



## شناسایی ویروس پولیو و انتروویروس غیرپولیوی با انجام پایش محیطی و موارد مشکوک به فلج شل حاد در استان سیستان و بلوچستان

سعیده السادات رضوی<sup>۱</sup>، سید حامد خدائی<sup>\*</sup>، دکتر محمد کارگر<sup>۲</sup>، دکتر محبوبه ساری‌جلو<sup>۳</sup>، دکتر حمیده طباطبائی<sup>۳</sup>، دکتر رخشنده ناطق<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

<sup>۲</sup> استادیار میکروبیولوژی، دانشکده میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

<sup>۳</sup> استادیار ویروس شناسی، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> استاد ویروس شناسی، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

زمینه: در بعضی از کشورهای دنیا، با وجود عدم جداسازی ویروس پولیو وحشی از نمونه‌های کلینیکی، گردش خفته ویروس در سیستم فاضلاب گزارش شده است. از طرفی به توصیه سازمان بهداشت جهانی در مواردی که احتمال ورود ویروس وحشی از کشورهای انديك وجود دارد، پایش محیطی جهت تکمیل پایش موارد فلح شل حاد (پایش AFP) پیشنهاد می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به صورت همزمان پایش AFP و محیطی در استان سیستان و بلوچستان به منظور تایید ریشه کنی ویروس فلح اطفال انجام شد. جهت پایش موارد فلح شل حاد، ۲۱ نمونه مدفع از بیماران مشکوک به این بیماری در مدت یک سال جمع آوری و در رده‌های سلولی RD و Hep-2 Mord ارزیابی قرار گرفتند. جهت پایش محیطی، ۸۶ نمونه از سیستم‌های تصفیه فاضلاب شهری و بیمارستانی تهیه و به صورت مستقیم، و با استفاده از روش‌های تغليظ، تغليظ رسوبی (Pellet) و روش تغییر یافته Two-phase. وجود انتروویروس‌ها در رده‌های مذکور بررسی شد.

یافته‌ها: از ۹/۵۲ درصد نمونه‌های فاضلاب، انتروویروس غیرپولیوی و از ۲۰/۹۳ درصد ویروس پولیو واکسن جدا شد. همچنین ۹۳/۴۹ درصد نمونه‌های مدفع دارای ویروس پولیو واکسن و ۱۴/۲۸ درصد دارای انتروویروس غیرپولیوی بودند. از نمونه‌های مدفع ویروس پولیوی تیپ ۲ و از نمونه‌های فاضلاب ویروس پولیوی تیپ ۱ جداسازی نشد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش تأییدی بر صحت پایش محیطی ویروس پولیو و ریشه کنی ویروس فلح اطفال در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد.

واژگان کلیدی: فلح شل حاد، انتروویروس، ویروس پولیو، انتروویروس غیرپولیوی

دریافت مقاله: ۸۴/۵/۲۴ - پذیرش مقاله: ۸۵/۴/۱۲

\* اصفهان، پل بزرگمهر، ابتدای خیابان بزرگمهر، کوی گلبرگ، پلاک ۱۹، کد پستی ۸۱۵۸۸

## مقدمه

احتمال ورود ویروس وحشی از کشورهای اندمیک وجود دارد انجام پایش محیطی توصیه شده است (۸). اگر چه پایش موارد مشکوک به فلچ شل حاد برای یافت ویروس پولیو هنوز به عنوان یک روش استاندارد مطرح است، ولی پایش محیطی با استفاده از نمونه‌های فاضلاب نیز می‌تواند مکمل سودمندی در این زمینه باشد (۹). از مدفوع هر فرد آلدود ۱۰۹ ذره ویروسی در هر گرم دفع و به فاضلاب وارد می‌شود (۴). این ویروس‌ها قادرند در محیط با توجه به شرایط محیطی به مدت طولانی زنده بمانند (۱۰)، بنابراین اساس پایش محیطی بر پایه الگوی دفع ویروس در مدفوع فرد آلدود می‌باشد (۸). این نوع پایش می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد چرخش ویروس‌های روده‌ای، تعیین وسعت و مدت گردش ویروس در جمعیت (۸)، ارزیابی تأثیر واکسیناسیون (۱۱) و نمایش گردش ویروس پولیوی وحشی و مشتق از واکسن فراهم کند.

