مجله سلامت و محیط زیست، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره دوازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۸، صفحات ۲۳۵ تا ۲۴۶

Available online: http://ijhe.tums.ac.ir
مقاله پژوهشی

پایش مولکولی فرایند حذف *آدنوویروس‌های* انسانی در تصفیه خانه آب اصفهان

پیمانه عطابخش[۱]، محمد کارگر[۱،*]، عباس دوستی[۲]
۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، جهرم، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۵
تاریخ ویرایش: ۹۸/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۲
تاریخ انتشار: ۹۸/۰۶/۱۳

واژگان کلیدی: *آدنوویروس‌های* انسانی، الایزا، ژنوتایپینگ

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
mkargar@jia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *آدنوویروس‌های* انسانی، یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های منتقل شونده از آب‌های آلوده هستند که به دلیل پایداری در برابر فرایندهای تصفیه، به‌عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های نوین کیفی آب‌ها معرفی شده‌اند. هدف از پژوهش، ارزیابی کفایت حذف *آدنوویروس‌های* انسانی در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان بود.

روش بررسی: نمونه گیری از ۵ بخش شامل: آب خام، ته نشینی، گندزدایی، فیلتراسیون و آب خروجی تصفیه خانه به مدت یک سال انجام شد. برای تغلیظ آب از فیلتر Electropositive Cartridge Virosorb 1MDS استفاده گردید. به منظور تشخیص آنتی ژن *آدنوویروس‌ها* از آزمون الایزا و برای شناسایی کمی و ژنوتایپینگ به ترتیب از Real-time PCR و PCR استفاده شد. همچنین میانگین غلظت شاخص‌های باکتریایی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه آب بررسی شده، *آدنوویروس‌ها* به‌ترتیب در ۱۲ نمونه (۲۰ درصد) با روش الایزا و ۱۶ نمونه (۲۶/۶۷ درصد) با روش مولکولی تشخیص داده شدند که بیشترین تعداد *آدنوویروس‌های* شناسایی شده به‌ترتیب ۷ نمونه (۱۲ درصد) در ورودی تصفیه خانه، ۶ نمونه (۱۰ درصد) بعد از ته نشینی و ۳ نمونه (۵ درصد) پس از ازن زنی تشخیص داده شد. بیشترین میزان جداسازی *آدنوویروس* در فصل پاییز (۵۰ درصد) و کمترین تعداد در فصل بهار (۱۲/۵درصد) بود. همچنین میانگین شاخص کلی فرم‌ها در ورودی تصفیه خانه بین 10^{3}-10^{2} CFU/mL تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که راندمان حذف *آدنوویروس* در واحدهای فیلتراسیون و گندزدایی تصفیه خانه بیشتر است و واحد فیلتراسیون تصفیه خانه به‌عنوان یک واحد موثر در حذف ویروس‌ها به شمار می رود.

Please cite this article as: Atabakhsh P, Kargar M, Doosti A. Molecular monitoring effectiveness of human adenovirus removal in Isfahan water treatment plant. Iranian Journal of Health and Environment. 2019;12(2):235-46.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

