



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

مقاله پژوهشی



پایش مولکولی فرایند حذف آدنووایروس‌های 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: چکیده

زمینه و هدف: آدنووایروس‌های انسانی، یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های منتقل‌شونده 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 آدنووایروس‌های انسانی در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان بود.

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

روش بررسی: نمونه‌گیری از ۵ بخش شامل: آب خام، ته‌نشینی، 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 آدنووایروس‌ها 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.

واژگان کلیدی: آدنووایروس‌های انسانی، الایزا، ژنوتایپینگ

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

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

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

mkargar@jia.ac.ir

مقدمه

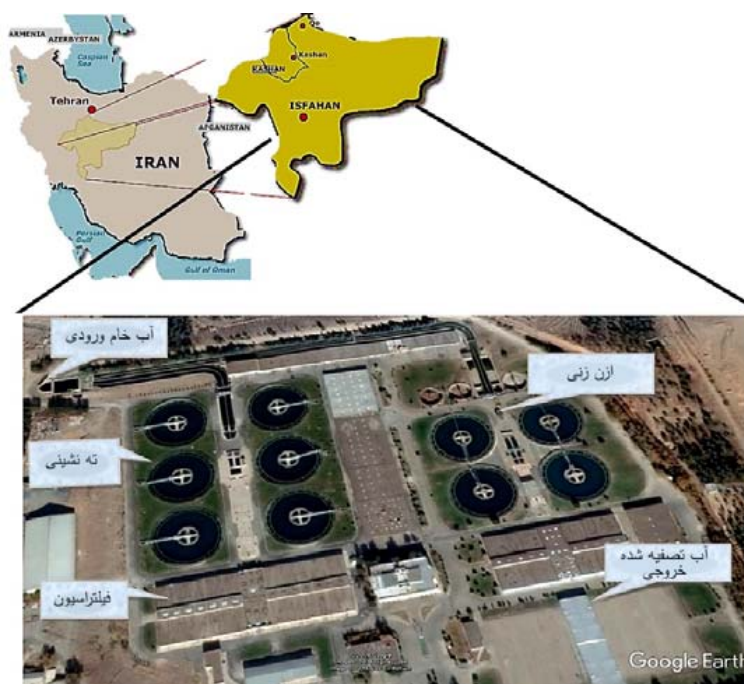
به منظور اطمینان از سلامت و کیفیت آب شرب، ارزیابی اثربخشی فرایندهای تصفیه آب ضروری است. با وجود پیشرفت‌های چشمگیر انجام شده در صنعت تصفیه آب و فاضلاب در کشورهای توسعه یافته، بیماری‌های ویروسی زیادی در طول سال از آب گزارش شده است. این بیماری‌ها شامل گاستروانتریت، مننژیت، آنسفالیت و عفونت‌های تنفسی است. ثابت شده که تخلیه مداوم فاضلاب‌های خام (تصفیه نشده) و تصفیه شده، مهمترین منابع آلودگی آب‌های محیطی با ویروس‌های انسانی هستند. از این‌رو، آب نقش مهمی در ایجاد و انتقال بیماری‌های عفونی دارد (۱، ۲). با وجود پیشرفت‌هایی که در دهه اخیر در تصفیه آب و فاضلاب انجام شده، تعداد بیماری‌های گاستروانتریت حاد ناشی از آب آلوده در سراسر جهان نگران کننده است (۳). عموماً در روش‌های استاندارد ارزیابی کیفیت میکروبی آب شاخص‌های باکتریایی مانند: مجموع کلی فرم‌ها، کلی فرم‌های مدفوعی و انتروکوک‌ها اندازه‌گیری شده و اغلب ویروس‌ها نادیده گرفته شده‌اند. اما به دلیل شیوع بیماری‌های عفونی حاصل از آب، ویروس‌ها به‌عنوان شاخص کیفی پایش آب‌ها معرفی شده است (۲، ۴). ویروس‌های انسانی مانند نوروویروس، روتاویروس و آدنوویروس، مهمترین ویروس‌های بیماری‌زا در آب‌های سطحی آلوده است که دلیل ۳۰ تا ۹۰ درصد از بیماری‌های ناشی از آب آلوده در جهان به شمار می‌روند. این ویروس‌ها در غلظت‌های بالا از مدفوع دفع شده (تا 10^{11} ویروس در هر گرم مدفوع) و معمولاً سیر انتقال مدفوعی - دهانی دارند و گستره وسیعی از بیماری‌ها مانند گاستروانتریت، هپاتیت و مننژیت را ایجاد می‌کنند (۵، ۶). از بین انتروویروس‌ها، آدنوویروس شایع‌ترین ویروس عامل گاستروانتریت حاد و عفونت‌های تنفسی هستند و دلیل بیش از ۸۰ درصد از عفونت‌های کودکان کمتر از ۴ سال است (۷). آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA: United States Environmental Protection Agency) آدنوویروس را به‌عنوان یکی از ۹ ارگانسیم فهرست آلودگی

