

Presence of Coronavirus, Enterovirus and Adenovirus in Municipal Wastewater as Indicators of the Prevalence of Associated Viral Infections in the Community

Sahar Gholipour¹,
Davarkhah Rabbani²,
Mahnaz Nikaeen³

¹Ph.D Student in Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

²Professor, Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

³Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

(Received November 28, 2020 ; Accepted March 9, 2021)

Abstract

Background and purpose: Adenoviruses and enteroviruses as intestinal viruses are detected in wastewater. Fecal shedding of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) has been reported in some studies. Therefore, determining the presence of these viruses in wastewater is important to maintain public health and helps in predicting and preventing viral infections in a community.

Materials and methods: In this analytical study, 24 raw wastewater samples were taken from two municipal wastewater treatment plants and viral nucleic acids were extracted. Finally, the presence of adenovirus was detected by real-time PCR, and SARS-CoV-2 and enterovirus were detected using RT Real-time PCR.

Results: Nine (37.5%) samples were found to be positive for SARS-CoV-2. Also, 19 (79%) and 6 (6%) samples showed the presence of adenovirus and enterovirus, respectively.

Conclusion: Detection of SARS-CoV-2, enterovirus, and adenovirus in wastewater samples indicated the prevalence of viral infections in the community served by two wastewater treatment plants studied. The presence of viruses in wastewater shows that monitoring of wastewater could be used as an important tool for the survey of viral infections in the community.

Keywords: enterovirus, adenovirus, SARS-CoV-2, wastewater

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (197): 44-54 (Persian).

* Corresponding Author: Mahnaz Nikaeen - Faculty of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
(E-mail: nikaeen@hlth.mui.ac.ir)

حضور کروناویروس، اتروویروس و آدنوویروس در فاضلاب شهری به عنوان نشانگرهای شیوع عفونت های ویروسی مرتبطه در جامعه

سحر قلی پور^۱

داورخواه ربانی^۲

مهناز نیک آئین^۳

چکیده

سابقه و هدف: آدنوویروس و اتروویروس به عنوان ویروس های شناخته شده روده ای، در فاضلاب به طور متداول شناسایی شده اند. همچنین دفع مدفوعی کروناویروس جدید (SARS-CoV-2) در بعضی از مطالعات گزارش شده است. بنابراین بررسی حضور این ویروس ها در فاضلاب می تواند هم به لحاظ سلامت عمومی و هم به لحاظ پیش بینی و پیش گیری از شیوع عفونت های ویروسی در جامعه حائز اهمیت باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تحلیلی، ۲۴ نمونه از فاضلاب ورودی به دو تصفیه خانه بزرگ فاضلاب شهری برداشته شد و نوکلئیک اسید ویروسی مورد استخراج قرار گرفت. در نهایت حضور آدنوویروس با Real-time PCR و حضور اتروویروس و کروناویروس (SARS-CoV-2) با RT Real-time PCR بررسی شد.

یافته ها: ۹ نمونه از ۲۴ نمونه فاضلاب خام (۳۷/۵ درصد) از نظر حضور کروناویروس جدید مثبت بودند. همچنین ۱۹ نمونه حضور آدنوویروس ها (۷۹ درصد) و ۶ نمونه (۲۵ درصد) حضور اتروویروس ها را نشان دادند.

استنتاج: مشاهده کروناویروس جدید، آدنوویروس و اتروویروس در نمونه های فاضلاب شیوع عفونت این ویروس ها در جامعه هدف تصفیه خانه فاضلاب مورد بررسی را نشان می دهد. حضور ویروس ها در فاضلاب بیانگر این است که پایش فاضلاب می تواند به عنوان یک ابزار مهم برای بررسی شیوع عفونت های ویروسی در جامعه به کار گرفته شود.

واژه های کلیدی: اتروویروس، آدنوویروس، کروناویروس سندرم حاد تنفسی - ۲، فاضلاب

مقدمه

متعلق به جنس بتاکروناویروس (*Betacoronavirus*) و خانواده کروناویریده (*Coronaviridae*) می باشد. کروناویروس جدید منجر به مهم ترین پاندمی بیماری عفونی پس از پاندمی آنفلوآنزا در ۱۹۱۸ شده است (۲، ۳). اپیدمیولوژی بر مبنای فاضلاب، به عنوان یک ابزار قدرتمند بررسی چرخه ویروس در جامعه، می تواند در

کروناویروس جدید یا کروناویروس سندروم حاد تنفسی - ۲ (SARS-CoV-2) که در اواخر سال ۲۰۱۹ در کشور چین شناسایی شد، به سرعت اکثر نقاط جهان را فراگرفت و طغیان وسیعی در حد پاندمی ایجاد کرده است (۱). کروناویروس سندروم حاد تنفسی - ۲ یک ویروس غلاف دار (enveloped) و دارای RNA تک رشته ای و