مقدمه

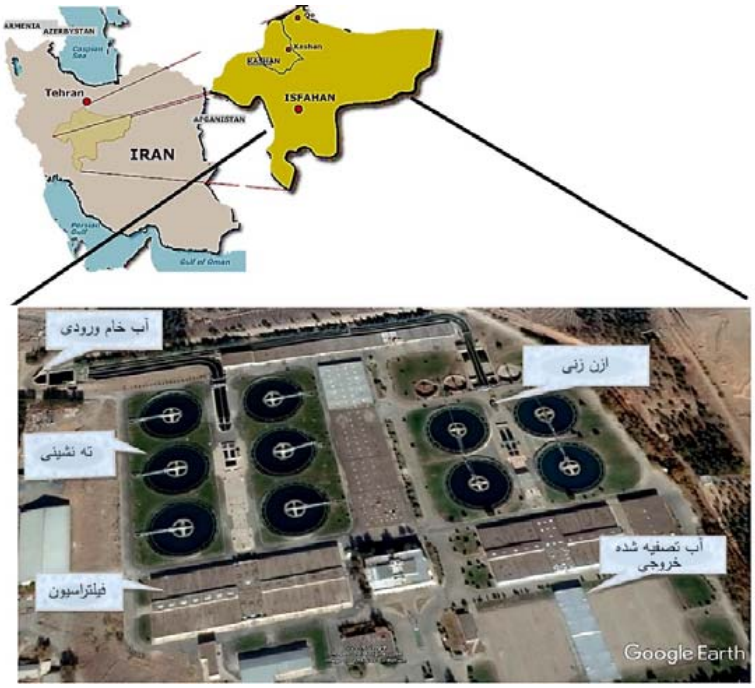
بـه منظور اطمینان از سـلامت و کیفیت آب شـرب، ارزیابی اثربخشـی فرایندهـای تصفیـه آب ضـروری اسـت. با وجود پیشـرفت‌های چشـمگیر انجام شـده در صنعت تصفیه آب و فاضلاب در کشـورهای توسـعه یافته، بیماری‌های ویروسـی زیادی در طول سـال از آب گزارش شده است. این بیماری‌ها شـامل گاسـتروانتریت، مننژیـت، آنسـفالیت و عفونت‌هـای تنفسی اسـت. ثابت شـده که تخلیه مداوم فاضلاب‌های خام (تصفیـه نشـده) و تصفیـه شـده، مهمترین منابـع آلودگی آب‌هـای محیطـی با ویروس‌های انسـانی هسـتند. از این‌رو، آب نقش مهمـی در ایجاد و انتقـال بیماری‌های عفونی دارد (۱، ۲). بـا وجود پیشـرفت‌هایی که در دهـه اخیر در تصفیه آب و فاضلاب انجام شـده، تعداد بیماری‌های گاسـتروانتریت حاد ناشـی از آب آلوده در سراسـر جهان نگران کننده اسـت (۳). عمومـا در روش های اسـتاندارد ارزیابی کیفیت میکربی آب شـاخص‌های باکتریایـی مانند: مجموع کلـی فرم‌ها، کلی فرم‌هـای مدفوعـی و انتروکوک‌ها اندازه گیری شـده و اغلب ویروس‌ها نادیده گرفته شده‌اند. اما به دلیل شیوع بیماری‌های عفونی حاصل از آب، ویروس‌ها به‌عنوان شـاخص کیفی پایش آب‌ها معرفی شـده اسـت (۲، ۴). ویروس‌های انسـانی مانند *نوروویـروس*، *روتاویروس* و *آدنوویروس*، مهمترین ویروس‌های بیماریزا در آب‌های سـطحی آلوده اسـت که دلیل ۳۰ تا ۹۰ درصـد از بیماری‌های ناشـی از آب آلوده در جهان به شـمار می‌روند. این ویروس‌ها در غلظت‌های بالا از مدفوع دفع شـده (تـا 10^{11} ویروس در هر گـرم مدفوع) و معمولا سـیر انتقال مدفوعی- دهانی دارند و گسـتره وسـیعی از بیماری‌ها مانند گاسـتروانتریت، هپاتیت و مننژیـت را ایجاد می‌کنند (۵، ۶). از بیـن *انتروویروس‌ها*، *آدنوویروس* شـایع‌ترین ویروس عامل گاسـتروانتریت حاد و عفونت‌های تنفسی هستند و دلیل بیش از ۸۰ درصد از عفونت‌های کودکان کمتر از ۴ سال است (۷). آژانس حفاظت محیط زیسـت آمریـکا (USEPA: United States Environmental Protection Agency) *آدنوویـروس* را به‌عنوان یکی از ۹ ارگانیسـم فهرسـت آلودگی آب آشـامیدنی عنوان کرده اسـت. این مسـاله به دلیل ویژگی فیزیکوشـیمیایی این ویروس اسـت که ثابت شـده فرایندهای متـداول تصفیه در حـذف کامل ایـن پاتوژن‌ها موثر نیسـت (۸). آدنوویروس‌هـای انسـانی (HAdV) ویروس‌هـای بدون پوشـش بـا ژنوم DNA دورشـته‌ای متعلق به جنس ماسـت *آدنوویروس‌ها* (*Mastadenovirus*) و از خانواده *آدنوویریده* (*Adenoviride*) هسـتند که ۶۰ سـروتیپ از آنها شناسایی شـده و به ۷ گونه (A-G) تقسیم شده‌اند. ژنوتایپ ۴۰ و ۴۱ و به ندرت ۳۸ عامل ۱۷/۶ درصد گاسـتروانتریت حاد در کودکان هسـتند (۹). از آنجایی‌که تامین آب آشامیدنی اغلب از تصفیه آب‌های سـطحی هست، پایش کیفی آب‌های سطحی و تصفیه خانه‌های آب از نظر ویروس‌ها ضروری بنظر می‌رسد. Asami و همکاران (۱) در سال ۲۰۱۶ راندمان حذف انتریک ویروس‌ها در واحدهـای مختلف تصفیه خانـه آب بانکوک در تایلند مورد ارزیابـی قرار دادند. همچنین برای اولین بار در ایران Kargar و همـکاران (۱۰) روتاویروس‌هـای انسـانی را در تصفیه خانه فاضلاب و آب‌های سطحی شهر شیراز و یاسوج پایش نموده‌اند ولی تاکنون پایـش تصفیه خانه‌های آب از لحاظ *آدنوویروس‌ها* انجام نشـده است. معمولا پایش آب از نظر ویروس‌های روده‌ای فرایند دو مرحله‌ای اسـت و به دلیل غلظـت کم ویروس‌ها در آب‌هـا، ضرورت تغلیظ نمونه‌های آب تا حجم کمتر از ۱۰ mL قبل از تشـخیص ویروس وجـود دارد (۱۱). این پژوهش برای اولین بار با هدف ارزیابی راندمان حذف *آدنوویروس‌ها* در فرایند تصفیه آب با اسـتفاده از روش نویـن تغلیظ ویروس در تصفیه خانه آب اصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه:

تصفیه خانـه آب اصفهـان در ۵۵ کیلومتری جـاده اصفهان- شهرکرد واقع شده که با ظرفیت $12/5\ m^3/s$، علاوه بر اصفهان، ۵۶ شـهر و بیش از ۳۰۰ روسـتا (جمعیتی بالـغ بر ۴ میلیون نفر) را به لحاظ شـرب تامین می‌کند. نمایی از تصفیه خانه آب اصفهان در شکل ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی و نقاط نمونه برداری در تصفیه خانه آب اصفهان

نمونه برداری:

از واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان به مدت ۱۲ ماه در ۵ نقطه نمونه برداری انجام شد (شکل ۱). حجم نمونه‌های آب ۲۰ L بوده و در مجموع ۶۰ نمونه در ظروف استریل جمع آوری شد و بلافاصله با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان منتقل شد.