آب آشامیدنی عنوان کرده است. این مساله به دلیل ویژگی فیزیکوشیمیایی این ویروس است که ثابت شده فرایندهای متداول تصفیه در حذف کامل این پاتوژن‌ها موثر نیست (۸). آدنوویروس‌های انسانی (HAdV) ویروس‌های بدون پوشش با ژنوم DNA دورشته‌ای متعلق به جنس ماست آدنوویروس‌ها (*Mastadenovirus*) و از خانواده آدنوویروئید (*Adenoviridae*) هستند که ۶۰ سروتیپ از آنها شناسایی شده و به ۷ گونه (A-G) تقسیم شده‌اند. ژنوتایپ ۴۰ و ۴۱ و به ندرت ۳۸ عامل ۱۷/۶ درصد گاستروانتریت حاد در کودکان هستند (۹). از آنجایی که تامین آب آشامیدنی اغلب از تصفیه آب‌های سطحی 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 واحدهای مختلف تصفیه خانه آب بانکوک در تایلند مورد ارزیابی قرار دادند. همچنین برای اولین بار در ایران *Kargar* و همکاران (۱۰) روتاویروس‌های انسانی را در تصفیه خانه فاضلاب و آب‌های سطحی شهر شیراز و یاسوج پایش نموده‌اند ولی تاکنون پایش تصفیه خانه‌های آب از لحاظ آدنوویروس‌ها انجام نشده است. معمولاً پایش آب از نظر ویروس‌های روده‌ای فرایند دو مرحله‌ای است و به دلیل غلظت کم ویروس‌ها در آب‌ها، ضرورت تغلیظ نمونه‌های آب تا حجم کمتر از ۱۰ mL قبل از تشخیص ویروس وجود دارد (۱۱). این پژوهش برای اولین بار با هدف ارزیابی راندمان حذف آدنوویروس‌ها در فرایند تصفیه آب با استفاده از روش نوین تغلیظ ویروس در تصفیه خانه آب اصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه:

تصفیه خانه آب اصفهان در ۵۵ کیلومتری جاده اصفهان - شهرکرد واقع شده که با ظرفیت $12/5 \text{ m}^3/\text{s}$ ، علاوه بر اصفهان، ۵۶ شهر و بیش از ۳۰۰ روستا (جمعیتی بالغ بر ۴ میلیون نفر) را به لحاظ شرب تامین می‌کند. نمایی از تصفیه خانه آب اصفهان در شکل ۱ نشان داده شده است.



