



مقایسه دو روش ICC-RT-PCR و کشت سلولی به منظور تشخیص

انتروویروس ها در نمونه های فاضلاب

دکتر محمد کارگر^{۱*}، سارا صادقی پور^۱، دکتر حمیده طباطبایی^۲، دکتر رخشنده ناطق^۲

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، ^۲گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: انتروویروس ها یکی از مهم ترین ویروس های روده ای هستند که طیف وسیعی از بیماری ها را در انسان ایجاد می کند. اخیراً با توجه به زمان بر بودن و همچنین نیاز به انجام تست های تائیدی، استفاده از روش های مولکولی جهت تشخیص انتروویروس ها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش ارزیابی روش های ICC-RT-PCR و کشت سلولی برای تشخیص انتروویروس های موجود در سیستم فاضلاب است.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۶۳ نمونه فاضلاب با روش Grab sample تهیه و با روش های Pellet و Two-Phase تغلیظ و در رده های سلولی RD و HEp-2 کشت داده شد. در مرحله بعد، تمامی نمونه ها به کشت های سلولی حساس RD و HEp-2 تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در حرارت ۳۶ درجه سانتی گراد، با استفاده از پرایمرهای Pan E.V، Pan P.V و پرایمرهای اختصاصی Sabin بر روی نمونه های کشت سلولی تست RT-PCR انجام شد.

یافته ها: از مجموع نمونه های مورد بررسی، با استفاده از روش کشت سلولی از ۳۳ نمونه انتروویروس (۵۲/۳۸ درصد) و توسط روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه انتروویروس (۶۵/۰۷ درصد) و از ۶ نمونه ویروس پولیو (۹/۵۲ درصد) جداسازی گردید. نتیجه گیری: با آنالیز آماری مشخص شد که بین روش های کشت سلولی و ICC-RT-PCR ارتباط معنی داری در سطح ۰/۰۵ برای جداسازی انتروویروس ها وجود دارد. همچنین حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس ها کمتر از ۰/۰۱، TCID50 ارزیابی شد که می تواند نشان دهنده قابل قبول بودن و حساسیت این روش برای تشخیص انتروویروس های موجود در فاضلاب باشد.

واژگان کلیدی: انتروویروس ها، فاضلاب، ICC-RT-PCR، کشت سلولی.

دریافت مقاله: اردیبهشت ۱۳۸۷ پذیرش برای چاپ: تیر ۱۳۸۷

مقدمه

گاهی نیز بیماری های منجر به مرگ را ایجاد می نمایند (۲). 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 مدت طولانی می توانند به صورت عفونی باقی بمانند. به همین دلیل با جستجوی انتروویروس ها در نمونه های محیطی و فاضلاب، می توان به نحوه انتشار ویروس و بررسی تقریبی افراد آلوده شده در یک جمعیت پی برد (۳).

یکی از روش های متداول تشخیص انتروویروس ها استفاده از رده های حساس سلولی مانند: HEp-2، RD، L20B،

انتروویروس ها در خانواده پیکورناویریده قرار دارند و شامل: پولیوویروس ها، کوکساکسی ویروس های A و B، اکوویروس ها و انتروویروس های تیپ ۶۸ تا ۷۱ می باشند (۱). عفونت های انتروویروسی با بعضی از بیماری های مزمن مانند: کاردیومیوپاتی، میوکاردیت مزمن، سندرم خستگی مزمن، سندرم پس از پولیو، دیابت شیرین و بیماری های عصبی در ارتباط بوده و همچنین

(* آدرس برای مکاتبه: جهرم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم،

ICC-RT-PCR و کشت سلولی برای تشخیص انتروویروس ها از نمونه های تغلیظ شده فاضلاب است.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و تغلیظ: ۶۳ نمونه از آذرماه ۱۳۸۴ تا آبان ماه ۱۳۸۵ با همکاری شرکت آب و فاضلاب از ۶ سیستم تصفیه فاضلاب اصلی شهر تهران (قیطریه؛ ۱۱، صاحبقرانیه؛ ۱۱، زرگنده؛ ۵، اکباتان؛ ۱۱، محلاتی؛ ۱۲ و شوش؛ ۱۳) با روش Grab sample تهیه و با روش تغییر یافته Two-Phase پیشنهاد شده توسط Hovi و همکاران در سال ۲۰۰۱ مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