E-mail: nikaen@hlth.mui.ac.ir

مؤلف مسئول: مهناز نیک آئین - اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده بهداشت

۱. دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۹/۹/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹

راستای تخمین شیوع بیماری‌های ویروسی و توزیع جغرافیایی آن در جوامع به کار گرفته شود (۴). سیستم‌های فاضلاب می‌توانند ابزاری برای شناسایی ویروس‌های دفع شده از طریق مدفوع در سراسر یک منطقه باشند (۵). از این طریق امکان پایش اپیدمیولوژی عفونت‌های ویروسی، حتی در شرایطی که از طریق داده‌های بالینی قابل شناسایی نیستند، فراهم خواهد آمد (۶). اپیدمیولوژی بر مبنای فاضلاب تاکنون برای ویروس‌هایی که با غلظت‌های زیاد از طریق مدفوع پراکنده می‌شوند مانند آدنوویروس، نوروویروس، روتاویروس، اتروویروس و ویروس هپاتیت A به کار گرفته شده است (۷، ۸).

نتایج مطالعه ای که در ژاپن در سال ۲۰۱۷ بر روی رابطه بین شیوع عفونت نوروویروسی در جامعه و غلظت نوروویروس در فاضلاب صورت گرفت، بیانگر این بود که پایش فاضلاب ابزاری بسیار حساس و مفید در شناسایی عفونت نوروویروس در جامعه است (۹). فاضلاب می‌تواند به عنوان نشانگر شیوع بیماری‌های ویروسی که دفع مدفوعی دارند، در جامعه به کار گرفته شود. این مسئله به خصوص برای عفونت‌های ویروسی که عوارض بسیار حادی نشان می‌دهند نظیر کروناویروس جدید، می‌تواند روشی بسیار موثر باشد (۱۰).

آدنوویروس‌ها و اتروویروس‌ها جزو ویروس‌های بدون غلاف روده‌ای هستند که در فاضلاب به‌طور متداول یافت می‌شوند (۱۱، ۱۲). آدنوویروس‌ها دارای DNA هستند، پایداری محیطی بالایی دارند، این ویروس‌ها باعث ایجاد اسهال شده و بیش‌تر در نوزادان و کودکان ایجاد بیماری می‌کنند (۱۲). اتروویروس توسط سازمان جهانی بهداشت به عنوان عامل بیماری‌زای مرتبط با آب در نظر گرفته شده که باعث ایجاد عفونت و بیماری در تمامی گروه‌های سنی در جهان می‌شود (۱۱). ویروس‌های روده‌ای نظیر آدنوویروس‌ها و اتروویروس‌ها غالباً در نمونه‌های بیماران مورد بررسی قرار نمی‌گیرند و اطلاعاتی در خصوص شیوع آن‌ها در جامعه وجود ندارد و بنابراین ردیابی این ویروس‌ها در فاضلاب می‌تواند ابزار بسیار

مناسبی برای تعیین شیوع بیماری‌های ناشی از این ویروس‌ها در جامعه باشد. از سوی دیگر در مطالعات گفته شده که بررسی نمونه‌های فاضلاب برای شناسایی ویروس‌هایی که کم‌تر متداول هستند نیز می‌تواند به کار گرفته شود؛ برای مثال در برخی مطالعات، ویروس‌هایی نظیر کوزاویروس و سالی ویروس مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۳). بنابراین ویروس‌هایی که اختصاصاً به عنوان ویروس‌های روده‌ای شناخته نمی‌شوند اما از طریق مدفوع هم ممکن است دفع شوند و نظیر کروناویروس می‌تواند در سیستم‌های فاضلاب ردیابی شوند.

در مطالعاتی که تاکنون بر روی کروناویروس جدید صورت گرفته است، حضور این ویروس در مدفوع افراد بیمار تایید شده است (۱۴). دفع مدفوعی این ویروس با غلظت‌های 10^5 تا 10^8 ژنومیک کپی در هر گرم گزارش شده است (۱۰). با این‌که ردیابی کروناویروس جدید در دستگاه تنفسی بیماران به صورت میانگین تنها تا ۱۶/۷ روز پس از بروز اولین علائم بیماری امکان‌پذیر بود، نمونه‌های مدفوع به صورت میانگین تا ۲۷/۹ روز پس از بروز اولین علائم این بیماری، مثبت گزارش شد (۱۵). بنابراین چنین استنباط می‌شود که کروناویروس می‌تواند تا مدت‌ها از طریق مدفوع افراد بیمار دفع شده و وارد فاضلاب گردد. در این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ویروس‌ها در فاضلاب به‌عنوان نشانگرهای شیوع عفونت‌های ویروسی در جامعه، فراوانی آدنوویروس‌ها و اتروویروس‌ها به عنوان ویروس‌های روده‌ای بدون غلاف مقاوم و کروناویروس به عنوان عامل اپیدمی اخیر در فاضلاب خام دو تصفیه‌خانه در اصفهان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از فاضلاب در زمان پیک اولیه کروناویروس در ایران در فاصله زمانی ۱۴ اسفند تا ۲۷ اسفند ۱۳۹۸، به صورت مرکب ۱۲ ساعته به فواصل یک ساعت از فاضلاب خام (بعد از حوضچه دانه‌گیری) دو تصفیه‌خانه فاضلاب شهری بزرگ در اصفهان (۱۲) نمونه