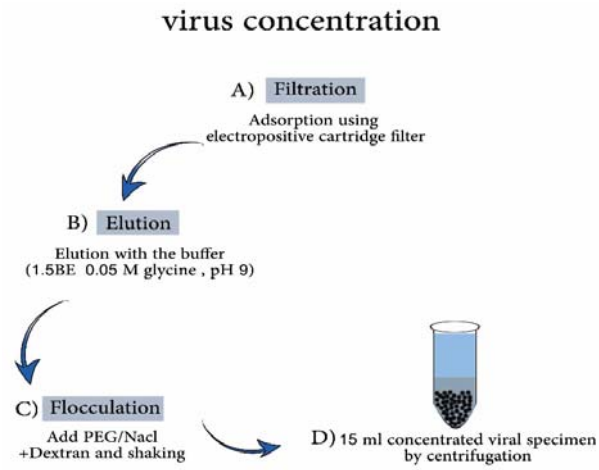
تغلیظ نمونه‌ها:

به منظور بازیابی و جذب موثر ویروس از آب، از فیلتر غشایی کارتریج Zeta Plus 1MDS استفاده شد. این فیلتر از جنس سلولزی با ارتفاع ۲۵/۴ cm و دارای منافذ ۰/۲ µ و بار الکتریکی مثبت بوده و توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا برای جذب ویروس‌های آب طراحی شده است. نمونه‌های آب در حجم ۲۰ L با فیلتر کارتریج و پمپ خلا فیلتر شد. سپس با ۴۰۰ mL بافر شستشوی ساخته شده از گلایسین و عصاره گوشت (1.5% BE:beef extract 0/05 M glycine, pH 9) با فشار هوا کاملا شستشو داده شد. به محلول جمع آوری شده، پلی اتیلن گلیکول (PEG 6000) ۳۰ درصد به میزان ۱۳۳/۶ g (W/V) و ۱۶ mL NaCl ۵ mol (V/V) اضافه گردید. سپس ۱ mL کلروفرم اضافه شد و ۲۰ min با ۲۵۰ دور در دقیقه مخلوط و سپس با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع روماند جداسازی شده و پس از کدگذاری در میکروتیوپ‌های استریل در دمای ۷۰°C- نگهداری شد. مراحل تغلیظ در شکل ۲ نشان داده شده است (۱۰، ۱۲، ۱۳).

آزمون الایزا:

به منظور تشخیص آنتی ژن *آدنوویروس‌ها* آزمون الایزا با استفاده از کیت‌های اختصاصی DRG طبق روش کیت انجام شد. طراحی این کیت‌ها به گونه‌ای است که کف چاهک‌های پلیت با آنتی بادی‌های پلی کلونال *آدنوویروس* پوشیده شده است. نمونه تغلیظ شده به همراه آنتی بادی پلی کلونال کانژوگه با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز به چاهک اضافه شد. رنگ آبی ایجاد شده با افزودن اسید به زرد تغییر یافت. غلظت رنگ تولید شده در طول موج ۴۵۰ nm اندازه گیری و با OD ≥۰/۱۵ مثبت ارزیابی شد (۱۰، ۱۴).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]



شکل ۲- مراحل تغلیظ *آدنوویروس* در نمونه‌های آب با فیلتر Zeta plus Virosorb 1 MDS Cartridge

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده دراین مطالعه

پرایمر		توالی پرایمر	دمای اتصال (°C)	سایز باند (bp)
Real-time PCR	HAdeno-F	5'- TGCCGAGGATGAAGAAGAAGAG -3'	۶۲	۱۷۶
	HAdeno-R	5'- TAGCTTGTGTTTCTGCATTGTCTG -3'	۶۲	۱۷۶
PCR	HAdeno-40	5´- ACTTTGTAAGAGTAGGCGGTTTC-3´	۶۷	۲۹۴
	HAdeno-41	5´- TAATGTTTGTGTTACTCCGCT-3´	۶۷	۲۹۴

روش Real-time PCR:

پس از تغلیظ و جداسازی ویروس، استخراج DNA دو رشته‌ای *آدنوویروس* با استفاده از کیت اختصاصی استخراج اسید نوکلئیک ویروسی (QIAamp viral DNA) براساس دستورالعمل کیت انجام شد (۱). برای بررسی *آدنوویروس‌ها* پرایمر رفت و برگشت به‌صورت اختصاصی با توجه به توالی موجود در بانک جهانی ژن به شماره ثبت KX384959، توسط نرم افزار Gene Runner طراحی گردید و توسط شرکت (Shanghai Generay Biotech CO, Ltd) ساخته شد. برای تعیین ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، ابتدا پرایمرها در سایت NCBI از لحاظ اختصاصیت BLAST شدند و مشخص شد که نسبت به ژنوم ویروس مورد نظر، صحت اتصال دارند. مخلوط واکنش توسط رنگ فلورسانس SYBR Green I برای DNA انجام شد. مخلوط Real-time PCR (۲۰ mL) حاوی ۱۰ mL SYBR Premix، ۱۰۰ nM از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و ۲ mL DNA الگو و ۶ mL آب بود. برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۳ min و در ادامه ۴۰ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۱۵s، واسرشت شدن (denaturation)، ۶۱°C به مدت ۳۰s، اتصال (annealing) و ۷۲ °C به مدت ۳۰s گسترش (extension) انجام گردید. در نهایت جهت منحنی ذوب، دمای بین ۵۵ تا ۹۵ °C به دستگاه داده شد. مراحل کار مطابق روش Watanabe و همکاران صورت گرفت (۱۴، ۱۵).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