ب) کشت سلولی و تست میکرونوترالیزاسیون: برای جداسازی ویروس پولیو و انتروویروس های غیر پولیویی از رده های سلولی RD و HEp-2 استفاده شد. میزان افزودن فاضلاب به هر لوله کشت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بود و هر نمونه به ۲ لوله کشت سلولی تلقیح گردید. پس از ۷ روز گرمخانه گذاری در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد تمامی لوله ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس از نظر ظهور اثرات مخرب سلولی (CPE) مورد بررسی قرار گرفت و سپس ویروس های جدا شده با استفاده از آنتی سرم پولیو (Pooled PolioPP) و آنتی سرم های کوکساکسی ویروس B1 تا B6 (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی سرمی مربوط به کوکساکسی ویروس A9 و ۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نام های A تا G یا روش میکرونوترالیزاسیون شناسایی گردید (۲۲).

ج) تست تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR (ICC-RT-PCR): برای جداسازی انتروویروس ها، ابتدا رده های سلولی RD، HEp-2 تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه فاضلاب تغلیظ شده به چهار لوله کشت سلولی تلقیح گردید و در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد برای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بدین منظور هر دو لوله مربوط به رده سلولی RD و HEp-2 جداگانه با هم مخلوط و پس از فریز کردن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و گرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) به مدت یک دقیقه در دور rpm 13200، سانتریفیوژ و ۵ میکرولیتر از مایع رویی آن به منظور انجام RT-PCR جداسازی گردید. برای انجام RT-PCR در ابتدا پرایمرهای اختصاصی Pan E.V، Pan P.V، Sabin و II، I، و III، طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی برای انتهای حفاظت شده ۵ انتروویروس ها طراحی و تهیه گردید (۲۲ و ۲۳).

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،

VERO، BGM، Hela، SKCO1 و HT-29 است (۴). اگر چه اکثر ویروس های رده ای توانایی تکثیر بر روی رده های کشت سلولی را دارند، اما بعضی از ویروس های رده ای مانند: هپاتیت A، نورواک ویروس ها، روتاویروس ها و کوکساکسی ویروس های گروه A به راحتی در کشت سلولی CPE ایجاد نمی کنند (۵، ۶). از طرفی هنوز هیچ رده سلولی حساسی برای تشخیص تمامی سروتیپ های شناخته شده انتروویروس شناسایی نشده است. با توجه به مشکلات یاد شده استفاده از روش های مولکولی مانند RT-PCR به منظور تشخیص مستقیم انتروویروس ها و سایر ویروس های رده ای مورد توجه ویروس شناسان محیطی بوده است. اما استفاده از این روش به دلیل وجود بازدارنده های آلی موجود در فاضلاب مشکلات زیادی را به همراه داشته است (۲، ۶ و ۷). Chomeczynski و همکاران (۸) در سال ۱۹۸۷، Abbaszadegan و همکاران (۹) در سال ۱۹۹۳، Berger و همکاران (۱۰) در سال ۱۹۹۴ و همچنین Bosh و همکاران (۱۱) در سال ۱۹۹۸، از روش هایی مانند: گوانیدین ایزو تیوسیانات/ فنل و کلروفرم، سفادکس G-100، رزین چیلاکس-۱۰۰، دیالیز، پروتئیناز، جذب اسید نوکلئیک و لیوفیلیزاسیون جهت حذف بازدارنده ها به منظور تشخیص مستقیم انتروویروس ها استفاده نموده اند (۲، ۶، ۷ و ۹).