به دلیل مجاورت ایران با دو کشور افغانستان و پاکستان در مرزهای شرقی که دارای گردش ویروس پولیوی وحشی هستند (۱۲) و تردد غیر قانونی مهاجران افغانی همچنین وضعیت نامناسب بهداشتی استان سیستان و بلوچستان، این استان جزء مناطق پر خطر جهت ورود و انتشار ویروس پولیوی وحشی در کشور محسوب می‌شود. در اینچنین مواردی سازمان بهداشت جهانی علاوه بر پایش نمونه‌های مشکوک به AFP، پایش محیطی را با استفاده از نمونه‌های فاضلاب پیشنهاد می‌نماید (۱۳).

هدف از این پژوهش، پایش محیطی و پایش AFP بصورت همزمان در استان سیستان و بلوچستان جهت اطمینان از ریشه کنی ویروس فلچ اطفال بود. همچنین مقایسه‌ای بین الگوی دفع انتروویروس‌های پولیوی و

انتروویروس‌ها، ویروس‌های RNA دار کوچکی هستند که در خانواده پیکورناویریده قرار دارند. این گروه شامل: ویروس‌های پولیو، کوکساکی ویروس‌های گروه A و B، اکوویروس‌ها و انتروویروس‌های جدید می‌باشند (۱). انتقال این ویروس‌ها از مسیر مدفوعی- دهانی یا از مسیر تنفسی صورت می‌گیرد و انسان تنها میزبان شناخته شده آنها است (۲). عفونت‌های انتروویروسی در مناطق معتدل در تابستان و پاییز و در مناطق گرمسیری در تمامی فصول و بیشتر در میان نوزادان، کودکان و جوانان شایع است (۳ و ۴). ریسک ابتلا به عفونت به صورت مستقیم با فقر بهداشتی، تراکم جمعیت و سیستم تخلیه فاضلاب نامناسب به ویژه در جمعیت‌های دارای پوشش پایین واکسیناسیون در ارتباط می‌باشد (۵). انتروویروس‌ها می‌توانند بیماری‌های متعددی مانند: منژیت، عفونت‌های خونریزی دهنده حاد ملتجمه، بیماری‌های قلبی، تنفسی و گوارشی ایجاد نمایند. ورود انتروویروس به سیستم عصبی مرکزی ممکن است بصورت فلچ شل حاد AFP (Acute Flaccid Paralysis) یافتن افراد مبتلا به فلچ شل حاد و بررسی آزمایشگاهی نمونه‌های مدفوع این بیماران (پایش AFP)، استاندارد طلایی پایش برای ریشه کنی جهانی ویروس پولیو می‌باشد (۷). با پایش AFP، ویروس‌های پولیوی جدا شده را می‌توان با اشخاص خاصی مرتبط نمود و در نتیجه امکان انجام تحقیقات بر روی آن افراد و جمعیت پرخطر در تماس با آنها فراهم می‌گردد (۸).

از طرفی جداسازی ویروس پولیو با پایش محیطی، نشان دهنده آلدگی به ویروس در افراد نامشخصی از جمعیت AFP مورد بررسی است. در جوامع شهری که پایش انجام نمی‌شود یا مورد تردید است یا در جوامعی که

لوله‌ها برای استفاده در مراحل بعدی در دمای ۴ درجه نگهداری گردید.

روش Two-phase با استفاده از روش پیشنهادی هُوی (Hovi) و همکاران 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 اrlen ۱ لیتری ریخته و PEG ۶۰۰۰، ۳۰ درصد (از شرکت Merk) و ۲۰ درصد دکستران مربوط به باکتری Leuconostoc mesenteroides (D<sub>5376</sub>, sigma) و نمک طعام (از شرکت Merk) ۵ مولار به ترتیب به میزان ۱۳۳/۶ گرم (W/V)، ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی‌لیتر (V/V) به آن اضافه گردید. پس از تنظیم pH محلول در دامنه ۷ تا ۸ با سود روی شیکر (Horizontal shaker) با دور ۲۶۰ RPM قرار داده شد. سپس محتويات اrlen به داخل یک قيف جدا کننده (Separation funnel) ۴۰۰ میلی‌لیتری ریخته و یک شب (Overnight) در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. در مرحله بعد ۵ میلی‌لیتر از لایه رسوب انتهایی (bottom phase) و لایه تشکیل شده در بین دو فاز (Interphase) جمع‌آوری شد و به یکی از لوله‌های Pellet مرحله قبل اضافه گردید.<sup>(۸)</sup>