روش ژنوتایپینگ:

ژنوتایپینگ با استفاده از روش بر روی نمونه‌های مثبت الاریزا انجام شد. در مرحله اول برای تشخیص *آدنوویروس* و دستیابی به طول تقریبی ۲۹۴ جفت بازی، پرایمرهای یونیورسال از GenBank دریافت شد. در مرحله دوم به منظور تشخیص *آدنوویروس* ۴۰ و ۴۱ از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). به عنوان کنترل مثبت از نمونه‌های کلینیکی *آدنوویروس‌های* انسانی استفاده شد. واکنش با حجم نهایی ۵۰ mL شامل ۳۵ mL آب مقطر، ۵ mL بافر X۱۰، ۱۰۰ nM از هر پرایمر، ۱ mL dNTP Mix (۱۰ mM)، ۱/۵ mL $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۱۰ mL DNA الگو و ۰/۵ mL آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد) انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۱۰ min واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ °C و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به مدت ۲۰s، اتصال در دمای ۵۸ °C به مدت ۲۰ s، گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ min و در نهایت گسترش نهایی در دمایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ min انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۲ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردید. از DNA Ladder مدل ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد و در نهایت از ژل با دستگاه Gel Documentation (UVI Tech) تصویر برداری شد (۱۵).

مجموع کلیفرم ها و کلیفرم‌های مدفوعی به روش تخمین محتمل‌ترین تعداد (MPN/100 mL) ارائه شده در روش‌های استاندارد آزمون‌های آب و فاضلاب و همچنین دما، کلر باقیمانده نمونه‌ها در محل با استفاده از ترمومتر و کلرسنج به روش DPD و pH نمونه‌ها نیز بلافاصله در آزمایشگاه با کمک دستگاه pH متر مورد سنجش قرار گرفت (۱۶).

آنالیز داده‌ها:

در این مطالعه نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS, 17 و آزمون مربع کای (Chi square) انجام گرفت. مرز معنی‌داری در $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

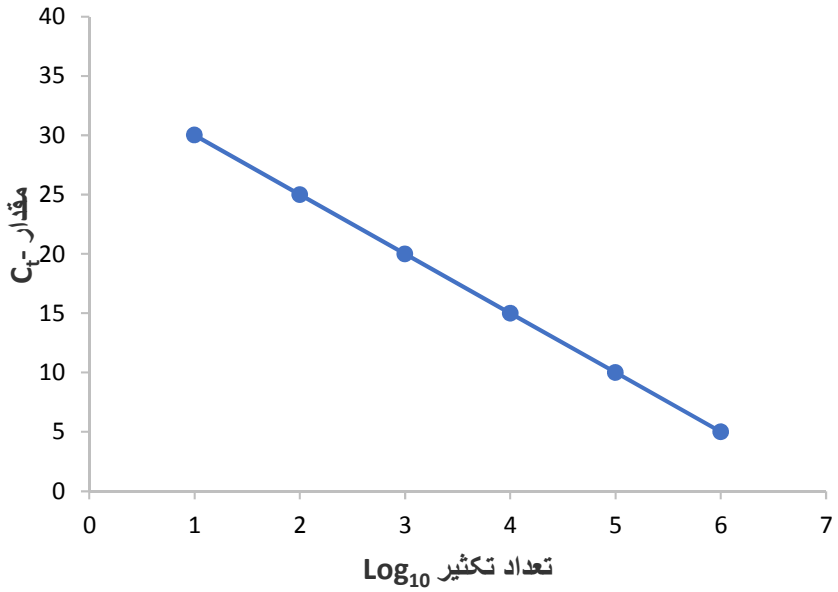
مشخصات میکربی و فیزیکوشیمیایی تصفیه خانه آب به‌صورت میانگین در مدت زمان نمونه برداری در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بین میانگین تعداد کلی فرم‌های کل و مدفوعی در آب ورودی و خروجی تصفیه خانه اختلاف معنی داری وجود دارد ($p<۰/۰۱$).

پس از انجام بلاست هر یک از پرایمرهای مورد استفاده در روش Real-time PCR، عدد alignment scores برابر ۵۰ و Query Cover برابر ۱۰۰ درصد بود. منحنی استاندارد از کپی نامبرها و با ۱۰ سریال رقت در گستره ۱×۱۰^{-۱} تا ۱×۱۰^{-۶} برای DNA تهیه شد (نمودار ۱).