برای اولین بار Reynolds و همکاران در سال ۱۹۹۶، استفاده از روش تلفیقی کشت سلولی و RT-PCR (ICC-RT-PCR) را به منظور تشخیص وجود انتروویروس ها در نمونه های فاضلاب در مدت ۲۴ ساعت پیشنهاد کردند (۱۲). سپس Tougianidou و همکاران (۵) در سال ۱۹۹۸، Chapron و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۰۰، Ballester و همکاران (۱۴) در سال ۲۰۰۴ و Dale و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۳ از روش ICC-RT-PCR به منظور شناسایی انتروویروس ها، آستروویروس ها، آدنوویروس ها و روتاویروس ها، در آب های سطحی، رودخانه، دریا و فاضلاب استفاده نمودند. ما در پژوهش های قبلی با استفاده از رده های کشت سلولی RD، L20B و HEp-2 و همچنین دو روش تغلیظ مختلف Pellet و Two-Phase پایش محیطی انتروویروس ها در فاضلاب و آب های سطحی شهر تهران (۱۷ و ۱۹)، استان سیستان و بلوچستان (۱۵ و ۱۶) و استان فارس (۲۰) را مورد بررسی قرار دادیم. همچنین در بررسی دیگری ۲۸ روش مختلف حذف بازدارنده های آلی، به منظور تشخیص انتروویروس ها با روش RT-PCR مستقیم ارزیابی شد (۱۸). هدف از این پژوهش، مقایسه دو روش

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 (۲۴).

(د) آنالیز آماری: آنالیز آماری نتایج بدست آمده با استفاده از نسخه دوازدهم نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای انجام گرفت و مرز معنی دار بودن نتایج $p = 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این پژوهش از آذرماه سال ۱۳۸۴ تا آبان ماه سال ۱۳۸۵، از ۶ تصفیه خانه قیطریه، زرگنده، صاحبقرانیه، اکباتان، شوش، 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. سپس نمونه ها با روش Two-Phase تغلیظ و به منظور تشخیص انتروویروس ها با استفاده از روش های کشت سلولی و RT-PCR-ICC مورد بررسی قرار گرفتند. در روش کشت سلولی از ۶۳ نمونه مورد بررسی در رده سلولی RD از ۲۸ نمونه (فراوانی ۴۴/۴۴٪) و با روش ICC-RT-PCR از ۳۶ نمونه (فراوانی ۵۷/۱۴٪) انتروویروس جداسازی شد. همچنین در رده سلولی HEp-2 در روش کشت سلولی از مجموع نمونه های مورد بررسی از ۱۴ نمونه (فراوانی ۲۲/۲۲٪) و با روش ICC-RT-PCR از ۲۹ نمونه (فراوانی ۴۶/۰۳٪) انتروویروس جداسازی گردید. اما در مجموع بدون در نظر گرفتن رده سلولی خاصی در روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه (فراوانی ۶۵/۰۷٪) و با روش کشت سلولی از ۳۳ نمونه (فراوانی ۵۲/۳۸٪) انتروویروس جداسازی شد. بیشترین میزان جداسازی انتروویروس با روش ICC-RT-PCR از سیستم تصفیه فاضلاب محلاتی و در روش کشت سلولی از سیستم تصفیه فاضلاب شوش انجام گرفت. (جداول ۱ و ۲ و نمودار ۱). انتروویروس های غیر قابل تیپ (NTEVs)، E11، E25، E13 به ترتیب بیشتر از انتروویروس های دیگر جداسازی شد. همچنین با روش کشت سلولی (۱۵/۸۷٪) و با روش ICC-RT-PCR (۹/۵۲٪) پولیویروس با استفاده از پرایمرهای Sabin جداسازی شد. از ویروس های پولیوی جداسازی شده با روش ICC-RT-PCR، ۱ مورد ویروس P1، ۱ مورد ویروس P2 و ۴ مورد ویروس P3 شناسایی گردید. به طور کلی در این پژوهش، میزان جداسازی انتروویروس ها در رده سلولی RD با روش ICC-RT-PCR

