



Molecular monitoring of water resorts in Mazandaran province with some adenovirus strain

Fatemeh jamali fard¹, **Fatemeh roodbari**^{1*}, Salman ahmady asbchin¹
Department of Pathogenic Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received Date:2025.05.10 Accepted Date:2025.09.05

Abstract

Adenoviruses are associated with various diseases such as respiratory infections and eye infections. A variety of biological contaminants can reduce water quality. *Adenoviruses* are considered a suitable model for assessing the pollution of aquatic environments due to their environmental resistance and abundance throughout the year. Therefore, this study investigated *adenoviruses* and their relationship with water pollution. For this purpose, 60 samples were collected from recreational water areas. The temperature and pH of the water samples were also measured and filtered. Genome extraction was performed according to the kit instructions. Primers for types 3, 7, 40, and 41 were designed and examined in the BLAST program. PCR was used to identify the viruses. In this study, using general primers, 9 samples were positive, but specific serotypes were not identified. There was no statistically significant difference between pH and the presence of the virus, but there was a significant relationship between low temperatures and the prevalence of the virus. Although specific serotypes were not identified in this study, the presence of adenovirus in the waters studied was confirmed. On the other hand, the presence of *adenovirus* in pools containing clean water highlights the need for greater monitoring by authorities.

Keywords: *Human adenovirus*, recreational waters, PCR, filtration

* roodbari@umz.ac.ir

EXTENDED ABSTRACT

Introduction:

Water is considered an important element in human activities because it is needed for drinking, irrigation of crops, recreational activities, and industrial uses. It is necessary to protect this natural resource against any pollution to prevent the spread of diseases Silva Lanna. Studies show that more than 30% of developing countries do not have access to quality drinking water sources, and about 663 million people use untreated water, including underground and surface water. It was estimated in 2012; 1.8 billion people, which constituted approximately 25% of the population, consumed contaminated water containing viruses, protozoa and bacteria, which led to various diseases, especially gastroenteritis. Was. A waterborne disease is diarrhea with 1.7 billion reported cases per year, resulting in the death of 525,000 young children Adenoviridae virus family with non-enveloped icosahedral virions contain linear double-stranded DNA genomes and are 90-110 nm in diameter. Its members infect vertebrate hosts and are divided into six genera. The identified adenoviruses are divided into different types based on hemagglutination, carcinogenesis in rodents, DNA homology, and genome organization. Human adenoviruses are also classified into seven types A and more than 100 subtypes, including types 1-52 and genotypes 53-103. Adenovirus types 3 and 7 belonging to subgenus B1 cause lesions that are usually self-limiting. Epidemics of these viruses show that they are the cause of respiratory diseases in children under five years of age worldwide. Intestinal adenovirus types 40 and 41 belonging to the F species are considered to be important agents of gastroenteritis in children and are pathogenically similar to rotavirus and Shigella. Adenoviruses occur in many water environments and these viruses are exceptionally resistant to purification and disinfection processes. To prevent the spread of these microorganisms, the Environmental Protection Agency (USEPA) published a list of water system contaminants, and human adenovirus is one of the nine microbes on this list. Fecal indicator bacteria are relatively easy to measure. However, recreational waters meeting such bacterial standards may still contain enteric viral pathogens, while fecal indicator bacteria fail to predict their presence. In addition, the concentration of these bacteria often does not correlate with the concentration of the virus, which may be due to the increased resistance of viruses to destructive processes compared to bacteria. Human enteroviruses are frequent contaminants of recreational waters. However, viral contamination in recreational waters is rarely directly monitored because of time-consuming cell culture assays. and molecular techniques tend to overestimate the concentration of infectious viruses in a sample. Also, due to the high cost of laboratory equipment and reagents, it can be not easy to detect viral agents in environmental samples. In this study, the filtration method used membrane filters to concentrate viruses from water samples. This method can be used as a useful tool for recovering viruses from environmental samples and allows the detection of viruses by molecular methods. Because adenoviruses may cause serious and even fatal illnesses, particularly in immunocompromised individuals, children, and the elderly, monitoring for such viruses in recreational waters, especially swimming pools, is essential. For this purpose, in this research, the presence of adenoviruses and their relationship with water were investigated.