جدول ۲- مشخصات فیزیکوشیمیایی و میکربی آب خام ورودی و آب تصفیه شده خروجی در تصفیه خانه آب اصفهان

	پارامتر(آزمون)	آب خام	آب تصفیه شده
فیزیکو شیمیایی	کدورت (NTU)	۵۷۵-۱	≤۰/۳
	pH	۸-۷	۷/۸-۵
	هدایت الکتریکی (µS/cm)	۳۵۰-۳۶۰	۳۹۰-۳۷۰
	کلر باقیمانده (ppm)	۰	۰/۰-۸/۹
میکربی	مجموع کلی فرم‌ها (MPN)/100 mL	۱۱۰۰-۵۴۰	۰
	کلی فرم‌های مدفوعی (MPN)/100 mL	۳۳۰-۱۳۰	۰

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]



نمودار ۱- منحنی استاندارد Real- time PCR به‌وسیله رقیق سازی برای *آدنوویروس‌ها* با ضریب رگرسیون خطی (R^2=0.965) و شیب خطی (M= -3.293)

از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۱۲ مورد (۲۰ درصد) با استفاده از آزمون الایزا و ۱۶ مورد (۲۶/۶۶ درصد) توسط Real- time PCR *آدنوویروس* تشخیص داده شد. از *آدنوویروس‌های* شناسایی شده، ۷ مورد (۴۳/۷۵ درصد) آن مربوط به آب خام ورودی، ۶ مورد (۳۷/۵۰ درصد) پس از ته نشینی، ۳ مورد (۸/۷۵ درصد) پس از ازن زنی بود. اما در نمونه‌های تهیه شده پس از فیلتراسیون و تصفیه آب خروجی هیچ *آدنوویروسی* شناسایی نشد (نمودار ۲). بیشترین میزان جداسازی *آدنوویروس* در فصل پاییز (۵۰ درصد) و کمترین تعداد در فصل بهار (۵/ ۱۲درصد) بود. کارایی واحدهای مختلف تصفیه خانه در حذف *آدنوویروس* در فرایند تصفیه با معادله ۱ به‌دست آمد:

(۱)

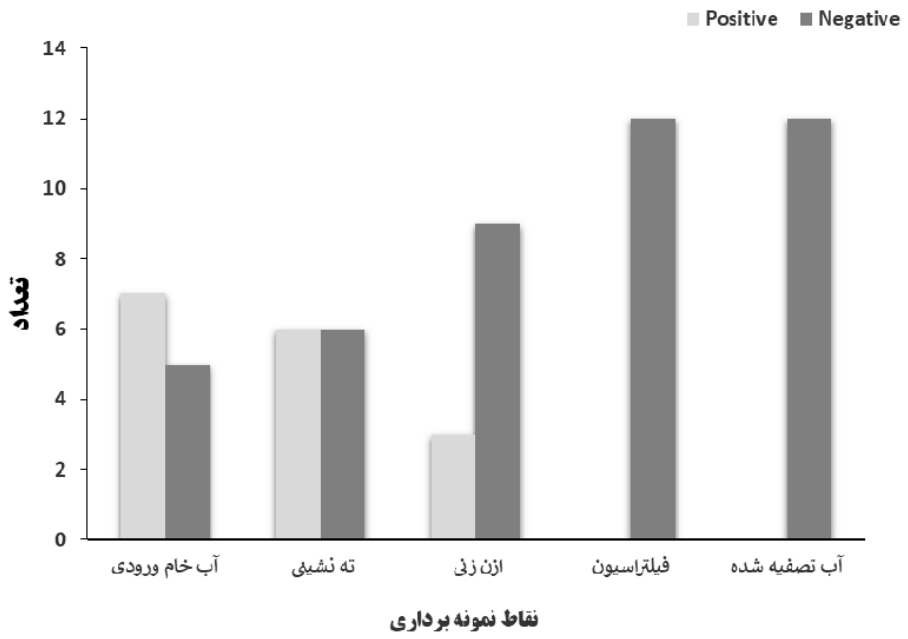
کارایی= [(نمونه‌های مثبت ورودی – نمونه‌های مثبت خروجی) / نمونه‌های مثبت ورودی] ×۱۰۰

با توجه به معادله یاد شده، کارایی واحدهای تصفیه خانه به ترتیب ۱۴/۲۸ درصد در واحد ته نشینی، ۵۰ درصد در واحد گندزدایی و ۱۰۰ درصد در واحدهای فیلتراسیون و خروجی تصفیه خانه بود (نمودار ۳).