۸ ml آب مقطر دیونیزه)، بافر B [شامل: ۲۵ میکرولیتر بافر A، ۵ میکرولیتر dNTPs، ۵ میکرولیتر پرایمر Pan E.V (Reverse)، ۵ میکرولیتر پرایمر Pan E.V (Forward)، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه] و بافر C [شامل: ۱۳/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۰/۲ مولار، ۰/۷ میکرولیتر DTT ۱ مولار، ۶/۹ میکرولیتر بازدارنده RNase، ۳/۶ میکرولیتر ترانسکریپتاز معکوس AMV، ۱۳/۷ میکرولیتر DNA پلی مراز Taq، ۲۳۶/۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه] تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در مرحله بعد ۱۹ میکرولیتر بافر B حاوی پرایمر Pan E.V به همراه ۵ میکرولیتر مایع رویی کشت سلولی به تمامی ویال ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد دستگاه ترموسایکلر (Biometra) قرار داده شد. در مرحله بعد، 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 با شرایط زیر RT-PCR انجام شد:

(I) واکنش با آنزیم RT به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد و غیرفعال کردن آن در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه.

(II) واکنش PCR با پرایمرهای غیر دژنر Pan E.V در شرایط ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۵۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۷۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه (برای ۳۶ سیکل) و مرحله گسترش نهایی (extention) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد. همچنین نمونه های 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 به کلیه ویال ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در مرحله بعد پس از سرد کردن ویال ها 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:

(I) واکنش با آنزیم RT، به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد و غیرفعال کردن آن در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه.

(II) PCR با پرایمرهای دژنر Pan P.V در شرایط ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۴۲ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه (برای ۳۰ سیکل). سپس جهت افتراق بین تیپی شوش و واکنش از وحشی تمامی ویروس های پولیوی جداسازی شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Sabin مورد بررسی قرار

Cell Culture (Total)	Cell Culture (HEp-2)	Cell Culture (RD)	ICC-RT-PCR (Total)	ICC-RT-PCR (HEp-2)	ICC-RT-PCR (RD)	نواحی نمونه گیری
۳/۱۱	۰/۱۱	۳/۱۱	۶/۱۱	۴/۱۱	۵/۱۱	قیطریه
۳/۵	۲/۵	۲/۵	۴/۵	۲/۵	۴/۵	زرگنده
۳/۱۱	۲/۱۱	۲/۱۱	۷/۱۱	۴/۱۱	۶/۱۱	صاحبقرانیه
۷/۱۱	۲/۱۱	۶/۱۱	۷/۱۱	۷/۱۱	۵/۱۱	اکباتان
۹/۱۳	۵/۱۳	۹/۱۳	۸/۱۳	۷/۱۳	۷/۱۳	شوش
۸/۱۲	۳/۱۲	۶/۱۲	۹/۱۲	۵/۱۲	۹/۱۲	محلاتی
۳۳/۶۳	۱۴/۶۳	۲۸/۶۳	۴۱/۶۳	۲۹/۶۳	۳۶/۶۳	جمع

عدد سمت راست خط کسری (/) مربوط به تعداد کل نمونه ها و عدد سمت چپ مربوط به تعداد نمونه های مثبت است.

محیطی استفاده نمودند (۲۶).

در پژوهش انجام شده توسط این محققین با استفاده از روش ICC-RT-PCR و تلقیح ۱۰ PFU در ۴ فلاسک از ۵ فلاسک مورد بررسی و پس از ۱۰ ساعت در تماس فلاسک ها، نتایج مثبت PCR حاصل گردید. همچنین پس از ۲۰ و ۲۵ ساعت به ترتیب ۱ PFU و کمتر از ۱ PFU ویروس با استفاده از روش ICC-RT-PCR شناسایی گردید.