2X Power SYBR Green Master Mix (Ampliqon)،
۰/۲ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر BSA و ۲
میکرولیتر از DNA استخراج شده از نمونه‌های فاضلاب
به عنوان الگو انجام شد.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

منبع	دمای آیلینگ (°C)	توالی اولیگو نوکلئوتیدی	ویروس هدف
(۱۷)	۵۷	5'-TGTTAAACCAAGTGGAAAC-3' 5'-CTGTGTTGTAGATTGCG-3'	کرونا ویروس
(۱۸)	۵۹	5'-CAGCCTGGGGAACAAGTTCA-3' 5'-ACTTGTGAAGARTARGCGGKTC-3'	آدنو ویروس
(۱۹)	۵۷	5'-GATTGTACCATAAGCAGC-3' 5'-CCCTGAATGCGGCTAATC-3'	انترو ویروس

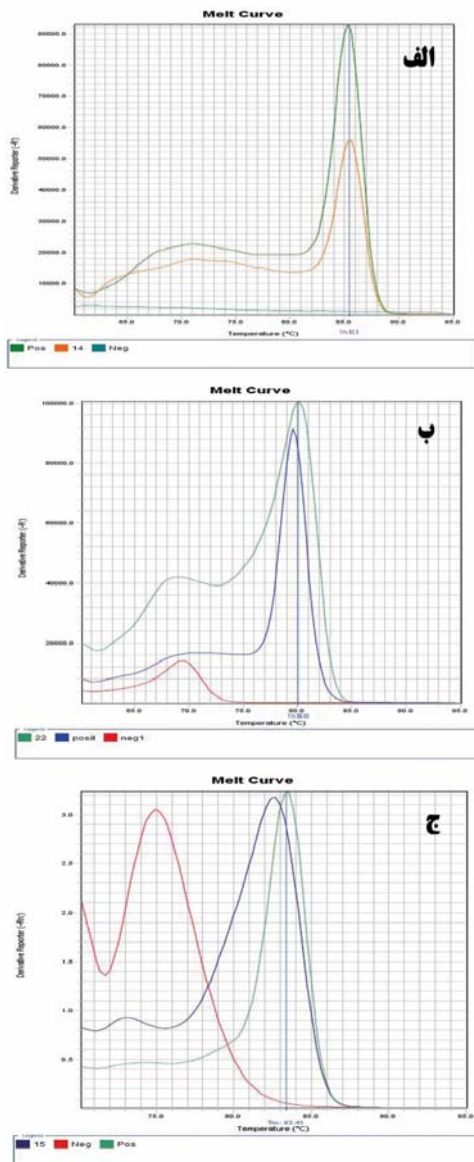
برای شناسایی انترو ویروس و کرونا ویروس از
RT-PCR تک مرحله‌ای استفاده شد. این واکنش در حجم
نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر
مستر میکس 2X Power SYBR Green Master Mix
(Ampliqon)، ۰/۶ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲۵
میکرولیتر آنزیم (QuantiTect RT-PCR, QIAGEN)،
BSA با غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر، ۱ میکرولیتر
MgCl₂ و ۸ میکرولیتر از RNA استخراج شده از نمونه‌های
فاضلاب بود. واکنش‌ها در یک سیستم Real-time PCR
۴۸ خانه‌ای انجام شد (Applied Biosystems).

سیکل حرارتی برای تشخیص آدنو ویروس شامل
یک مرحله denaturation اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد
به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد برای
۱۵ ثانیه و ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود.
همچنین برای تشخیص کرونا ویروس و انترو ویروس
مرحله RT به صورت ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰
دقیقه صورت گرفت و سایر مراحل شامل یک مرحله
denaturation اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰
دقیقه، ۴۵ سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه و
۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. جهت تعیین
اختصاصی بودن واکنش PCR، بعد از تکثیر و پایان
آزمایش منحنی ذوب^۱ برای تشخیص محصولات از