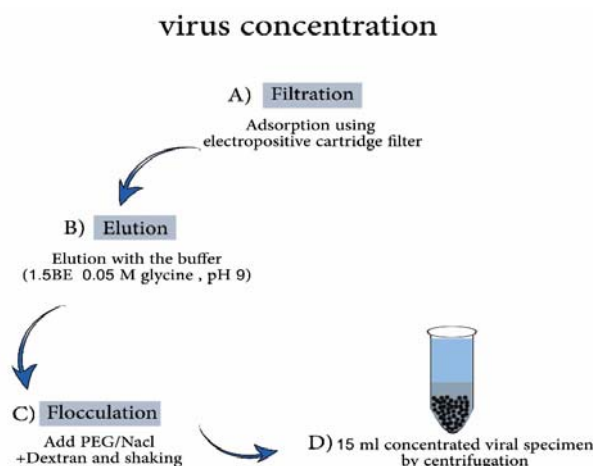
شکل ۱- موقعیت جغرافیایی و نقاط نمونه برداری در تصفیه خانه آب اصفهان

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 0.2μ 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 گلیسین و عصاره گوشت (1.5% BE:beef extract, 0/05 M glycine, pH 9) با فشار هوا کاملاً شستشو داده شد. به محلول جمع آوری شده، پلی اتیلن گلیکول (PEG) اضافه شد. به میزان ۳۰ درصد به میزان ۱۳۳/۶ g (W/V) و ۱۶ mL (V/V) NaCl ۵ mol 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 رومانند جداسازی شده و پس از کدگذاری در میکروتیوپ‌های استریل در دمای 70°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 $OD \geq 0.15$ مثبت ارزیابی شد (۱۰، ۱۴).

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 0.2μ 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 گلیسین و عصاره گوشت (1.5% BE:beef extract, 0/05 M glycine, pH 9) با فشار هوا کاملاً شستشو داده شد. به محلول جمع آوری شده، پلی اتیلن گلیکول (PEG) اضافه شد. به میزان ۳۰ درصد به میزان ۱۳۳/۶ g (W/V) و ۱۶ mL (V/V) NaCl ۵ mol 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 رومانند جداسازی شده و پس از کدگذاری در میکروتیوپ‌های استریل در دمای 70°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 $OD \geq 0.15$ مثبت ارزیابی شد (۱۰، ۱۴).



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

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

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

دارند. مخلوط واکنش توسط رنگ فلورسانس SYBR Green I برای DNA انجام شد. مخلوط Real-time PCR (۲۰ mL حاوی ۱۰ nM SYBR Premix، ۱۰۰ از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و ۲ mL 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).

روش Real-time PCR:

پس از تغلیظ و جداسازی ویروس، استخراج DNA دو رشته‌ای آدنووایروس با استفاده از کیت اختصاصی استخراج اسید نوکلئیک ویروسی (QIAamp viral DNA) براساس دستورالعمل کیت انجام شد (۱). برای بررسی آدنووایروس‌ها پرایمر رفت و برگشت به صورت اختصاصی با توجه به توالی موجود در بانک جهانی ژن به شماره ثبت KX384959، توسط نرم افزار جهانی طراحی گردید و توسط شرکت (Shanghai Gene Runner 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

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 $p < 0/05$ قرار داده شد.

یافته‌ها

مشخصات میکروبی و فیزیکی‌شیمیایی تصفیه خانه آب به صورت 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 ($p < 0/01$).