هدف از این پژوهش، ارزیابی حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص اختصاصی و سریع ویروس های سیتوپاتوزنیک و غیرسیتوپاتوزنیک در نمونه های فاضلاب و مقایسه آن با نتایج کشت سلولی بود. در این پژوهش، پس از تلقیح نمونه های تغلیظ شده فاضلاب با روش Two-Phase از دوره سلولی RD و HEP-2 استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان دهنده حساسیت بیشتر رده سلولی RD نسبت به HEP-2 می باشد. اما به دلیل جداسازی طیف متفاوتی از انتروویروس ها در هر کدام از این دوره سلولی، استفاده هم زمان از این دوره سلولی برای افزایش حساسیت روش ICC-RT-PCR پیشنهاد می شود. همچنین حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس ها با TCID50 کمتر از ۰/۰۱ ارزیابی شد که این مسأله می تواند نشان دهنده قابل قبول بودن و حساسیت قابل توجه این روش برای تشخیص انتروویروس های موجود در فاضلاب باشد. معیار موفقیت آمیز بودن پایش محیطی ویروس پولیو در مراحل آخر ریشه کنی فلج اطفال، تشخیص انتروویروس های غیر پولیویی در نمونه های فاضلاب است. مطابق بولتن ارائه شده توسط WHO در سال ۲۰۰۳ حداقل ۳۰٪ از نمونه های فاضلاب تغلیظ شده از یک

اختلاف معنی داری را در سطح ۰/۰۵ با روش کشت سلولی ($p = ۰/۰۱$) داشت. با استفاده از نرم افزار SPSS12 و با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس آزمون مربع کای مشخص شد که میزان جداسازی در روش ICC-RT-PCR در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی داری را با روش کشت سلولی نشان می دهد ($p = ۰/۰۰۴$) (جدول ۲).

بحث

روش استاندارد کشت سلولی برای تشخیص ویروس های بیماری زای انسانی پر هزینه و زمان بر است و برای تایید نتایج مثبت به یک ماه زمان نیاز دارد. علاوه بر این به واسطه وجود بازدارنده های آلی و غیر آلی موجود در نمونه های محیطی امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب در کشت سلولی نیز وجود دارد. روش RT-PCR مستقیم به دلیل حجم کم واکنش و بازدارنده های طبیعی موجود در نمونه های تغلیظ شده فاضلاب، حساسیت لازم را برای جداسازی ویروس های روده ای ندارد. از طرفی با این روش، افتراق بین ویروس های عفونی و غیر عفونی امکان پذیر نیست. Margolin و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Wyn-Jones و همکاران در سال ۲۰۰۱، سه روش ICC-RT-PCR، کشت سلولی و RT-PCR را برای تشخیص انتروویروس ها، هپاتیت A و روتاویروس ها، نمونه های آب و فاضلاب را با هم مقایسه و پس از ۵ تا ۷ روز گرمخانه گذاری بهترین روش جداسازی انتروویروس ها را روش ICC-RT-PCR تعیین نمودند (۲۵). Reynolds و همکاران در سال ۲۰۰۱ از روش ICC-RT-PCR برای تشخیص انتروویروس ها و ویروس هپاتیت A در نمونه های

جدول ۲: مقایسه دوروش کشت سلولی ICC-RT-PCR در دوره سلولی HEP-2 و RD								
جمع کل		HEP-2		RD		رده سلولی		
ICC-RT-PCR	Cell Culture	ICC-RT-PCR	Cell Culture	ICC-RT-PCR	Cell Culture	روش مورد بررسی		
تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	نوع ویروس		
۹/۵۲	۶	۱۵/۸۷	۱۰	۷/۹۳	۵	۱۴/۲۸	۹	<i>Poliovirus</i>
۶۵/۰۷	۴۱	۵۲/۳۸	۳۳	۵۷/۱۴	۳۶	۴۴/۴۴	۲۸	<i>Enteroviruses</i>