در مرحله آخر برای از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها به ۴ میلی‌لیتر از نمونه‌های مستقیم و تغليظ رسوبی و دو فازی فاضلاب یک میلی‌لیتر کلروفرم خالص (از شرکت Merk) اضافه شد. همچنین مقدار یک گرم از نمونه مدفوع در ۹ میلی‌لیتر از بافر فسفات سالین PBS حل کرده و یک میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰ RPM بر روی شیکر لوله قرار داده شد. سپس ۱۰ دقیقه محتويات لوله در دور ۲۰۰۰ RPM و دمای ۵ درجه سانتریفیوژ و مایع تیمار شده رویی در کرایوتیوب‌های استریل جمع‌آوری گردید.

غیر پولیویی و الگوی گردش آنها در فاضلاب صورت گرفت.

## مواد و روش کار

**الف- نمونه‌گیری:** با همکاری مرکز مدیریت بیماری‌های وزارت بهداشت و مسئولین مراکز بهداشت زاهدان، چابهار و زابل از فروردین تا اسفند سال ۱۳۸۳ از بیماران مشکوک به AFP در سراسر استان ۲۱ نمونه مدفوع جمع‌آوری شد. بطور همزمان ۸۶ نمونه فاضلاب از ۲ سیستم تصفیه فاضلاب، ۵ بیمارستان و روستاهای اطراف چابهار با روش grab sampling (Raw sewage) گردید. تمامی نمونه‌ها مربوط به فاضلاب خام (Influent) بودند و از قسمت ورودی فاضلاب (Influent) جمع‌آوری شدند. حجم تمامی نمونه‌های فاضلاب یک لیتر و حداقل میزان نمونه مدفوع ۱۰ گرم بود که توسط ظروف پلاستیکی در پوش دار به آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز کشوری فلج اطفال (NPL) واقع در انتیتو تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردید. در تمامی موارد مشخصات نمونه‌ها 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 تغليظ رسوبی (Pellet) و روش تغییر یافته (Two-phase) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ظرف محتوى نمونه برای چند ساعت به صورت ثابت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع رویی به یک اrlen استریل انتقال یافت. برای تغليظ با روش Pellet، از باقیمانده فاضلاب ۷۵ میلی‌لیتر به ۵ لوله پلاستیکی استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و در دمای ۵ درجه و دور ۵۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس

در مورد اکوویروس‌ها، هر مجموعه آنتی‌سرمی (pooled) شامل چندین آنتی‌بادی علیه انترالیزاسیون‌های مختلف است و معمولاً نوترالیزاسیون با دو آنتی‌سرم A تا G صورت می‌گیرد. نوع ویروس هم با استفاده از جدول راهنمای سازمان بهداشت جهانی تعیین گردید. اگر نمونه انترالیزاسیون احتمالی با هیچکدام از آنتی‌سرم‌ها خشی نشود، نشان دهنده وجود مخلوطی از چند ویروس و یا وجود انترالیزاسیون غیر قابل تیپ (NTEV) با آنتی‌سرم‌های موجود در کیت است.

همچنین برای ویروس‌های پولیوی جدا شده از آنتی‌سرم PII (PP) و آنتی‌سرم‌های مخلوط PI و PII و PIII و PI استفاده شد (۸).

