دوفصلنامه طبّ جنوب
مرکز پژوهش‌های سلامت خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نهم، شماره ۱، صفحه ۲۸ - ۲۰ (شهریور ۱۳۸۵)

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

سعیده السادات رضوی[۱]، سید حامد خدائی[*۱]، دکتر محمد کارگر[۲]، دکتر محبوبه ساریجلو[۳]، دکتر حمیده طباطبائی[۳]، دکتر رخشنده ناطق[۴]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
[۲] استادیار میکروبیولوژی، دانشکده میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
[۳] استادیار ویروس شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] استاد ویروس شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه: در بعضی از کشورهای دنیا، با وجود عدم جداسازی ویروس پولیوی 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 اندمیک وجود دارد، پایش محیطی جهت تکمیل پایش موارد فلج 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 فلج اطفال انجام شد. جهت پایش موارد فلج شل حاد، ۲۱ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به این بیماری در مدت یک سال جمع آوری و در رده‌های سلولی **L20B**، **RD** و **Hep-2** مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت پایش محیطی، ۸۶ نمونه از سیستم‌های تصفیه فاضلاب شـهری و بیمارستانی تهیه و به صورت مسـتقیم، و با استفاده از روش‌های تغلیظ، تغلیظ رسوبی (**Pellet**) و روش تغییر یافته **Two-phase**، وجود انتروویروس‌ها در رده‌های مذکور بررسی شد.

یافته‌ها: از ۵۳/۴۹ درصد نمونه‌های فاضلاب، انتروویروس غیرپولیویی و از ۲۰/۹۳ درصد ویروس پولیوی واکسن جدا شد. همچنین ۹/۵۲ درصد نمونه‌های مدفوع دارای ویروس پولیو واکسن و ۱۴/۲۸ درصد دارای انتروویروس غیرپولیویی بودند. از نمونه‌های مدفوع ویروس پولیوی تیپ ۲ و از نمونه‌های فاضلاب ویروس پولیوی تیپ ۱ جداسازی نشد.

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

واژگان کلیدی: فلج شل حاد، انتروویروس، ویروس پولیو، انتروویروس غیرپولیویی

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

* اصفهان، پل بزرگمهر، ابتدای خیابان بزرگمهر، کوی گلبرگ، پلاک ۱۹، کدپستی ۸۱۵۸۸

Email: shkhmic@yahoo.com

مقدمه

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: منتژیت، عفونت‌های خونریزی دهنده حاد ملتحمه، بیماری‌های قلبی، تنفسی و گوارشی ایجاد نمایند. ورود انتروویروس به سیستم عصبی مرکزی ممکن است بصورت فلج شل حاد AFP (Acute Flaccid Paralysis) تظاهر نماید (۶).

یافتن افراد مبتلا به فلج 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 آلودگی به ویروس در افراد نامشخصی از جمعیت مورد بررسی است. در جوامع شهری که پایش AFP انجام نمی‌شود یا مورد تردید است یا در جوامعی که احتمال ورود ویروس وحشی از کشورهای اندمیک وجود دارد انجام پایش محیطی توصیه شده است (۸).

اگر چه پایش موارد مشکوک به فلج 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 آلوده ۱۰۹ ذره ویروسی در هر گرم دفع و به فاضلاب وارد می‌شود (۶). 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 آلوده 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 فلج اطفال بود. همچنین مقایسه‌ای بین الگوی دفع انتروویروس‌های پولیویی و

غیر پولیویی و الگوی گردش آنها در فاضلاب صورت گرفت .

مواد و روش‌کار

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 تهیه گردید. تمامی نمونه‌ها مربوط به فاضلاب خام (Raw sewage) 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 درپوش‌دار به آزمایشگاه ویروس شناسی مرکز کشوری فلج اطفال (NPL) واقع در انستیتو 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 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 ۵۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس 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 ارلن ۱ لیتری ریخته و ۶۰۰۰ PEG، ۳۰ درصد (از شرکت Merk) و ۲۰ درصد دکستران مربوط به باکتری Leuconostoc mesenteroides با وزن مولکولی ۲۰۰۰۰۰۰ (sigma، D۵۳۷۶) و نمک طعام (از شرکت Merk) ۵ مولار به ترتیب به میزان ۱۳۳/۶گرم (W/V)، ۲۰ گرم (W/V) و ۱۶ میلی‌لیتر (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 (Horizontal shaker) با دور ۲۶۰ RPM قرار داده شد. سپس محتویات ارلن 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) جمع‌آوری شد و به یکی از لوله‌های Pellet مرحله قبل اضافه گردید (۸).

در مرحله آخر برای از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها به ۴ میلی‌لیتر از نمونه‌های مستقیم و تغلیظ 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 محتویات لوله در دور ۲۰۰۰ RPM و دمای ۵ درجه سانتریفیوژ و مایع تیمار شده رویی در کرایوتیوب‌های استریل جمع‌آوری گردید.