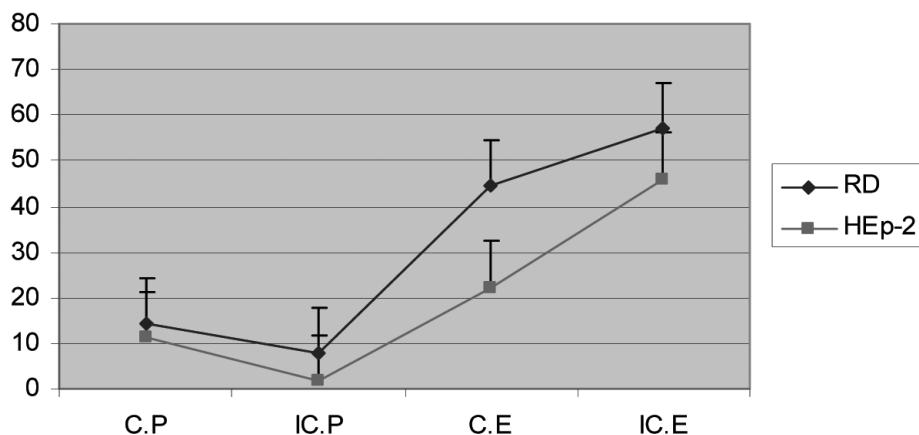
روش (۵۷/۱۴٪) ICC-RT-PCR جداسازی شد. این مساله نشان دهنده کیفیت مناسب نمونه گیری و کارایی هر دو روش تشخیص کشت سلولی و ICC-RT-PCR برای جداسازی انتروویروس هایی می باشد. در پژوهش های بعدی، کاربرد همزمان رده های مختلف کشت سلولی مانند: A549، BGMK، CACO-2، VERO، L20B به منظور تشخیص انتروویروس های توسط روش RT-PCR و مقایسه آن با نتایج کشت سلولی و ارزیابی حساسیت روش ICC-RT-PCR برای تشخیص روتاویروس ها و آدنوویروس ها، انتروویروس ها در نمونه های فاضلاب پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری

به طور کلی روش پیشنهاد شده ICC-RT-PCR به دلیل حساسیت زیاد و کفایت لازم جهت حذف بازدارنده های آلی می تواند راه حل مناسبی جهت پایش محیطی و ارزیابی اپیدمیولوژیکی بیماری های انتروویروسی در کشور باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که تشخیص انتروویروس ها در فاضلاب توسط روش ICC-RT-PCR نیازی به مرحله استخراج ندارد و بدون

Grab Sample بایستی واجد انتروویروس های غیر پولیوی (N.P.E.V) باشد (۲۷).

در این پژوهش از کل نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Pan E.V در روش ICC-RT-PCR از ۴۱ نمونه انتروویروس جداسازی گردید و پس از ارزیابی با پرایمرهای Pan PV از ۶ نمونه ویروس پولیو جداسازی شد. در انتها، با پرایمرهای اختصاصی Sabin مشخص شد که همگی ویروس های پولیوی جدا شده مربوط به سویه واکسن می باشند. این مساله نیز می تواند تایید دیگری بر ریشه کنی ویروس پولیوی وحشی و پوشش مناسب ایمنی در این منطقه باشد. پس به طور کلی روش پیشنهاد شده ICC-RT-PCR به دلیل حساسیت زیاد و کفایت لازم جهت حذف بازدارنده های آلی می تواند راه حل مناسبی جهت پایش محیطی و ارزیابی اپیدمیولوژیکی بیماری های انتروویروس باشد. در این پژوهش با توجه به کیفیت و دقت بالاتر، از روش نمونه گیری Grab sample استفاده شده و از ۶۳ نمونه فاضلاب مورد بررسی، ۲۸ انتروویروس با روش کشت سلولی (۴۴/۴۴٪) و ۳۶ انتروویروس غیرپولیوی با استفاده از



نمودار ۱) مقایسه ICC-RT-PCR و کشت سلولی در رده های سلولی RD و HEP-2 و IC.P=ICC-RT-PCR (Poliovirus)، C.P=Cell Culture (Poliovirus)

IC.E=ICC-RT-PCR (Enterovirus)، C.E=Cell Culture (Enterovirus)

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی برای پشتیبانی مالی در اجرای این طرح پژوهشی کمال امتنان را دارد.

تقبل هزینه و مشکلات ناشی از استخراج، امکان تکثیر ژنوم آنترروویروس های موجود در فاضلاب با تکنیک PCR وجود خواهد داشت.