**هـ- تست الیزا:** کیت اختصاصی الیزا ای پولیو (RIVM) در کشور هلند تهیه شده و توسط سازمان بهداشت جهانی در اختیار آزمایشگاه‌های فلچ اطفال قرار می‌گیرد. در این تست چاهک‌های میکرو پلیت که توسط IgG گاوی ضد پولیو ویروس‌های تیپ ۱، ۲ و ۳ پوشیده شده با سوش معین پولیو مجاور می‌شوند. سپس انکوباسیون با آنتی‌سرم‌های خرگوشی جذب متقاطع شده اختصاصی تیپ (cross-absorbed) ادامه می‌یابد. پس از شستشوی آنتی‌سرم‌های خرگوشی متصل نشده، HRP ضد خرگوشی نشان‌دار شده با پرواکسیداز (A-horseradish peroxidase) اضافه می‌شود تا آنتی‌سرم‌های خرگوشی را شناسایی نماید. در چاهک A آنتی‌بادی خرگوشی ضد پولیو ویروس توتال (که هم با ویروس واکسن و هم با ویروس وحشی واکنش می‌دهند)، در چاهک B آنتی‌بادی ضد پولیوی وحشی و در چاهک C آنتی‌بادی ضد پولیوی واکسن ریخته می‌شود. از چاهک‌های B و C هر کدام که جذب نوری (Optical density) دو برابر و نیم دیگری را داشته باشند، نشان دهنده سوش ویروس مورد نظر است (۱۴).

**ج- کشت سلولی:** از رده‌های سلولی RD، L<sub>20</sub>B و Hep-2 برای جداسازی ویروس پولیو و انترالیزاسیون‌های غیرپولیوی استفاده شد. حساسیت رده‌های سلولی به وسیله انترالیزاسیون‌های موجود در آزمایشگاه تعیین گردید. برای هر یک از ۳ تیمار یک نمونه فاصلاب و نمونه مدفعه ۶ لوله کشت سلولی L<sub>20</sub>B، RD و Hep-2 در نظر گرفته شد. میزان تلقيق نمونه به هر لوله کشت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر بود و پس از تلقيق در دمای ۳۶ درجه به مدت ۷ روز نگهداری گردید. برای مشاهده CPE (Cytopathic effect) هر روز لوله‌ها 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 (Freeze & Thawing) پس از گرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) پاساژ مجدد داده شد.

برای مواردی که نمونه روی RD مثبت شده ولی روی L<sub>20</sub>B منفی شده بود، پاساژ RD به L<sub>20</sub>B صورت گرفت.

**د- تست نوترالیزاسیون:** پس از تعیین نتایج کشت سلولی برای نمونه‌های مثبت تست نوترالیزاسیون اختصاصی با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تهیه شده در حیوانات بر علیه سروتیپ‌های مختلف انترالیزاسیونی انجام شد.

برای انجام این تست از پلیت‌های میکروتیتر (میکرو پلیت) استفاده شد. برای هر انترالیزاسیون جدا شده از آنتی‌سرم PII (PP) pooled polio ویروس‌های کوکساکی A (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی‌سرمی مربوط به کوکساکی ویروس A9 و ۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نام‌های A تا G استفاده شد. نوترالیزاسیون ویروس با آنتی‌سرم PP نشان دهنده وجود پولیو و خشی شدن با آنتی‌سرم CP تأیید کننده وجود ویروس کوکساکی B می‌باشد.

گردیدند. سپس برای تعیین سروتیپ‌های مختلف انتروویروس‌های غیرپولیوی و ویروس‌های پولیو، تست میکرونوترا لیزاسیون اختصاصی انجام شد. در مرحله NSL بعد جهت افتراق بین تیپ‌های وحشی (Sabin Like) و واکسن SL (Non Sabin Like) ویروس پولیو، از تست‌های آنتی ژنیک الیزا و ژنومیک پرروب هیبریدیزاسیون استفاده گردید.

از مجموع ۲۱ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از بیماران مشکوک به AFP، تعداد ۵ (۲۳/۸۱ درصد) نمونه دارای انتروویروس بودند. از این تعداد، از ۲ (۹/۵۲ درصد) نمونه ویروس پولیو و از ۳ (۱۴/۲۹ درصد) نمونه انتروویروس غیرپولیوی جداسازی شد. همچنین از ۸۶ نمونه فاضلاب جمع‌آوری شده، از ۴۹ نمونه (۵۶/۹۸ درصد) انتروویروس و از ۴۶ (۵۳/۴۹ درصد) و ۱۸ (۲۰/۹۳ درصد) نمونه به ترتیب انتروویروس‌های غیرپولیوی و ویروس پولیو جداسازی گردید (جدول ۱). با انجام تست‌های افتراق بین تیپی مشخص گردید که تمام ویروس‌های پولیوی جدا شده از نمونه‌های مدفوع و فاضلاب، مربوط به تیپ واکسن SL می‌باشند.