ج- کشت سلولی: از رده‌های سلولی L۲۰B، RD و Hep-2 برای جداسازی ویروس پولیو و انتروویروس‌های غیرپولیویی استفاده شد. حساسیت رده‌های سلولی به وسیله انترویروس‌های موجود در آزمایشگاه تعیین گردید. برای هر یک از ۳ تیمار یک نمونه فاضلاب و نمونه مدفوع ۶ لوله کشت سلولی L۲۰B ، RD و Hep-2 در نظر گرفته شد. میزان تلقیح نمونه 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 (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 دمـای ۲۰- درجه فریز و پس از گرم کردن در دمای اتاق (Freeze & Thawing) پاساژ مجدد داده شد.

برای مواردی که نمونه روی RD مثبت شده ولی روی L۲۰B منفی شده بود، پاساژ RD به L۲۰B 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 انترووویروسی انجام شد.

برای انجام این تست از پلیت‌های میکروتیتر (میکرو پلیت) استفاده شد. برای هر انترووویروس جدا شده از آنتی سرم pooled polio (PP)، آنتی‌سرم‌های کوکساکی ویروس‌های B1 تا B6 (CP) و هفت مجموعه مخلوط آنتی‌سرمی مربوط به کوکساکی ویروس A9 و۲۰ نوع اکوویروس مختلف با نام‌های A تا G استفاده شد.

نوترالیزاسیون ویروس با آنتی‌سرم PP، نشان دهنده ویروس پولیو و خنثی شدن با آنتی‌سرم CP تأیید کننده وجود ویروس کوکساکی B می‌باشد.

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

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

هـ- تست الیزا: کیت اختصاصی الیزای پولیو (RIVM) در کشور هلنـد تهیه شده و توسط سازمان بهداشت جهانی در اختیار آزمایشـگاه‌های فلج 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، IgG ضد خرگوشی نشان‌دار شده با پرواکسیداز HRP (A-horseradish perioxidase) 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 آنتی بادی 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).

و- تست پروب هیبریدیزاسیون: در این تست از اختلافات موجود در ژنوم ویروس واکسن و وحشی استفاده می‌شود. پروب مناسب که برای قسمت VP1/2A ویروس واکسن ساخته و نشان‌دار شده، برای افتراق بین ویروس واکسن از وحشی به کار می‌رود. همچنین از پروب دیگری که برای ناحیهٔ غیر قابل ترجمهٔ ´۵ ژنوم (5ŃTR) ساخته شده و در تمامی انتروویروس‌ها حفاظت شده است نیز به عنوان شاهد استفاده می‌شود. برای انجام تست پروب 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 Digoxigenin (DIG) به آن افزوده می‌شود. پروب‌های باند نشده طی مراحل شستشو، خارج و پروب‌های باند شده توسط واکنش آنزیم- سوبسترا شناسایی می‌گردد. واکنش مثبت به صورت مشاهدهٔ لکهٔ 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: 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. فراوانی توزیع نمونه برداری (فاضلاب) از واحدهای مورد پژوهش تقریبا یکسان بود و به طور متوسط در هر فصل ۲۱ نمونه فاضلاب جمع‌آوری و ویروس‌ها به صورت مستقیم و با دو روش تغلیظ در رده‌های سلولی L20B، RD و Hep-2 جداسازی گردیدند. سپس برای تعیین سروتیپ‌های مختلف انتروویروس‌های غیرپولیویی و ویروس‌های پولیو، تست میکرونوترالیزاسیون اختصاصی انجام شد. در مرحله بعد جهت افتراق بین تیپ‌های وحشی NSL (Non Sabin Like) و واکسن SL (Sabin Like) ویروس پولیو، از تست‌های آنتی ژنیک الیزا و ژنومیک پروب 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 غیرپولیویی جداسازی شد. همچنین از ۸۶ نمونه فاضلاب جمع آوری شده، از ۴۹ نمونه (۵۶/۹۸ درصد) انتروویروس و از ۴۶ (۵۳/۴۹ درصد) و ۱۸ (۲۰/۹۳ درصد) نمونه به ترتیب انتروویروس‌های غیرپولیویی 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.