از هر تصفیه خانه) انجام گرفت. نمونه‌ها در ظروف ۲۵۰
میلی لیتری استریل به آزمایشگاه منتقل شدند و تحت
آزمایش قرار گرفتند. جداسازی و تغلیظ ویروس‌های
موجود در نمونه‌ها توسط روش جذب-رسوب آلومینیوم
کلرید مطابق روش ذکر شده در کتاب روش‌های
استاندارد آزمایشات آب و فاضلاب انجام شد (۱۶).
جهت افزایش کارایی تغلیظ تعدادی از نمونه‌ها با به
کارگیری پلی اتیلن گلیکول (PEG) مورد تغلیظ بیش تر
قرار گرفتند. میزان یک سی سی از نمونه‌های تغلیظ شده
جهت استخراج اسید نوکلئیک ویروسی مورد استفاده
قرار گرفتند. استخراج DNA (جهت ردیابی آدنو ویروس)
توسط کیت Viral Nucleic Acid Extraction Kit
(addbio, Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده
انجام گرفت. به طور خلاصه ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه
فاضلاب تغلیظ شده به همراه ۳۵۰ میکرولیتر از محلول
Lysis کیت و ۳/۵ میکرولیتر بتامر کاپتواتانول با یکدیگر
مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس
۱۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و ورتکس شد و
سپس محلول طی دو مرحله به ستون‌های فراهم شده
توسط کیت افزوده و سانتریفیوژ شد. در مراحل بعدی
۵۰۰ میکرولیتر محلول شست و شو در دو مرحله به ستون
اضافه شد و هر بار سانتریفیوژ شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر
از محلول elution به ستون اضافه شد و سانتریفیوژ شد و
حاصل سانتریفیوژ به عنوان DNA استخراج شده ذخیره
شد و برای شناسایی آدنو ویروس در Real-time PCR
مورد استفاده قرار گرفت. همچنین ۵۰۰ میکرولیتر از
فاضلاب استخراج شده با به کارگیری TRIzol مورد
استخراج RNA (جهت ردیابی کرونا ویروس و انترو ویروس)
قرار گرفت. جدول شماره ۱، توالی پرایمرهای مورد
استفاده در این مطالعه و دمای annealing مورد نیاز آن را
نشان می دهد.

شناسایی آدنو ویروس با استفاده از Real-time PCR
صورت گرفت. بدین منظور هر واکنش در
حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس

1. Melting curve



تصویر شماره ۱: منحنی ذوب نمونه، کنترل مثبت و کنترل منفی. الف: منحنی ذوب آدنوویروس دمای ۸۵/۳ سانتی گراد، ب: منحنی ذوب کروناویروس دمای ۸۰/۰۳ سانتی گراد، ج: منحنی ذوب اندروویروس دمای ذوب ۸۳/۴۱ سانتی گراد

بحث

پایش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در فاضلاب می‌تواند به عنوان روشی مناسب برای تشخیص شیوع و چرخه میکروارگانیسم‌ها در جامعه در نظر گرفته شود.

پرایمر دایمر آنالیز شد. همه آزمایشات PCR شامل کنترل‌های مثبت و منفی بودند. DNA آدنوویروس و RNA اندروویروس به دست آمده از نمونه‌های لجنی که با توالی‌یابی^۱ مورد تایید قرار گرفته بود، به عنوان کنترل مثبت و از آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین RNA بیماران مبتلا به بیماری کووید-۱۹ که توسط توالی‌یابی تایید شد، به عنوان کنترل مثبت کروناویروس مورد استفاده قرار گرفت. جهت اطمینان از عدم حضور مواد بازدارنده PCR در فاضلاب به کلیه نمونه‌ها، ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی اضافه شد و تکثیر آن با پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

مطابق نتایج به دست آمده از Real-time PCR، نمونه ۹ از ۲۴ نمونه فاضلاب خام (۳۷/۵ درصد) از نظر حضور کروناویروس مثبت بودند. همچنین ۱۹ نمونه حضور آدنوویروس‌ها (۷۹ درصد)، و ۶ نمونه (۲۵ درصد) حضور اندروویروس‌ها را نشان دادند. جدول شماره ۲، فراوانی حضور ویروس‌ها در نمونه‌های فاضلاب خام تصفیه‌خانه‌های فاضلاب نشان می‌دهد. در این مطالعه در خصوص آدنوویروس، CT‌های بالاتر از ۳۷ و در خصوص اندروویروس و کروناویروس، CT‌های بالاتر از ۴۰، منفی در نظر گرفته شدند. نمودار شماره ۱، منحنی ذوب مربوط به آدنوویروس، کروناویروس و اندروویروس را نشان می‌دهد. بررسی ژن GAPDH نشان داد که در هیچ یک از نمونه‌ها، مشکل مواد بازدارنده PCR وجود نداشت.