بیشترین فراوانی جداسازی ویروس‌های پولیو و انتروویروس‌های غیرپولیوی از فاضلاب مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان به ترتیب با فراوانی ۹/۵۹ درصد (۷ ویروس) و ۱۹/۱۸ (۱۴ ویروس) بود. همچنین از ۱۷/۸۱ درصد از نمونه‌ها ویروس پولیوی تیپ ۲ و از ۶/۸۵ درصد ویروس پولیوی تیپ ۳ جداسازی شد. بیشترین فراوانی انتروویروس‌های غیرپولیوی جدا شده از فاضلاب نیز مربوط به E4، Cox-B، E11، NTEV به ترتیب با فراوانی ۱۵/۰۷ درصد، ۱۲/۳۳ درصد، ۱۰/۹۶ درصد و ۹/۵۹ درصد بود. همچنین از نمونه‌های مدفوع، ویروس پولیو تیپ ۱ و ۳ هر کدام به میزان ۴/۷۶ درصد جداسازی شد و ۹/۵۲ درصد از نمونه‌های مدفوع دارای NTEV و ۴/۷۶ درصد حاوی

و- تست پرروب هیبریدیزاسیون: در این تست از اختلافات موجود در ژنوم ویروس واکسن و وحشی استفاده می‌شود. پرروب مناسب که برای قسمت VP1/2A ویروس واکسن ساخته و نشان‌دار شده، برای افتراق بین ویروس واکسن از وحشی به کار می‌رود. همچنین از پرروب دیگری که برای ناحیه غیر قابل ترجمه ۵ ژنوم (5NTR) ساخته شده و در تمامی انتروویروس‌ها حفاظت شده است نیز به عنوان شاهد استفاده می‌شود. برای انجام تست پرروب هیبریدیزاسیون، باید تیتر بالایی از ویروس پولیو (که تیپ آن معلوم شده است) وجود داشته باشد. در این روش RNA ویروس استخراج و بر روی فیلتر قرار داده می‌شود. سپس پروب‌های نشان‌دار شده با باند نشده طی مراحل شستشو، خارج و پروب‌های باند شده توسط واکنش آنزیم-سویسترا شناسایی می‌گردد. واکنش مثبت به صورت مشاهده لکه خاکستری مشخص می‌شود (۱۴).

آنالیز آماری نتایج بدست آمده با نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ انجام شد (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

## یافته‌ها

از فروردین تا اسفند ماه سال ۱۳۸۳، ۲۱ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به AFP و ۸۶ نمونه از فاضلاب دو سیستم تصفیه فاضلاب زابل و جام جم زاهدان، ۵ بیمارستان: امیرالمؤمنین زابل، تامین اجتماعی، خاتم الانبیاء و علی بن ایطالب زاهدان و بیمارستان بزرگ چابهار و آبهای سطحی تعدادی از روستاهای چابهار با روش Grab Sample تهیه گردید. فراوانی توزیع نمونه برداری (فاضلاب) از واحدهای مورد پژوهش تقریباً یکسان بود و به طور متوسط در هر فصل ۲۱ نمونه فاضلاب جمع‌آوری و ویروس‌ها به صورت مستقیم و با دو روش تغليظ در رده‌های سلولی RD، L20B و Hep-2 جداسازی