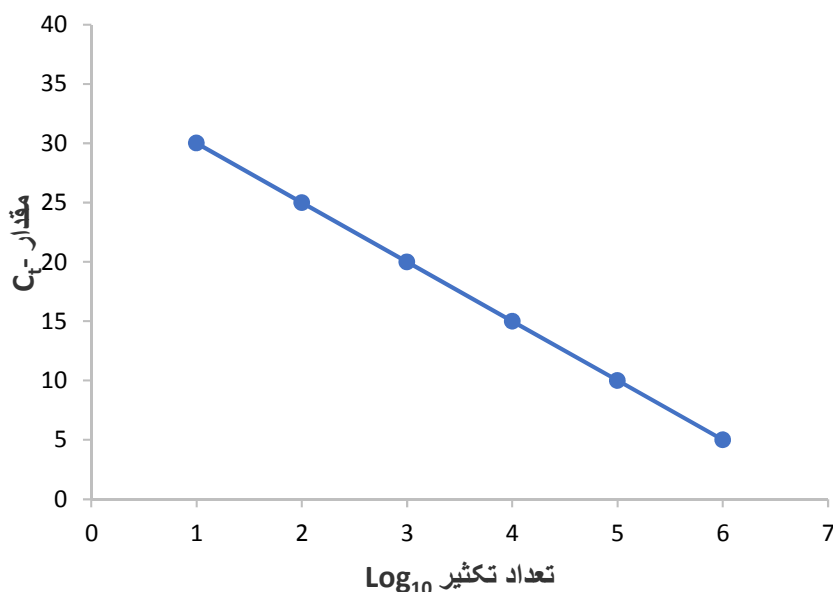
پس از انجام بلاست هر یک از پرایمرهای مورد استفاده در روش Real-time PCR، عدد alignment scores برابر ۵۰ و Query Cover برابر ۱۰۰ درصد بود. منحنی استاندارد از کپی نامبرها و با ۱۰ سریال رقت در گستره 10^{-1} تا 10^{-6} برای DNA تهیه شد (نمودار ۱).

روش ژنوتایپینگ:

ژنوتایپینگ با استفاده از روش بر روی نمونه‌های مثبت الاریزا انجام شد. در مرحله اول برای تشخیص آدنووایروس و دستیابی به طول تقریبی ۲۹۴ جفت بازی، پرایمرهای یونیورسال از GenBank دریافت شد. در مرحله دوم به منظور تشخیص آدنووایروس ۴۰ و ۴۱ از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). به عنوان کنترل مثبت از نمونه‌های کلینیکی آدنووایروس‌های انسانی استفاده شد. واکنش با حجم نهایی ۵۰ mL شامل ۳۵ mL آب مقطر، ۵ mL بافر $X10$ ، ۱۰۰ nM از هر پرایمر، ۱ mL dNTP Mix (۱۰ mM)، ۱/۵ mL $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۱۰ mL DNA الگو و ۰/۵ Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد) انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۱۰ min و اسرشت شدن ابتدایی در دمای $94^{\circ}C$ و در ادامه ۳۵ چرخه شامل اسرشت شدن در دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۲۰s، اتصال در دمای $58^{\circ}C$ به مدت ۲۰s، گسترش در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۱ min و در نهایت گسترش نهایی در دمای $72^{\circ}C$ 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 (Tech UVI) Gel Documentation تصویر برداری شد (۱۵).

جدول ۲- مشخصات فیزیکی‌شیمیایی و میکروبی آب خام ورودی و آب تصفیه شده خروجی در تصفیه خانه آب اصفهان

پارامتر (آزمون)	آب خام	آب تصفیه شده
کدورت (NTU)	۵۷۵-۱	$\leq 0/3$
pH	۸-۷	۷/۸-۵
هدایت الکتریکی ($\mu S/cm$)	۳۵۰-۳۶۰	۳۹۰-۳۷۰
کلر باقیمانده (ppm)	.	۰/۰-۸/۹
مجموع کلی فرم‌ها (MPN)/100 mL	۱۱۰۰-۵۴۰	.
کلی فرم‌های مدفوعی (MPN)/100 mL	۳۳۰-۱۳۰	.