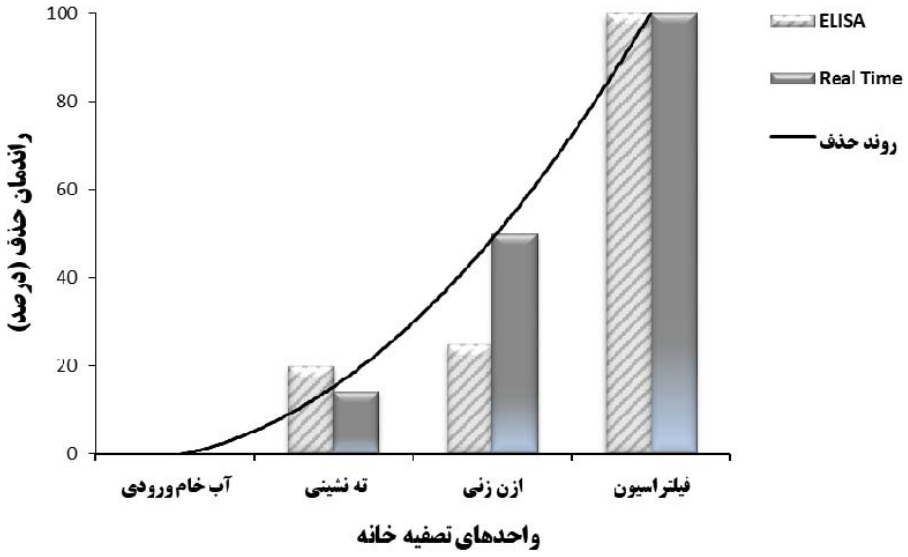
بحث

آدنوویروس‌های انسانی (HAdV) پاتوژن‌های مهمی هستند که در آب‌های آلوده به فاضلاب وجود دارد. این ویروس‌ها به دلیل شیوع بالا و مقاومت در برابر فرایندهای تصفیه از قبیل گندزدایی در تصفیه خانه‌ها مورد پایش قرار می‌گیرند (۱۷). در حدود ۵ تا ۱۵ درصد از عفونت‌های گاستروانتریت در تمام کشورها به دلیل *آدنوویروس‌های* روده‌ای است (۱۸). اگرچه مطالعات زیادی درخصوص وجود پاتوژن‌های موجود در تصفیه خانه‌ها انجام شده، اما پایش ویروس‌ها به دلیل شرایط سخت تغلیظ و هزینه بر بودن کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر کفایت حذف *آدنوویروس‌ها* در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان به‌عنوان بزرگترین تصفیه خانه آب خاورمیانه با روش الایزا و روش مولکولی Real-time PCR

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]



نمودار ۲- توزیع تعداد نمونه‌های مثبت و منفی *آدنوویروس* در نقاط مختلف تصفیه خانه در روش Real- time PCR



نمودار ۳- راندمان حذف *آدنوویروس‌ها* توسط واحدهای مختلف تصفیه خانه براساس آزمون‌های الایزا و Real- time PCR

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایـج میکربـی ارزیابی مجموع کلـی فرم‌ها و کلـی فرم‌های مدفوعی در تصفیه خانه، کفایت و کارایی مناسب فرایند تصفیه را نشان می‌دهد. بطوری‌که باکتری‌های کلی فرم بطور کامل در واحدهای فیلتراسـیون و کلرزنی حذف شـده و به صفر رسیده اسـت. بیشـتر کارایی تصفیه خانه در حذف کلی فرم‌ها به ویژه *E.coli* O157 گزارش شـده بود (۱۹). نتایج به‌دسـت آمده در این مطالعه نشـان داد که از مجموع نمونه‌های مورد بررسی در ۱۲ نمونـه (۲۰ درصـد) با روش الایـزا و ۱۶ نمونه (۲۶/۶۶ درصـد) در روش Real- time PCR آلودگـی *آدنوویـروس* وجود داشـت. بنظر می‌رسد از کاسـتی‌های روش‌های مطالعه این باشد که در روش الایزا برای تولید واکنش مثبت، بالا بودن غلظت آنتی ژن در نمونه الزامی باشـد، به طوری که این روش حساسـیت کمتری در مقایسـه با روش‌های مولکولی دارد. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ در تصفیه خانه آب مصر توسط El-Senousy و همـکاران (۲) انجام شـد، فراوانی *آدنوویروس‌ها* در نمونه‌هـا ۱۶/۲۴ درصـد گزارش گردیـد. همچنین Lee و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۶ فراوانی جداسازی *آدنوویروس‌ها* در تصفیـه خانه شـهر اونتاریو کانادا را بیـن ۱۳ تا ۵۲ درصد گـزارش نمودند کـه با مطالعـه حاضر همخوانی دارد. مسـاله مهـم در بازیابی ویروس‌ها از آب، تغلیـظ آنها در حجم زیادی از آب اسـت. مطالعات زیـادی برای معرفـی روش‌های تغلیظ ویروس‌ها در آب انجام شـده اسـت که از این روش‌ها می‌توان به روش‌های جذب با اسـتفاده از پلی اتیلن گلیگول (PEG) و شناورسازی آلی (OF) Organic flocculation اشاره کرد. اما در مطالعه حاضر بـه منظور بازیابی و جذب موثر ویروس از آب و به‌ویژه آب تصفیه شـده از فیلترهای جدید Zeta Plus 1MDS اسـتفاده شـد. همچنین بافر گلایسین مورد استفاده در این مطالعه بهترین بافر شناسـایی شده برای بازیابی ویروس است که دارای ویژگی حداکثر شستشوی ویروس از سطح فیلتر اسـت (۹، ۱۲). به منظور برآورد دقیق در کنترل سـلامت آب از روش حسـاس مولکولی Real-time PCR استفاده شد. بر طبق مطالعات انجام شـده این روش، حساسیت و اختصاصیت کنتـرل کیفی پاتوژن را در نمونه‌هـای آب امکان پذیر می‌کند. شناسایی *آدنوویروس‌ها* با استفاده از روش Real- time PCR حساسیت بالاتری را در مقایسه با سایر روش‌های مولکولی مورد بررسی دارد (۱۴).