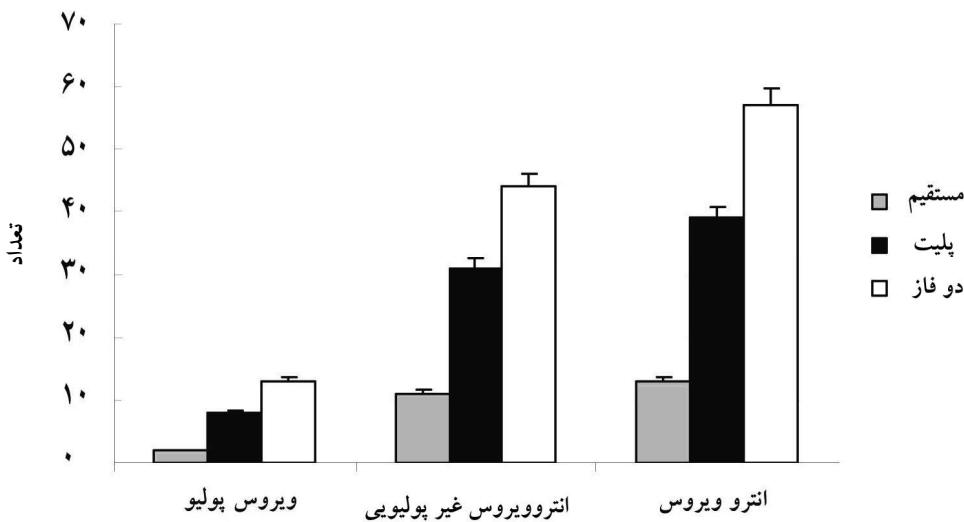
بین روش مستقیم و دو روش تغییظ Pellet و Two-phase در جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیوی از نمونه فاضلاب معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ) نمودار ۱.

E14 بود. پس از انجام آزمون آنالیز واریانس آنوا و سپس Post Hoc مشخص گردید که بین جداسازی ویروس پولیو با روش مستقیم و Two-phase از فاضلاب اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). همچنین

جدول ۱: مقایسه توزیع فراوانی مطلق و نسبی (درصد) ویروس‌های جدا شده از نمونه‌های فاضلاب و مدفوع در استان سیستان و بلوچستان

	مدفعع			فاضلاب			نمونه مثبت	نمونه منفی	جمع
	ویروس پولیو	انتروویروس غیرپولیوی	انتروویروس	ویروس پولیو	انتروویروس غیرپولیوی	انتروویروس			
(۲۳/۸۱) ۵	(۱۶/۲۹) ۳	(۹/۵۲) ۲	(۵۶/۹۸) ۴۹	(۵۳/۹۹) ۴۶	*	(۲۰/۹۳) ۱۸			
(۷۶/۱۹) ۱۶	(۸۵/۷۱) ۱۸	(۹۰/۴۸) ۱۹	(۴۳/۰۲) ۳۷	(۴۶/۵۱) ۴۰		(۷۹/۰۷) ۶۸			
(۱۰۰) ۲۱	(۱۰۰) ۲۱	(۱۰۰) ۲۱	(۱۰۰) ۸۶	(۱۰۰) ۸۶		(۱۰۰) ۸۶			

\* اعداد به صورت (درصد) تعداد هستند.



نمودار ۱: فراوانی مطلق ویروس‌های پولیو و انتروویروس غیرپولیوی جدا شده با سه روش مختلف

برای انجام ریشه کنی، کشورهای مختلف چهار استراتژی پوشش ایمن سازی جاری گستردۀ، اعلام روزهای ملی ایمن سازی، پایش و لکه‌گیری را در قالب دو فعالیت اصلی ایمن سازی گستردۀ و پایش و ردیابی ویروس‌های پولیو مورد توجه قرار دادند (۱۶). علی‌رغم عدم موفقیت این سازمان در ریشه کنی این ویروس تا کنون، با اجرای این استراتژی‌ها، تعداد کشورهای اندمیک از ۱۲۵ کشور

## بحث

ویروس پولیو در سال ۱۹۸۸ با ایجاد پولیومیلیت فلچ دهنه در ۱۲۵ کشور جهان سالانه بیش از ۳۵۰۰۰۰ می‌گرفت. به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی با تأسیس شبکه‌ای از آزمایشگاه‌های تخصصی در سراسر دنیا برنامه‌ای را به منظور ریشه کنی ویروس پولیو تا سال ۲۰۰۰ آغاز نمود (۱۳ و ۱۵).

می توانند مؤید یکدیگر در مراحل مختلف ریشه کنی باشند (۲۰).

سلول‌های L20B، سلول‌های موشی هستند که ژن رسبتور انسانی برای ویروس پولیو را بیان می‌کنند (۲۱). از سال ۱۹۹۸ سلول‌های L20B جایگزین رده سلولی Hep-2 گردید و استفاده همزمان این رده سلولی به همراه RD در تمامی شبکه آزمایشگاه‌های سازمان بهداشت جهانی برای جداسازی ویروس پولیو متداول شده است. اما استفاده از رده‌های سلولی L20B و RD بدون Hep-2 به میزان جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیوی به خصوص در دوره‌هایی که کوکساتکی ویروس‌های گروه B در جامعه چرخش دارند ضربه شدیدی وارد می‌کند (۲۲). به همین دلیل در این پژوهش ما از هر سه رده سلولی استفاده کردیم.