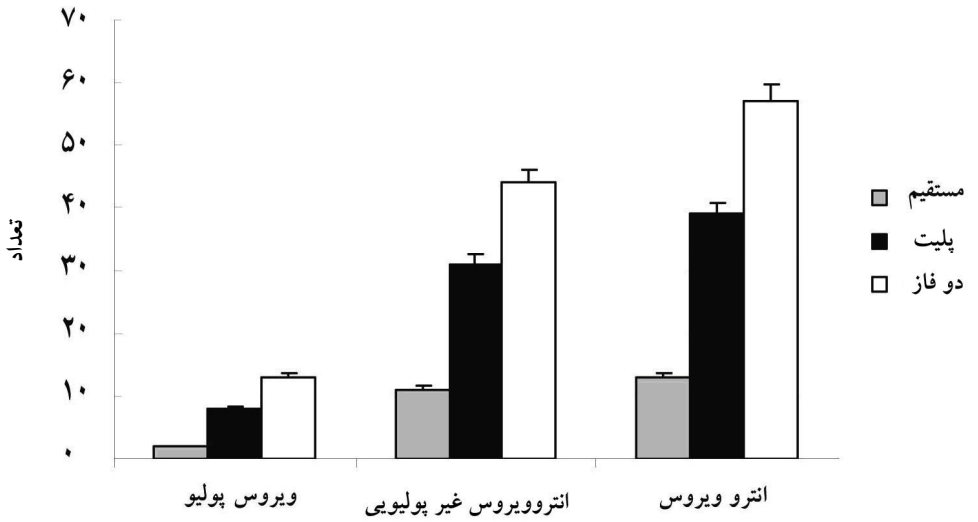
بیشترین فراوانی جداسازی ویروس‌های پولیو و انتروویروس‌های غیرپولیویی از فاضلاب مربوط به سیستم تصفیه فاضلاب جام جم زاهدان به ترتیب با فراوانی ۹/۵۹ درصد (۷ ویروس) و ۱۹/۱۸ درصد (۱۴ ویروس) بود. همچنین از ۱۷/۸۱ درصد از نمونه‌ها ویروس پولیوی تیپ ۲ و از ۶/۸۵ درصد ویروس پولیوی تیپ ۳ جداسازی شد. بیشترین فراوانی انتروویروس‌های غیرپولیویی 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

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<۰/۰۵). همچنین بین روش مستقیم و دو روش تغلیظ Pellet و Two-phase در جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی از نمونه فاضلاب معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵ ؛ نمودار ۱).

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

	فاضلاب			مدفوع		
	ویروس پولیو	انتروویروس غیرپولیویی	انتروویروس	ویروس پولیو	انتروویروس غیرپولیویی	انتروویروس
نمونه مثبت	۱۸ (۲۰/۹۳)*	۴۶ (۵۳/۴۹)	۴۹ (۵۶/۹۸)	۲ (۹/۵۲)	۳ (۱۴/۲۹)	۵ (۲۳/۸۱)
نمونه منفی	۶۸ (۷۹/۰۷)	۴۰ (۴۶/۵۱)	۳۷ (۴۳/۰۲)	۱۹ (۹۰/۴۸)	۱۸ (۸۵/۷۱)	۱۶ (۷۶/۱۹)
جمع	۸۶ (۱۰۰)	۸۶ (۱۰۰)	۸۶ (۱۰۰)	۲۱ (۱۰۰)	۲۱ (۱۰۰)	۲۱ (۱۰۰)

* اعداد به صورت (درصد) تعداد هستند.



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

بحث

ویروس پولیو در سال ۱۹۸۸ با ایجاد پولیومیلیت فلج دهنده در ۱۲۵ کشور جهان سالانه بیش از ۳۵۰۰۰۰ قربانی 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).

برای انجام ریشه کنی، کشورهای مختلف چهار استراتژی پوشش ایمن سازی جاری گسترده، اعلام روزهای ملی ایمن سازی، پایش و لکه‌گیری را در قالب دو فعالیت اصلی ایمن سازی گسترده و پایش و ردیابی ویروس های 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

در شروع طرح به ۶ کشور در سال ۲۰۰۳ کاهش یافته است (۱۷). امّا بر خلاف 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 اپیدمیولوژیک 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 پیشرفته 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 می‌توانند مؤید یکدیگر در مراحل مختلف ریشه کنی باشند (۲۰).

سلول‌های L20B، سلول‌های موشی هستند که ژن رسپتور سلول 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. امّا استفاده از رده‌های سلولی L20B و RD بدون Hep-2 به میزان جداسازی انتروویروس‌های غیرپولیویی به خصوص در دوره‌هایی که کوکساکی 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 کوکساکی ویروس‌های گروه B به ترتیب دودمان‌های سلولی RD و Hep-2 است.

پویری (Poyry) 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 غیرپولیویی جداسازی گردد (۸). در این پژوهش با هر دو روش تغلیظ بیش از این میزان انتروویروس غیرپولیویی

جداسازی گردید که نشان دهنده دقت عمل و صحت 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 ایران وجود دارد. بنابراین علاوه بر ردیابی تمام موارد AFP، پایش محیطی برای ردیابی ویروس‌های وحشی یا VDPV (Vaccine-Derived Poliovirus) وارد شده به مناطق غربی و جنوب غربی کشور پیشنهاد می‌گردد.

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 مرکز مدیریت بیماری‌های وزارت بهداشت و مسئولین محترم مراکز بهداشت زاهدان، زابل و چابهار نیز صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References:

1. 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).
2. World Health Organization. Enteroviruses-Non Polio. WHO Media Center, 2005: 1-3. (at: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs174/en/).
3. 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.
4. Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. J Appl Microbiol 2001; 91:945-62.
5. 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).
6. 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).
7. Melnick JL. Current status of poliovirus infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 293-300.
8. 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).
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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/00054164.htm).
13. 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).
14. 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).
22. Distribution of L20B cells is underway. Polio Lab Network Quarterly Update. (at: http://www.who.int/immunization_monitoring/Index1995to2004.pdf)
23. Poyry 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.