References

1. Pallansch, M. and Roos, R.-P, Enteroviruses; Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In Fields. B.N et al (ed.), Fields virology, 4th ed, Lippincott Raven., New Yourk, 2001; PP: 723-776.
2. Muir, P., Kammerer, U., Korn, K., et al, Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. Clinical Microbiology reviews, 1998; 11, PP: 202-227.
3. Warden, P.-S., Ballester, N.-A., Moore, A.-E., et al, Detection of Enteric viruses in Archived ICR sample concentrates using and integrated cell culture-Nested PCR Technique. Research and Development. Drinking water, 1999; PP: 1-4.
4. Federal - Provincial - Territorial committee on Drinking water, Virological Quality of Drinking water. Draft drinking water Guidelines for viruses, 2003; PP: 1-24.
5. Touganidou, D. and Botzenhart, K, Molecular techniques for the detection of Enteroviruses in water. OECD workshop Molecular methods for safe drinking water, 1998; PP: 1-4.
6. Abbaszadegan, M., Stewart, P. and Lechevallier, M, A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl. Environ. Microbiol, 1999; 65, PP: 444-449.
7. Abbaszadegan, M, Advanced Detection of viruses and protozoan parasites in water. Reviews in Biology and Biotechnology, 2001; 1, PP: 21-26.
8. Chomczynski, P. and Sacchi, N, Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate - phenol - chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987; 162, PP: 156-159.
9. Abbaszadegan, M., Huber, M.-S., Gerba, C.-P., et al, Detection of Enteroviruses in groundwater with the Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ. Microbiol, 1993; 59, PP: 1318-1324.
10. Berger, M, Movement toward making the Ground water (Disinfection) Rule a reality, OECD, 1997; PP: 1-8.
11. Bosh, A, Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Internal Microbial 1998; 1, PP: 191-196.
12. Reynolds, K.-A., Gerba, C.-P. and Pepper, I.-L, Detection of Infectious Enteroviruses by an integrated cell culture -PCR procedure. Appl. Environ. Microbiol, 1996; 62, PP: 1424-1427.
13. Chapron, C.-D., Ballester, N.-A., Fontaine, J.-H., et al, Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenovirus Type 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture - Nested PCR procedure. Appl. Environ. Microbiol, 2000; 66, PP: 2520-2525.
14. Ballester, N.-A., Rex, A.-C. and Coughlin, K.-A., Study of anthropogenic viruses in Boston Harbar, Charles river, cottage form CSO Treatment facility and deer island treatment plant 1995-2003. MWRA virus Report, 2004; PP: 15-57.
۱۵. کارگر، محمد، خدایی، سید حامد، رضوی، سعیده السادات و همکاران، پایش محیطی ویروس پولیو در استان سیستان و بلوچستان و شناسایی ویروس های جدا شده در کشت سلولی با روش های میکرونوترالیزاسیون و افتراق بین تیبی توسط روش های الیزا و پروب هیبریدیزاسیون. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران. دوره ۱، شماره ۲، پی در پی ۴۰، تابستان ۱۳۸۴، صفحات ۵۱-۵۸.
۱۶. کارگر، محمد، رضوی، سعیده السادات، خدایی، سید حامد و همکاران، ارزیابی چرخش محیطی آنترروویروس های غیرپولیویی در فاضلاب و آب های سطحی استان سیستان و بلوچستان در رده های کشت سلولی RD و Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase. مجله بیماری های عفونی و گرمسیری، سال دهم، شماره ۳۰، ۱۳۸۴، صفحات ۳۳ تا ۴۰.
۱۷. کارگر، محمد، ساریجلو، محبوبه، طباطبائی، حمیده و همکاران، چرخش محیطی آنترروویروس های غیرپولیویی در فاضلاب های شهر تهران در رده های کشت سلولی RD و Hep-2 به صورت مستقیم و با استفاده از دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی. سال سوم، شماره ۲، ۱۳۸۳، صفحات ۳۷ تا ۴۸.
۱۸. کارگر، محمد، صادقی پور، سارا، طباطبائی، حمیده و همکاران، ارزیابی روش های مختلف حذف بازدارنده های آلی جهت راه اندازی یک روش حساس به منظور پایش مستقیم بیماری های عفونی آنترروویروسی در نمونه های فاضلاب. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، دوره ۱۶، شماره ۲، پی در پی ۴۴، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۶۹ تا ۷۷.
۱۹. کارگر، محمد، طباطبائی، حمیده، ساریجلو، محبوبه، صادقی پور، سارا و همکاران، پایش محیطی ویروس پولیو در فاضلاب های شهر