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که بهترین رده برای جداسازی ویروس پولیو دودمان سلولی L20B و بهترین رده برای جداسازی اکوویروس‌ها و کوکساتکی ویروس‌های گروه B به ترتیب دودمان‌های سلولی RD و Hep-2 است.

پویری (Poiry) و همکاران در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که ویروس پولیوی تیپ ۱ تنها در دوره واکسیناسیون همگانی از فاضلاب قابل جداسازی است، در حالی که تیپ ۲ و ۳ این ویروس حتی ۲ تا ۳ ماه پس از واکسیناسیون هم قابل جداسازی می‌باشد (۲۳). این مساله می‌تواند توجیهی برای عدم جداسازی ویروس پولیوی تیپ ۱ در این پژوهش باشد.

مطابق بولتن ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی در صورتی صحت پایش محیطی مطلوب در نظر گرفته می‌شود که از حداقل ۳۰ درصد نمونه‌های فاضلاب جمع‌آوری شده با روش Grab انتروویروس غیرپولیوی جداسازی گردد (۸). در این پژوهش با هر دو روش تغییض بیش از این میزان انتروویروس غیرپولیوی

در شروع طرح به ۶ کشور در سال ۲۰۰۳ کاهش یافته است (۱۷). اما برخلاف انتظار در سال ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ به علت ورود ویروس پولیو از کشورهای اندمیک به کشورهای عاری از این ویروس تعداد کشورهای دارای گردش ویروس پولیوی وحشی به ۱۱ کشور افزایش یافت. این مساله نشان دهنده اهمیت ورود ویروس پولیوی وحشی از کشورهای اندمیک به کشورهای مجاور آنها می‌باشد.

از طرفی کشورهای افغانستان و پاکستان به عنوان یک بلوک ایلامیولوژیک ویروس پولیو مطرح هستند (۱۸) و استان سیستان و بلوچستان به دلیل مجاورت با این کشورها همواره در خطر ورود ویروس پولیوی وحشی قرار دارد. به همین دلیل در این پژوهش این استان به عنوان پرخطرترین استان کشور مورد بررسی قرار گرفت. پایش ویروس پولیوی وحشی در کشورهای مختلف از طریق گزارش موارد AFP و پایش محیطی صورت می‌گیرد (۱۹).

با استفاده از پایش AFP ویروس پولیوی وحشی به صورت موفقیت آمیزی از آمریکا در سال ۱۹۹۴ و از غرب اقیانوس آرام در سال ۲۰۰۰ ریشه کن شد (۷). همچنین در برخی کشورهای پیشرفتنه واقع در ناحیه اروپا که دارای سیستم‌های فاضلاب و آزمایشگاه‌های مناسب هستند، پایش محیطی انجام شده است و با این روش، ویروس پولیو از اروپا در سال ۲۰۰۲ ریشه کن شده است (۷).

در بعضی از کشورهای دنیا مانند اسرائیل با وجود عدم جداسازی ویروس پولیوی وحشی از نمونه‌های کلینیکی گردش خفته ویروس در نمونه‌های فاضلاب گزارش شده است (۱۱) و یا در مصر علی رغم جداسازی ویروس وحشی از نمونه‌های کلینیکی میزان جداسازی انتروویروس‌ها از نمونه‌های محیطی کاهش چشمگیری نشان داده بود. بنابراین پایش محیطی و پایش AFP

ایران وجود دارد. بنابراین علاوه بر ردیابی تمام موارد AFP، پایش محیطی برای ردیابی ویروس‌های وحشی یا (Vaccine-Derived Poliovirus) VDPV به مناطق غربی و جنوب غربی کشور پیشنهاد می‌گردد.

#### تشکر و قدردانی

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

جداسازی گردید که نشان دهنده دقیق عمل و صحبت پایش محیطی انجام شده در این پژوهش در راستای تأیید ریشه کنی ویروس پولیو می‌باشد.