نمودار ۱- منحنی استاندارد Real-time PCR به وسیله رقیق سازی برای آدنووایروس‌ها با ضریب رگرسیون خطی ($R^2=0.965$) و شیب خطی ($M=-3.293$)

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

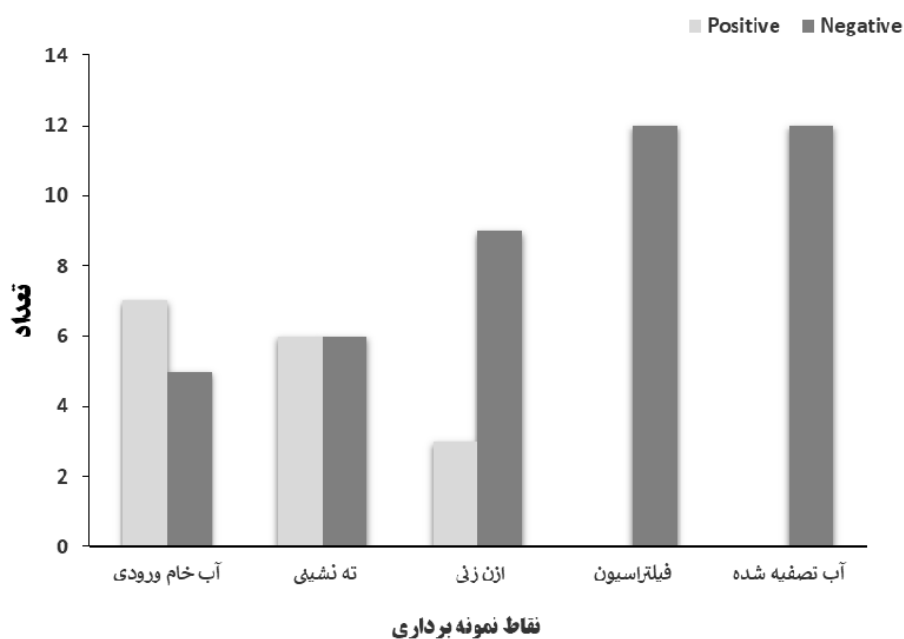
آدنووایروس‌های انسانی (HAdV) پاتوژن‌های مهمی هستند که در آب‌های آلوده به فاضلاب وجود دارد. این ویروس‌ها به دلیل شیوع بالا و مقاومت در برابر فرایندهای تصفیه از قبیل گندزدایی در تصفیه خانه‌ها مورد پایش قرار می‌گیرند (۱۷). در حدود ۵ تا ۱۵ درصد از عفونت‌های گاستروانتریت در تمام کشورها به دلیل آدنووایروس‌های روده‌ای است (۱۸). اگرچه مطالعات زیادی در خصوص 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 کیفیت حذف آدنووایروس‌ها در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان به‌عنوان بزرگترین تصفیه خانه آب خاورمیانه با روش الایزا و روش مولکولی Real-time PCR

از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۱۲ مورد (۲۰ درصد) با استفاده از آزمون الایزا و ۱۶ مورد (۲۶/۶۶ درصد) توسط Real-time PCR آدنووایروس تشخیص داده شد. از آدنووایروس‌های 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 آدنووایروسی شناسایی نشد (نمودار ۲). بیشترین میزان جداسازی آدنووایروس در فصل پاییز (۵۰ درصد) و کمترین تعداد در فصل بهار (۱۲/۵ درصد) بود. کارایی واحدهای مختلف تصفیه خانه در حذف آدنووایروس در فرایند تصفیه با معادله ۱ به‌دست آمد:

