ : توزیع فراوانی مطلق و نسبت (درصد) تعداد انتروویروس های غیر پولیویی جدا شده بر حسب فصل به سه روش مختلف

ویروس	انتروویروس های غیر پولیویی			انتروویروس		
روش	**Direct**	**Pellet**	**Two-phase**	**Direct**	**Pellet**	**Two-phase**
فصل	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)	تعداد(٪)
بهار	(۰)۰	(۱/۱۶)۱	(۳/۴۹)۳	(۱/۱۶)۱	(۲/۳۳)۲	(۵/۸۱)۵
تابستان	(۲/۳۳)۲	(۹/۳۰)۸	(۱۷/۴۴)۱۵	(۲/۳۳)۲	(۱۰/۴۷)۹	(۳۳/۳۶)۲۰
پاییز	(۴/۶۵)۴	(۱۰/۴۷)۹	(۱۸/۶۰)۱۶	(۴/۶۵)۴	(۱۵/۱۳)۱۳	(۲۲/۰۹)۱۹
زمستان	(۵/۸۱)۵	(۱۵/۱۳)۱۳	(۱۱/۶۳)۱۰	۶۹/۹۸)۶	(۱۷/۴۴)۱۵	(۱۵/۱۲)۱۳
جمع	(۱۲/۷۹)۱۱	(۳۶/۰۵)۳۱	(۵۱/۱۶)۴۴	(۱۵/۱۲)۱۳	(۴۵/۳۵)۳۹	(۶۶/۲۸)۵۷