جدول شماره ۲: فراوانی حضور ویروس‌ها در فاضلاب خام تصفیه‌خانه‌های فاضلاب

محل نمونه برداری	حضور ویروس‌ها (تعداد نمونه مثبت / کل نمونه‌ها)		
	کروناویروس (تعداد (درصد))	آدنوویروس (تعداد (درصد))	اندروویروس (تعداد (درصد))
پساب تصفیه‌خانه الف	(۵/۱۲) ۴۱	(۹/۱۲) ۷۵	(۴/۱۲) ۳۳
پساب تصفیه‌خانه ب	(۴/۱۲) ۳۳	(۱۰/۱۲) ۸۳	(۲/۱۲) ۱۶

بیش‌ترین غلظت انتروویروس‌ها را در فصل تابستان گزارش کردند (۳۳).

در مطالعه موذنی و همکاران در سال ۲۰۱۷، بیش‌ترین فراوانی و غلظت انتروویروس‌ها در فصل تابستان مشاهده شد، به طوری که صد در صد نمونه‌های فصل تابستان مثبت بودند. در زمستان نمونه مثبتی وجود نداشت (۱۱).

در یک مطالعه در هلند، نمونه‌های مرکب ۲۴ ساعته فاضلاب، ۳ هفته پیش از گزارش اولین مورد مبتلا به کروناویروس در این کشور، از نظر کروناویروس منفی بودند در حالی که ۲/۵ هفته پس از اعلام طغیان این ویروس در هلند از میان ۱۰ نمونه فاضلاب، ۹ نمونه مثبت گزارش شد (۲۲).

در مطالعه‌ای که در ایتالیا صورت گرفت، نمونه‌های فاضلاب در ژانویه ۲۰۲۰ مثبت بودند؛ در حالی که اولین مورد مبتلا به کووید-۱۹ در فوریه ۲۰۲۰ در این کشور گزار شد (۲۱).

در مطالعه‌ای که در استرالیا صورت گرفت، از میان ۶۵ نمونه بررسی شده، ۲۱ نمونه حضور کروناویروس را نشان دادند. در این مطالعه نمونه‌های فاضلاب در اواخر فوریه ۲۰۲۰ مثبت شدند، در حالی که اولین موارد بالینی مبتلا به عفونت کروناویروس در اواسط مارس ۲۰۲۰ در این کشور گزارش شد که تقریباً سه هفته پس از مثبت شدن نمونه‌های فاضلاب بود (۳۴).

با توجه به این که در این مطالعه مشابه با سایر مطالعاتی که در جهان صورت گرفته است، حضور کروناویروس جدید در فاضلاب شهری تایید شده، بررسی و نظارت فاضلاب مهم به نظر می‌رسد چرا که فاضلاب شهری می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص شیوع عفونت در جامعه ارائه دهد. اگرچه تاکنون تأثیر مراحل تصفیه فاضلاب و گندزدایی در حذف کروناویروس‌ها بررسی نشده، اما کروناویروس‌ها جزو ویروس‌های غلاف‌دار و دارای RNA بوده و احتمالاً به گندزدایی رایج فاضلاب مثلاً کلر زنی حساس هستند. وجود این ویروس در فاضلاب به خصوص فاضلاب تصفیه نشده،

حضور کروناویروس در نمونه‌های فاضلاب کشورهای مختلف جهان که با طغیان کووید-۱۹ مواجه بوده‌اند، نظیر استرالیا، ایتالیا، آمریکا و فرانسه گزارش شده است (۲۴-۲۵). نتایج یک مطالعه در ایتالیا نشان داد که ۵۰ درصد (۶ نمونه از ۱۲ نمونه) فاضلاب به کروناویروس آلوده بودند (۲۱). همچنین همه نمونه‌های فاضلاب (۷ نمونه) از تصفیه‌خانه فاضلاب در آمریکا حضور کروناویروس در این نمونه‌ها را نشان دادند (۲۵). از میان ۹ نمونه فاضلاب تصفیه نشده در استرالیا، تنها ۲ نمونه از نظر حضور کروناویروس مثبت بودند (۲۰). در مطالعه حاضر در مجموع ۹ نمونه از ۲۴ نمونه حضور کروناویروس را نشان دادند. از میان ویروس‌های بررسی شده در این مطالعه، آدنوویروس‌ها بیش‌ترین فراوانی حضور را در نمونه‌ها داشتند (۷۹ درصد). انتروویروس‌ها نیز در ۲۵ درصد درصد نمونه‌ها یافت شدند. آدنوویروس‌ها به دلیل داشتن DNA، مقاومت محیطی بالایی نسبت به سایر ویروس‌ها دارند و تغییرات دمایی را به خوبی تحمل می‌کنند (۲۶). گزارش شده که با تغییر فصل، تغییری در حضور آدنوویروس‌ها در فاضلاب رخ نمی‌دهد (۲۷-۲۹). مطالعه نیک آئین و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی پساب دو تصفیه‌خانه فاضلاب شهری در اصفهان نشان داد که همه نمونه‌های فصل تابستان و پاییز و نیمی از نمونه‌های فصل زمستان هر دو تصفیه‌خانه از نظر حضور آدنوویروس مثبت بودند (۳۰).