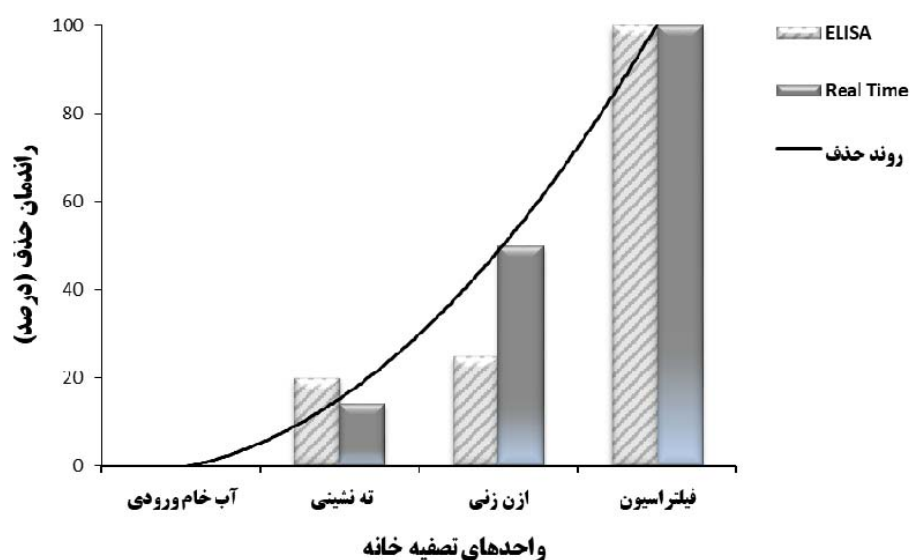
(۱)

$$100 \times \left[\frac{\text{نمونه‌های مثبت ورودی}}{\text{نمونه‌های مثبت خروجی}} \right] = \text{کارایی}$$

با توجه به معادله یاد شده، کارایی واحدهای تصفیه خانه به



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



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

مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج میکربی ارزیابی مجموع کلی فرم‌ها و کلی فرم‌های مدفوعی در تصفیه خانه، کفایت و کارایی مناسب فرایند تصفیه را نشان می‌دهد. بطوری‌که باکتری‌های کلی فرم بطور کامل در واحدهای فیلتراسیون و کلرزنی حذف شده و به صفر رسیده است. بیشتر کارایی تصفیه خانه در حذف کلی فرم‌ها به ویژه *E. coli* O157 گزارش شده بود (۱۹). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که از مجموع نمونه‌های مورد بررسی در ۱۲ نمونه (۲۰ درصد) با روش الایزا و ۱۶ نمونه (۶۶/۲۶ درصد) در روش Real-time PCR آلودگی آدنووایروس وجود داشت. بنظر می‌رسد از کاستی‌های روش‌های مطالعه این باشد که در روش الایزا برای تولید واکنش مثبت، بالا بودن غلظت آنتی ژن در نمونه الزامی باشد، به طوری که این روش حساسیت کمتری در مقایسه با روش‌های مولکولی دارد. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ در تصفیه خانه آب مصر توسط EI-Senousy و همکاران (۲) انجام شد، فراوانی آدنووایروس‌ها در نمونه‌ها ۱۶/۲۴ درصد گزارش گردید. همچنین Lee و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۱۶ فراوانی جداسازی آدنووایروس‌ها در تصفیه خانه شهر اونتاریو کانادا را بین ۱۳ تا ۵۲ درصد گزارش نمودند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. مساله مهم در بازیابی ویروس‌ها از آب، تغلیظ آنها در حجم زیادی از آب است. مطالعات زیادی برای معرفی روش‌های تغلیظ ویروس‌ها در آب انجام شده است که از این روش‌ها می‌توان به روش‌های جذب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG) و شناورسازی آلی (OF) Organic flocculation اشاره کرد. اما در مطالعه حاضر به منظور بازیابی و جذب موثر ویروس از آب و به‌ویژه آب تصفیه شده از فیلترهای جدید Zeta Plus IMDS استفاده شد. همچنین بافر گلاسیین مورد استفاده در این مطالعه بهترین بافر شناسایی شده برای بازیابی ویروس است که دارای ویژگی حداکثر شستشوی ویروس از سطح فیلتر است (۹، ۱۲). به منظور برآورد دقیق در کنترل سلامت آب از روش حساس مولکولی Real-time PCR استفاده شد. بر طبق مطالعات انجام شده این روش، حساسیت و اختصاصیت