همچنین در این پژوهش ویروس پولیوی وحشی و یا مشتق از واکسن جداسازی نشد. این مساله می‌تواند نشان دهنده سطح مناسب پوشش ایمن سازی در ایران به ویژه در منطقه پر خطر مورد بررسی همچنین تأیید دیگری بر پایش مناسب و حساس موارد AFP در کشور ما باشد. با در نظر گرفتن ورود ویروس وحشی از کشورهای آفریقایی به سه کشور عربستان، سودان و یمن از کشورهای عضو منطقه مدیترانه شرقی، امکان انتشار ویروس از این کشورها به کشورهای اطراف از جمله

#### References:

- CDC. Enteroviruses-Respiratory and Enteric Viruses Branch: Viral ("Aseptic") Meningitis. National Center of Infectious Diseases, 2005: 1-2. (at: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral\\_meningitis.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/viral_meningitis.htm)).
- World Health Organization. Enteroviruses-Non Polio. WHO Media Center, 2005: 1-3. (at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs174/en/>).
- Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 357-71.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 2001; 91:945-62.
- Public Health Laboratory Network. Polio laboratory case definition, 2000: 1-7. (at: [http://www.health.gov.au/internet/wcms/Publishing.nsf/Content/cda-phlncd-polio.htm/\\$FILE/polio.pdf](http://www.health.gov.au/internet/wcms/Publishing.nsf/Content/cda-phlncd-polio.htm/$FILE/polio.pdf)).
- Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation 2003: 1-24. (at: [http://www.health.gov.sk.ca/rr\\_water\\_sumofguidelines.pdf](http://www.health.gov.sk.ca/rr_water_sumofguidelines.pdf)).
- Melnick JL. Current status of poliovirus infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 293-300.
- World Health Organization. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. *Vaccines and Biologicals*. WHO; 2003: 1-19. (at: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737.pdf>).
- Mas Lago P, Gary HE Jr, Perez LS, et al. Poliovirus detection in wastewater and stools following an immunization campaign in Havana, Cuba. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 772-7.
- van der Avoort HG, Reimerink JH, Ras A, et al. Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 1995; 114: 481-91.
- Manor Y, Handsher R, Halmut T, et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1670-5.
- CDC. Wild Poliovirus Transmission in Bordering Areas of Iran, Iraq, Syria, and Turkey, 1997-June MMWR 1998; 47; 588-92. (at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/0054164.htm>).
- World Health Organization. Global Polio Eradication Initiative Strategic plan 2004-2008. Geneva, Switzerland, WHO Publication. 2003: 1-40. (at: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO\\_POLIO\\_04.02.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_POLIO_04.02.pdf)).
- World Health Organization. Polio Laboratory Manual. Department of Vaccines and

- Biologicals, Geneva, Switzerland, WHO Document Production Services, 2001; 1-133. (at: <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/WHO-Polio-Manual-9.pdf>).
15. Deshpande JM, Shetty SJ, Siddiqui ZA. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:2919-27.
  16. Harris BN, Durrheim DN, Ogunbanjo GA. Polio eradication--the validity of surveillance indicators. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 386-91.
  17. Blomqvist S, Savolainen C, Laine P, et al. Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. *Journal of virology* 2004; 78: 4876-83.
  18. World Health Organization. Outbreak News. WER, 2004; 79: 273-80. (at: <http://www.who.int/wer/2004/wer7930/en/index.html>).
  19. Patti AM, Santi AL, Fiore L, et al. Enterovirus surveillance of Italian healthy children. *Eur J Epidemiol* 2000; 16:1035-8.
  20. CDC. Progress towards poliomyelitis eradication-Egypt, 2003-2004. *MMWR* 2004; 53:820-2.
  21. World Health Organization. Eradication Progress Brings Greater Laboratory Challenges. Polio Lab Network 1998; 4: 1-4. (at: [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/44.pdf](http://www.who.int/immunization_monitoring/44.pdf)).
  22. Distribution of L20B cells is underway. Polio Lab Network Quarterly Update. (at: [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/Index1995to2004.pdf](http://www.who.int/immunization_monitoring/Index1995to2004.pdf))
  23. Poiry T, Stenvik M, Hovi T. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:371-4.