در مطالعه حاضر، انتروویروس‌ها نسبت به کروناویروس و آدنوویروس فراوانی کم‌تری را نشان دادند. می‌توان گفت که این مسئله شیوع کم‌تر عفونت انتروویروسی در جامعه در فصل زمستان (زمان نمونه‌برداری) را نشان می‌دهد. سایر مطالعات انجام شده، نشان می‌دهند که عفونت‌های انتروویروسی در فصل تابستان و اوایل پاییز شیوع بیش‌تری دارند و اکثر اپیدمی‌های انتروویروسی در فصل تابستان رخ داده‌اند (۳۱، ۳۲). در سال ۲۰۰۹، کارگر و همکاران مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های آب سطحی و فاضلاب کشور انجام دادند و

(نظیر skimmed-milk، اولتراسانتریفیوژ، غشاهای الکتروننگاتیو و...) برای شناسایی کروناویروس در فاضلاب داشته است (۳۷).

در این مطالعه رابطه بین تعداد بیماران شناسایی شده در جامعه و حضور و غلظت ویروس ها به دست نیامد اما گفته شده که روش اپیدمیولوژی بر مبنای فاضلاب از تشخیص مستقیم بیماران روشی حساس تر است چرا که فاضلاب شامل دفعیات افراد بدون علامت و افرادی که تست آزمایشگاهی نداده اند نیز می باشد (۹، ۳۸). با این حال اپیدمیولوژی بر مبنای فاضلاب زمان بر و نیازمند کار فشرده است. به ویژه به کارگیری روش های مولکولی نیازمند حجم زیادی از فاضلاب و تغلیظ آن با روش هایی با کارایی زیاد و همچنین حذف مواد بازدارنده از فاضلاب است (۳۹). با توجه به افزایش مصرف مواد شوینده و ضد عفونی کننده و گندزدا در دوره اپیدمی، مقادیر این مواد در فاضلاب شهری می تواند افزایش یابد. بعضی مواد نظیر صابون ها و سورفاکتانت ها با از بین بردن چربی موجود در غشای میکروارگانیسم ها اثر پاک کنندگی و میکروب کشی داشته (۴۰) و بنابراین تاثیری بر تخریب ماده ژنتیکی میکروارگانیسم ها (DNA و RNA) ندارند اما بعضی مواد گندزدا به خصوص مواد بر پایه کلر می توانند DNA و RNA را هم از بین ببرند (۴۱). بنابراین می توان گفت که بقای ویروس ها (survival) در فاضلاب می تواند تحت تاثیر استفاده زیاد مواد شوینده قرار گرفته و حضور ویروس های عفونی در فاضلاب کم باشد. اما با توجه به این که مواد گندزدایی که قابلیت متلاشی کردن ماده ژنتیکی را دارند از جمله هیپوکلریت سدیم اغلب برای گندزدایی کف و سطوح در غلظت های پایین استفاده شده و معمولا خود به خود تبخیر شده و یا با وسایل نظافت خشک می شود، بنابراین احتمال ورود آن ها به فاضلاب نسبت به مواد شوینده بسیار کم تر است و تاثیر گندزدایی در از بین بردن DNA و RNA میکروارگانیسم های فاضلاب احتمالا کم خواهد بود.

ممکن است باعث پراکنده شدن قطرات فاضلاب آلوده به ویروس و ورود به سیستم تنفسی افراد و به خصوص کارگران تصفیه خانه ها گردد. مطالعاتی که اخیرا بر روی کروناویروس ها صورت گرفته، نواقصی همچون عدم بررسی مدت بقای این ویروس در محیط های آبی، تاثیر فرایندهای تصفیه بر حذف ویروس، تاثیر شرایط محیطی و آب و هوایی نظیر دما، تابش آفتاب و اشعه فرابنفش و pH بر حضور و یا غیرفعال سازی این ویروس می باشد.

بررسی مطالعات صورت گرفته نتایج متفاوتی را در فراوانی و غلظت کروناویروس ها در نمونه های فاضلاب نشان می دهد؛ از جمله علل این مسئله می توان به تفاوت در میزان شیوع عفونت کروناویروس در مناطق مختلف، زمان و نحوه نمونه برداری، روش تغلیظ نمونه های فاضلاب و ژن هدف پرایمرهای انتخاب شده برای PCR اشاره کرد (۳۵). در این مطالعه برای بررسی حضور کروناویروس از تکثیر ژن RdRp به دلیل حساسیت نسبی بالاتر این ژن استفاده شد. در سایر مطالعات صورت گرفته ژن ORF-1ab و RdRp که بخشی از آن است بیش ترین فراوانی تشخیص را داشته اند. در مطالعه Rimoldi و همکاران (۲۰۲۰) ژن ORF-1ab بیش ترین فراوانی تشخیص را داشت در حالی که ژن های N و E در دو نمونه از ۵ نمونه مثبت آب و فاضلاب شناسایی نشدند (۲۳).