نتایج مطالعه حاضر نشـان داد کـه *آدنوویروس‌ها* در واحدهای ته نشـینی و گندزدایی مقاومت نشـان داده و به صورت کامل حذف نشـده‌اند، اما در واحد فیلتراسیون که از بسترهای شنی سه لایه‌ای شـامل سیلیس، آنتراسـیت و گارنت استفاده شده اسـت، نتایج نشـان دهنده حذف ۱۰۰ درصد را داشت. اما در حوضچه‌های ته نشینی که مواد شیمیایی پلی آلومینیوم کلراید (Poly Aluminum Chloride (PAC)) بـکار مـی‌رود، حـذف *آدنوویروس* ۵۰ درصد بود. اسـتفاده از PAC به عنوان ماده منعقد کننده موثر و نیز بسترهای سه لایه‌ای فیلترها باعث افزایش حذف ذرات به ویژه *آدنوویروس‌ها* در تصفیه خانه شـده اسـت. این نشـان می‌دهد که حذف ویـروس در نقاط مختلف از فراینـد تصفیه متفاوت بـوده و بنابراین پایش و کنترل خطر آلودگی میکربی در نقاط بحرانی از منابع آب تا خروجی تصفیه خانه‌ها بایسـتی انجام شود. در مطالعه Asami و همکاران که در سـال ۲۰۱۶ بر روی تصفیه خانه بانکوک تایلند انجام شد و درصـد راندمان حذف ویروس‌های مختلف از جمله *آدنوویروس* در واحدهای تصفیه خانه اندازه گیری و مشـخص شـد که این درصد برای واحد فیلتراسیون بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد است (۱). بررسـی نمونه‌هـای مثبـت بـا روش PCR نشـان داد که با اسـتفاده از پرایمرهـای یونیورسـال که به‌صـورت کلی حاوی *آدنوویروس‌های* حیوانی و انسـانی طراحی شـده بود از مجموع ۱۶ نمونه مثبت، ۶ مورد (۳۷/۵ درصد) *آدنوویروس* شناسـایی شـد. Ibrahim و همـکاران، *آدنوویروس‌هـای* انسـانی را در تصفیه خانه فاضلاب بیمارسـتانی تونس مورد بررسی قرار داده و راندمـان حذف فرایندهای مختلف تصفیـه را ارزیابی کردند. سپس ژنوتایپ نمونه‌های مثبت با توالی یابی محصولاتPCR به‌دسـت آمـد و *آدنوویروس* در ۶۴ درصـد نمونه‌های فاضلاب مثبت شناسایی شد (۸). در مطالعه حاضر، در دو مرحله، ابتدا با پرایمر یونیورسـال *آدنوویروس* و سپس با استفاده از پرایمرهای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

اختصاصی ژنوتایپ *آدنوویروس های* ۴۰ و ۴۱ ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که ژنوتایپ‌های ۴۰ و ۴۱ در نمونه‌های مثبت وجود ندارد ولی با پرایمرهای یونیورسال، ۶ مورد *آدنوویروس* شناسایی گردید. این نشان می‌دهد که ژنوتایپ‌های بیماریزای ۴۰ و ۴۱ در نمونه‌ها وجود ندارد اما ممکن است ژنوتایپ‌های دیگری از *آدنوویروس* وجود داشته باشد. در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی *آدنوویروس‌ها* مربوط به فصول سرد بود. این مساله نشان می‌دهد که ویروس‌ها در ماه‌های زمستان و پاییز مقاومت بالایی به دمای پایین نسبت به سایر فصل‌های سال دارند. همچنین با توجه به بارندگی در این فصول و شرایط متغیر آب ورودی به تصفیه خانه آب، شرایط برای بقای *آدنوویروس‌ها* مهیاتر است. این نتایج با یافته‌های مطالعه Ibrahim و همکاران (۸) نیز همخوانی دارد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تصفیه خانه آب اصفهان که شامل مراحل، فرایندهای ته نشینی، ازن زنی، فیلترهای سه لایه‌ای و کلرزنی ثانویه است، می‌تواند به‌عنوان یک سیستم قابل قبول و کارآمد آلاینده‌های شاخص ویروسی از جمله *آدنوویروس‌ها* را بطور موثر حذف نماید. با توجه به اینکه *انتروویروس‌ها*، مهمترین ویروس‌های بیماری‌زایی هستند که در آب‌های سطحی شناسایی شده‌اند و با توجه به حساسیت و دقت پروتکل مورد پژوهش، پایش مولکولی مستمر این سیستم تصفیه و سایر تصفیه خانه‌های کشور به منظور دستیابی به استاندارد دقیق و نوین بهداشتی پیشنهاد می‌گردد. همچنین به دلیل تعداد بسیار کم ویروس‌ها در آب‌ها و سخت بودن تغلیظ و بازیابی آنها، می‌توان از فیلترهای کارتریج و روش‌های مولکولی برای بازیابی موثر و شناسایی ویروس‌ها استفاده کرد. بر این اساس روش‌های مولکولی از جمله Real- time PCR در مقایسه با روش‌های سنتی کشت برای شاخص‌های باکتریایی دارای دقت و حساسیت و سرعت بالایی هست که می‌تواند جایگزین روش‌های کشت شود. از طرفی با توجه به مقاومت ویروس‌های گوارشی به مراحل تصفیه به‌ویژه مرحله کلرزنی، ضرورت توجه بیشتر به ارزیابی و پایش سایر ویروس‌ها به ویژه روتاویروس‌ها، گذشته از شاخص‌های متداول باکتریایی در سیستم‌های تصفیه آب و فاضلاب کشور وجود دارد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل (بخشی از) پایان نامه با عنوان "پایش مولکولی *روتا ویروس ها* و *آدنوویروس‌های* انسانی در سیستم‌های آب و فاضلاب اصفهان" در مقطع دکترا در سال ۹۶ است که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم اجرا شده است.