کنترل کیفی پاتوژن را در نمونه‌های آب امکان پذیر می‌کند. شناسایی آدنووایروس‌ها با استفاده از روش Real-time PCR حساسیت بالاتری را در مقایسه با سایر روش‌های مولکولی مورد بررسی دارد (۱۴).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آدنووایروس‌ها در واحدهای ته نشینی و گندزدایی مقاومت نشان داده و به صورت کامل حذف نشده‌اند، اما در واحد فیلتراسیون که از بسترهای شنی سه لایه‌ای شامل سیلیس، آنتراسیت و گارنت استفاده شده است، نتایج نشان دهنده حذف ۱۰۰ درصد را داشت. اما در حوضچه‌های ته نشینی که مواد شیمیایی پلی آلومینیوم کلراید ((Poly Aluminum Chloride (PAC) بکار می‌رود، حذف آدنووایروس ۵۰ درصد بود. استفاده از PAC به عنوان ماده منعقد کننده موثر و نیز بسترهای سه لایه‌ای فیلترها باعث افزایش حذف ذرات به ویژه آدنووایروس‌ها در تصفیه خانه شده است. این نشان می‌دهد که حذف ویروس در نقاط مختلف از فرایند تصفیه متفاوت بوده و بنابراین پایش و کنترل خطر آلودگی میکربی در نقاط بحرانی از منابع آب تا خروجی تصفیه خانه‌ها بایستی انجام شود. در مطالعه Asami و همکاران که در سال ۲۰۱۶ بر روی تصفیه خانه بانکوک تایلند انجام شد و درصد راندمان حذف ویروس‌های مختلف از جمله آدنووایروس در واحدهای تصفیه خانه اندازه گیری و مشخص شد که این درصد برای واحد فیلتراسیون بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد است (۱). بررسی نمونه‌های مثبت با روش PCR نشان داد که با استفاده از پرایمرهای یونیورسال که به‌صورت کلی حاوی آدنووایروس‌های حیوانی و انسانی طراحی شده بود از مجموع ۱۶ نمونه مثبت، ۶ مورد (۳۷/۵ درصد) آدنووایروس شناسایی شد. Ibrahim و همکاران، آدنووایروس‌های انسانی را در تصفیه خانه فاضلاب بیمارستانی تونس مورد بررسی قرار داده و راندمان حذف فرایندهای مختلف تصفیه را ارزیابی کردند. سپس ژنوتایپ نمونه‌های مثبت با توالی یابی محصولات PCR به‌دست آمد و آدنووایروس در ۶۴ درصد نمونه‌های فاضلاب مثبت شناسایی شد (۸). در مطالعه حاضر، در دو مرحله، ابتدا با پرایمر یونیورسال آدنووایروس و سپس با استفاده از پرایمرهای

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 کلرزی، ضرورت توجه بیشتر به ارزیابی و پایش سایر ویروس‌ها به‌ویژه 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 ویروس‌ها و آدنووایروس‌های 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.

اختصاصی ژنوتایپ آدنووایروس‌های ۴۰ و ۴۱ ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که ژنوتایپ‌های ۴۰ و ۴۱ در نمونه‌های مثبت وجود ندارد ولی با پرایمرهای یونیورسال، ۶ مورد آدنووایروس شناسایی گردید. این نشان می‌دهد که ژنوتایپ‌های بیماری‌زای ۴۰ و ۴۱ در نمونه‌ها وجود ندارد اما ممکن است ژنوتایپ‌های دیگری از آدنووایروس وجود داشته باشد. در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی آدنووایروس‌ها 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 آدنووایروس‌ها 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 کلرزی ثانویه است، می‌تواند به‌عنوان یک سیستم قابل قبول و کارآمد آلاینده‌های شاخص ویروسی از جمله آدنووایروس‌ها را بطور موثر حذف نماید. با توجه به اینکه آنتروویروس‌ها، 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

References

- 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.
- 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.
- 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

- 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, Michigan: 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, Bousaad 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, Xagorarakis 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

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



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

Original Article



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

P Atabakhsh¹, M Kargar^{1*}, A Doosti²

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.