در مطالعه ای بر روی فاضلاب ایتالیا توسط La Rosa و همکاران (۲۰۲۰) صورت گرفت، ژن RdRp بیش ترین فراوانی را داشت (۲۱). در مطالعه ای که جهت بررسی وجود کروناویروس در سطوح شهری انجام شد، شناسایی کروناویروس با ژن RdRp کارایی بیش تری نسبت به ژن N داشت (۳۶).

همچنین در مطالعه حاضر جهت تغلیظ بعضی از نمونه های فاضلاب از روش جذب-رسوب آلومینوم هیدروکسید به همراه PEG استفاده شد. در مطالعه مروری Lu و همکاران گزارش شده که تغلیظ توسط PEG بیش ترین استفاده را در میان سایر روش های تغلیظ

پاندمی ویروسی اخیر) در نمونه‌های فاضلاب را با فراوانی ۳۷/۵ درصد نشان می‌دهد. بیش‌ترین فراوانی در بین ویروس‌های بررسی شده در این مطالعه مربوط به آدنوویروس و بعد از آن به ترتیب برای کروناویروس و اتروویروس بود. با وجودی که در این مطالعه عفونت‌زایی ویروس‌ها و احتمال ایجاد عفونت از طریق مواجهه با فاضلاب مورد بررسی قرار نگرفت، اما می‌توان گفت که تعیین حضور ویروس‌ها در فاضلاب می‌تواند به عنوان نشانگر شیوع عفونت‌های ویروسی در جامعه مورد استفاده قرار گیرد.

پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده، حضور ویروس‌های دیگر نظیر روتاویروس، نوروویروس و پولیوویروس در فاضلاب شهری مورد بررسی قرار گیرند.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد اخلاق IR.MUI.RESEARCH.REC.1398.777 انجام گرفته است.

Naddeo و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کرده‌اند که به علت مصرف زیاد مواد گندزدا، احتمال مقاومت کروناویروس به گندزدایی بیش‌تر می‌شود و حتی در صورت شیوع اپیدمی جدید در دنیا این عفونت بسیار خطرناک‌تر از عفونت کروناویروس خواهد بود چرا که میکروارگانیسم‌ها مقاوم‌تر می‌شوند (۴۲).

در مطالعاتی که قصد بررسی تاثیر حضور میکروارگانیسم‌های فاضلاب (برای مثال ویروس‌ها) در ایجاد عفونت برای کارگران تصفیه‌خانه‌ها را دارند یا این که می‌خواهند تاثیر به کارگیری مجدد پساب تصفیه خانه‌ها در ایجاد بیماری را بررسی کنند؛ بررسی این که آیا ویروس‌ها قابلیت ایجاد عفونت دارند یا نه بایستی مورد توجه قرار گیرد؛ اما در مطالعات اپیدمیولوژی بر مبنای فاضلاب با استفاده از روش‌های مولکولی، که هدف بررسی شیوع عفونت فعلی در جامعه است، بقای ویروس‌ها و این که استفاده زیاد مواد شوینده منجر به غیرفعال‌سازی آن‌ها شده تفاوتی ایجاد نمی‌کند (۳۵).

مطالعه ما حضور کروناویروس (به عنوان عامل

References

1. WHO. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). Geneva, Switzerland; 2020
2. Polo D, Quintela-Baluja M, Corbishley A, Jones DL, Singer AC, Graham DW, et al. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19-approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Res* 2020; 186: 116404.
3. Gholipour S, Shamsizadeh Z, Moazeni M, Nikaeen M. Environmental aspects of the coronaviruses transmission: A narrative review. *J Isfahan Med Sch* 2020; 38(570): 206-215 (Persian).
4. Xagorarakis I, O'Brien E. Wastewater-Based Epidemiology for Early Detection of Viral Outbreaks. *Women in Water Quality 2020*; 75-97.
5. Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E, et al. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci Technol* 2006; 54(3): 239-244.
6. Qi R, Huang Y ting, Liu J wei, Sun Y, Sun X feng, Han HJ, et al. Global Prevalence of Asymptomatic Norovirus Infection: A Meta-analysis. *EClinicalMedicine* 2018; 2-3: 50-58.
7. Okabayashi T, Yokota S, Ohkoshi Y, Ohuchi H, Yoshida Y, Kikuchi M, et al. Occurrence of Norovirus Infections Unrelated to Norovirus