References

1. Asami T, Katayama H, Torrey JR, Visvanathan C, Furumai H. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation-sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. Water Research. 2016;101:84-94.
2. El-Senousy WM, Barakat AB, Ghanem HE, Kamel MA. Molecular epidemiology of human adenoviruses and rotaviruses as candidate viral indicators in the Egyptian sewage and water samples. World Applied Sciences Journal. 2013;27(10):1235-47.
3. Assis ASF, Cruz LT, Ferreira AS, Bessa ME, de Oliveira Pinto MA, Vieira CB, et al. Relationship between viral detection and turbidity in a watershed

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

contaminated with group A rotavirus. Environmental Science and Pollution Research. 2015;22(9):6886-97.
4. Gibson KE, Opryszko MC, Schissler JT, Guo Y, Schwab KJ. Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;84(1):20-29.
5. Kiulia NM, Hofstra N, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G, Rose JB. Global occurrence and emission of rotaviruses to surface waters. Pathogens (Basel, Switzerland). 2015;4(2):229-55.
6. da Silva M., Miagostovich M, Victoria M. Rotavirus and Astrovirus. In: Rose JB, Jiménez Cisneros B, editors. Global water pathogen project. Lansing, Mishigan: Michigan State University; 2016.
7. WHO, UNICEF. Progress on Drinking Water and Sanitation: 2014 Update. Geneva: World Health Organization: 2014.
8. Ibrahim C, Hassen A, Pothier P, Mejri S, Hammami S. Molecular detection and genotypic characterization of enteric adenoviruses in a hospital wastewater. Environmental Science and Pollution Research. 2018;25(11):10977-87.
9. Rames E, Roiko A, Stratton H, Macdonald J. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. Water research. 2016;96:308-26.
10. Kargar M, Javdani N, Najafi A, Tahamtan Y. First molecular detection of group A rotavirus in urban and hospital sewage systems by nested-RT PCR in Shiraz, Iran. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 2013;11(1):4.
11. Delgado-Gardea M, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, Mendieta-Mendoza A, Zavala-Díaz de la Serna F, Contreras-Cordero J, et al. Prevalence of rotavirus genogroup A and norovirus genogroup II in Bassaseachic falls national park surface waters in Chihuahua, Mexico. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2017;14(5):482.
12. Karim MR, Rhodes ER, Brinkman N, Wymer L, Fout GS. New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(8):2393-99.
13. Verheyen J, Timmen-Wego M, Laudien R, Boussaad I, Sen S, Koc A, et al. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(9):2798-801.
14. Soltan MA, Tsai Y-L, Lee P-YA, Tsai C-F, Chang H-FG, Wang H-TT, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. Journal of Virological Methods. 2016;235:99-104.
15. Watanabe M, Kohdera U, Kino M, Haruta T, Nukuzuma S, Suga T, et al. Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. Pediatrics International. 2005;47(3):286-91.
16. APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Washington DC: American Public Health Association; 2005.
17. Assis ASF, Fumian TM, Miagostovich MP, Drumond BP, e Silva MLdR. Adenovirus and rotavirus recovery from a treated effluent through an optimized skimmed-milk flocculation method. Environmental Science and Pollution Research. 2018;25(17):17025-32.
18. Fong T-T, Phanikumar MS, Xagoraraki I, Rose JB. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. Applied and Environmental Microbiology. 2010;76(3):715-23.
19. Atabakhsh P, Amin MM, Mortazavi H, Poursafa P, Yaran M, Sepahi AA, et al. Detection of E. coli O157: H7 by immunological and real-time PCR methods in the water treatment plant. International Journal of Environmental Health Engineering. 2012;1(1):6.
20. Lee D-Y, Leung KT, Lee H, Habash MB. Simultaneous detection of selected enteric viruses in water

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

samples by multiplex quantitative PCR. Water, Air, & Soil Pollution. 2016;227(4):107.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]

Available online: http://ijhe.tums.ac.ir

Original Article

Molecular monitoring effectiveness of human *adenovirus* removal in Isfahan water treatment plant

P Atabakhsh [1], M Kargar[1,*], A Doosti[2]

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2- Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 16 March 2019
Revised: 8 June 2019
Accepted: 12 June 2019
Published: 4 September 2019

Keywords: Human *adenovirus*, ELISA, Genotyping

***Corresponding Author:**
mkargar@jia.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: Human *adenoviruses* transmitted from contaminated water are one of the major pathogens that has been introduced as one of the most important new qualitative water indicators due to their resistance against the purification processes. The main objective of this study was to evaluate efficiency of human *adenovirus* removal in different units of Isfahan Water Treatment Plant.

Materials and Methods: Sampling was conducted from 5 points of a water treatment plant including raw water, clarifier, ozonation, filtration, and treated water for one year. Virosorb 1MDS electropositive cartridge filter was used for the concentration of water samples. To test the *adenovirus* antigens, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed. Real-time PCR and PCR were also employed for quantitative identification and genotyping, respectively. Moreover, total and fecal coliform and physicochemical parameters of the samples were measured.

Results: Out of the 60 samples examined, 12 (20%) samples were diagnosed with ELISA and 16 (26.67%) with molecular method. The highest number of *adenoviruses* detected in autumn was 7 (12%) in raw water influent, 6 (10%) in clarifier, and 3 (5%) samples in ozonation. The high frequency of *adenovirus* detection was in autumn (50%) and the lowest was in spring (12.5%). Furthermore, it was found that the total coliform in raw water influent was between 10^2-10^3 CFU/mL.

Conclusion: The results showed that the removal efficiency of *adenovirus* in filtration and disinfection units of the treatment plant was high and the filtration unit in the plant was an effective unit for the virus removal.

Please cite this article as: Atabakhsh P, Kargar M, Doosti A. Molecular monitoring effectiveness of human adenovirus removal in Isfahan water treatment plant. Iranian Journal of Health and Environment. 2019;12(2):235-46.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-10]