- تهران و شناسایی ویروس جدا شده در کشت سلولی با روش میکرونوترالیزاسیون و افتراق بین تیپی توسط روش های الیزا و پروب هیبریدیزاسیون، مجله پژوهشی حکیم، دوره ۱۰، شماره ۲، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۴۳ تا ۴۹.
۲۰. کارگر. محمد، خدایی. سید حامد، رضوی. سعیده السادات و همکاران، پایش ویروس پولیو و انتروویروس های غیر پولیوی از نمونه های فاضلاب و آب های سطحی استان فارس. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نهم، شماره، یک، ۱۳۸۴، صفحات ۱۵۹-۱۶۶.
21. Hovi, T., Stenvik, M. and Partanen, M, Poliovirus Surveillance by examining sewage specimens. Quantitative recovery of virus after introduction into sewage at remove upstream location. *Epidemiology and Infection*, 2001; 127, PP: 101-106.
 22. World Health Organization, Polio Laboratory Manual, under revision; available on the Internet at <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/poliomanual%20Version1-May01.pdf>. (2001).
 23. C.D.C, Poliovirus Diagnostic PCR, Kuwait Polio ITD Workshop. EVS/ CDC 11/02, 1999; PP: 1-13.
 24. Kilpatric, D.-R., Nottay, B., Yang, C.-F., Yang, S.-J., et al, Group_Specific Identification Of Poliovirus by PCR using primers containing mixed Base or Deoxyinosine Residues at positions of codone Degeneracy. *J of Clinical Microbiol*, 1996; 34, PP: 2990-2996.
 25. Wyn-Jones, A.-P. and Sellwood, J, Enteric viruses in aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol*, 2001; 91, PP: 945-962.
 26. Reynolds, K.-A., Gerba, C. - P., Abbaszadegan, M., et al, ICC-PCR detection of Enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can. J. Microbiol*, 2001; 47, PP: 153-157.
 27. World Health Organization, Guidelines for environmental surveillance of polioviruse circulation, under revision; available on the Internet at http://www.who.int/vaccines-documents/WHO/V&B_03.03,2003.



www.jmw.ir



A Comparative study of ICC-RT-PCR and Cell Culture methods for detection of Enteroviruses in Sewage

Kargar M.^{1*}, Sadeghipour S¹, Tabatabaee H², Nategh R²

¹Department of Microbiology, Jahrom Azad University, Jahrom, Iran.

²Department of Virology, School of Public Health Tehran University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and objectives: Enteroviruses are one of the most important enteric viruses which produce a broad range of human diseases. But being time consuming and also the necessity to perform confirmed tests for Enteroviruses detection, using molecular direct methods have been recently considered. The aim of this research is evaluation of ICC-RT-PCR and cell culture methods for detection of enteroviruses in sewage system.

Materials and methods: In this research 63 specimens were provided through Grab sample method which concentrated by pellet & Two-phase method and cultured in RD and HEp-2 cells respectively. All specimens, then, were inoculated using sensitive cell cultures of RD and HEp-2. After 24 hours incubation at 36°C by means of Pan E.V primers and afterwards Pan P.V Primers along with specific sabin primers, test of RT-PCR was carried out on the cell culture specimens.

Results: Out of all collected specimens, enteroviruses were isolated from 33 specimens (52.38%) and 41(65.01%) specimens which utilized cell-culture & ICC-RT-PCR methods respectively. Polioviruses were also isolated from 6 specimens.

Conclusion: Statistical analysis indicated that there is a significant relationship ($P= 0.05$) between cell culture and ICC-RT-PCR methods for isolating enteroviruses. Further the sensitivity of ICC-RT-PCR method to detect enteroviruses less than 0.01 TCID₅₀ was evaluated, which can indicate the acceptability and sensitivity of this method for detection of enteroviruses in sewages.

Keywords: Enteroviruses, Sewage, ICC-RT-PCR, Cell- Culture.