- Outbreaks in an Asymptomatic Food Handler Population. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6): 1985-1988.
8. Rodriguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MSJ, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(4): 786-814.
 9. Kazama S, Miura T, Masago Y, Konta Y, Tohma K, Manaka T, et al. Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83(9): e03406-e03416.
 10. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ* 2020; 739: 139076.
 11. Moazeni M, Nikaeen M, Hadi M, Moghim S, Mouhebat L, Hatamzadeh M, et al. Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents. *Water Res* 2017;125:104-113.
 12. Vergara GGRV, Rose JB, Gin KYH. Risk assessment of noroviruses and human adenoviruses in recreational surface waters. *Water Res* 2016;103:276-282.
 13. Thongprachum A, Fujimoto T, Takanashi S, Saito H, Okitsu S, Shimizu H, et al. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect Genet Evol* 2018;63:17-23.
 14. Lescure F-X, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky P-H, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 2020;20(6):697-706.
 15. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in fecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020;5(5):434-435.
 16. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. American Public Health Association. 2012. 541.
 17. Gholipour S, Mohammadi F, Nikaeen M, Shamsizadeh Z, Khazeni A, Sahbaei Z, et al. COVID-19 infection risk from exposure to aerosols of wastewater treatment plants. *Chemosphere* 2021;273:129701.
 18. Rajal V, McSwain B, Tompson DE, Leutnegger CM, Wuertz S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. Elsevier 2007;41(19):4287-4298.
 19. Fuhrman JA, Liang X, Noble RT. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(8):4523-4530.
 20. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 2020;728:138764.
 21. La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ* 2020;736:139652.
 22. Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environ Sci Technol Lett* 2020.

23. Rimoldi SG, Stefani F, Gigantiello A, Polesello S, Comandatore F, Mileto D, et al. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Sci Total Environ* 2020;744:140911.
24. Wurtzer S, Marechal V, Jm M, Moulin. Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. medRxiv. 2020.
25. Nemudryi A, Nemudraia A, Surya K, Wiegand T, Buyukyoruk M, Wilkinson R, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. medRxiv 2020 .
26. Nwachuku N, Gerba CP, Oswald A, Mashadi FD. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(9): 5633-5636.
27. Fong TT, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(3): 715-723.
28. Hewitt J, Leonard M, Greening GE, Lewis GD. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Res* 2011; 45(18): 6267-6276.
29. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol* 2007; 103(6): 2153-2159.
30. Nikaeen M, Seddigh M, Gholipour S, Moazeni M. Investigation of the Presence of Adenoviruses and Enteroviruses in Effluent of Municipal Wastewater Treatment Plants. *Heal Syst Res* 2019; 14(4): 444-450 (Persian).
31. Wiczorek M, Ciągka A, Witek A, Kuryk Ł, Żuk-Wasek A. Environmental Surveillance of Non-polio Enteroviruses in Poland, 2011. *Food Environ Virol* 2015; 7(3): 224-231.
32. Stalkup JR, Chilukuri S. Enterovirus infections: A review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Dermatol Clin* 2002; 20(2): 217-223.
33. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virol J* 2009; 6(1): 149.
34. Ahmed W, Tschärke B, Bertsch PM, Bibby K, Bivins A, Choi P, et al. SARS-CoV-2 RNA monitoring in wastewater as a potential early warning system for COVID-19 transmission in the community: A temporal case study. *Sci Total Environ* 2021; 761: 144216.
35. Barceló D. Wastewater-Based Epidemiology to monitor COVID-19 outbreak: Present and future diagnostic methods to be in your radar. *Case Stud Chem Environ Eng* 2020; 2: 100042.
36. Gholipour S, Nikaeen M, Manesh RM, Aboutalebian S, Shamsizadeh Z, Nasri E, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Contamination of High-touch Surfaces in Field Settings. *Biomed Environ Sci* 2020; 33(12): 925-929.
37. Lu D, Huang Z, Luo J, Zhang X, Sha S. Primary concentration-The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Sci Total Environ* 2020; 747: 141245.
38. Murakami M, Hata A, Honda R, Watanabe T. Letter to the Editor: Wastewater-Based Epidemiology Can Overcome Representativeness and Stigma Issues Related to COVID-19. *Environ Sci Technol* 2020; 54(9): 5311.
39. Corpuz MVA, Buonerba A, Vigliotta G, Zarra T, Ballesteros F, Campiglia P, et al.

- Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci Total Environ* 2020; 745: 140910.
40. Rundle CW, Presley CL, Militello M, Barber C, Powell DL, Jacob SE, et al. Hand hygiene during COVID-19: Recommendations from the American Contact Dermatitis Society. *J Am Acad Dermatol* 2020; 83(6): 1730-1737.
41. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect* 2020; 104(3): 246-251.
42. Naddeo V, Liu H. Editorial Perspectives: 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2): What is its fate in urban water cycle and how can the water research community respond? *Environ Sci Water Res Technol* 2020; 6(5): 1213-1216.