Method and material:

Between April and May 2023, 60 recreational water samples (pool, sea, river, and wetland) were collected in Mazandaran province. (Figure 1 Sample collection) locations Sampling bottles were autoclaved, and one milliliter of sodium thiosulfate was added to the bottles to neutralize chlorine. temperature Water samples were measured on site and water samples were taken from a depth of 15 to 30 cm. Water samples were taken in one-liter volumes. Then the samples were transferred to the Mazandaran University virology laboratory with ice bags until the time of testing. After the transfer, the pH of the samples was also measured. In all cases, the full details of each sample, including sampling location, sample type, date, and time, were recorded in a prepared questionnaire. The water samples are kept in the refrigerator for 24 hours to settle the mud and their extra substances. Then, filtration was done using a filtration system and a paper filter of 0.45 micrometers and 0.22 micrometers. First, the samples were passed through a 0.45 filter to separate the diseased water from them, then the water samples were passed through a 0.22 filter to collect the viruses on this filter. The filter paper was placed on a plate and washed thoroughly with one milliliter of sterile PBS solution. The virus genome was extracted from water samples using a special nucleic acid extraction kit of Mehrpardazan Samin Environment Company according to the manufacturer protocol. In order to perform the PCR reaction, the desired primers (universal and specific) were designed by primer designer software such as Oligo-7 and by reading the articles and were converted in the Blast program and then ordered to sinaclon. Clinical samples of human adenoviruses are used as positive control. These samples were given to us as gifts by respected professors (Dr. Hosseini, Dr. Abdali, Mrs. Dr. Bamdad and Mrs. Dr.

Meshkat).

Result: In this study, using the general adenovirus primer, 9 samples (pool 30%, swamp 14%, sea 9%, and river samples 12.5%) were positive, but the specific serotypes investigated caused respiratory and digestive diseases and were not detected.

Conclusion:

Statistically, there was no significant difference between pH and the presence of virus, but there was a significant relationship between temperature and virus prevalence. Although specific serotypes were not identified in this research, the presence of adenovirus in recreational water was confirmed. On the other hand, the presence of adenovirus in pool water, which according to society's perception contains clean water, reveals the need for more monitoring by health officials in the field of recreational water, especially pools.



پایش مولکولی آلودگی تفریحگاه های آبی استان مازندران با برخی از سویه های آدنوویروس

فاطمه جمالی فرد^۱، فاطمه رودباری^{۱*}، سلمان احمدی اسب چین^۱

۱. دپارتمان میکروب های بیماری زا، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۴

چکیده

آدنوویروس ها با بیماری های مختلفی مانند عفونت های تنفسی و عفونت های چشمی ارتباط دارند. انواعی از آلاینده های زیستی می توانند کیفیت آب را کاهش دهند. آدنوویروس ها با توجه به مقاومت محیطی و فراوانی آنها در طول سال، به عنوان یک الگوی مناسب جهت ارزیابی آلودگی محیط های آبی در نظر گرفته می شوند. بدین سبب در این پژوهش به بررسی آدنوویروس ها و ارتباط آنها با آلودگی آب پرداخته شد. بدین منظور تعداد ۶۰ نمونه از آب های مناطق تفریحی جمع آوری شد. دما و pH نمونه های آب هم اندازه گیری و فیلتراسیون انجام شد. استخراج ژنوم مطابق دستورالعمل کیت انجام گردید. پرایمرهای تیپ های ۳ و ۷ و ۴۰ و ۴۱ طراحی و در برنامه بلاست بررسی شد. و جهت شناسایی ویروس ها از روش PCR استفاده گردید. در این مطالعه با استفاده از پرایمر عمومی، تعداد ۹ مورد از نمونه ها مثبت شدند اما سروتیپ های اختصاصی شناسایی نشدند. از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین pH و حضور ویروس نبود ولی بین دماهای پایین و شیوع ویروس رابطه معناداری وجود داشت. اگرچه در این تحقیق سروتیپ های اختصاصی، شناسایی نشدند اما حضور آدنوویروس در آب های مورد بررسی، تایید شد. که هدف اصلی پژوهش نیز شناسایی حضور ویروس بود از طرفی حضور آدنوویروس در استخرها که حاوی آب های پاک است لزوم نظارت بیشتر مسئولین را آشکار می سازد.

کلید واژه ها: آدنوویروس انسانی، آب های تفریحی، PCR، فیلتراسیون

* roudbari@umz.ac.ir

۵۳-۱۰۳ طبقه‌بندی می‌شوند (4). آدنووایروس‌های روده‌ای تیپ ۴۰ و ۴۱ متعلق به گونه‌ی F از علل مهم گاستروانتریت در کودکان مطرح شدند و از نظر بیماری‌زایی بعد از روتاویروس^۳ و شیگلا^۴ قرار دارند (5).

مقدمه

آدنووایروس‌ها در بسیاری از محیط‌های آبی وجود دارند و این ویروس‌ها به طور استثنایی در برابر فرآیندهای تصفیه و گندزدایی مقاوم هستند (6).

برای جلوگیری از انتشار این میکروارگانیسم‌ها، آژانس حفاظت از محیط زیست (USEPA) فهرستی از آلاینده‌های سیستم آب را منتشر کرد و آدنووایروس انسانی یکی از ۹ میکروب موجود در این لیست است (7).

اندازه‌گیری باکتری‌های شاخص مدفوعی نسبتاً آسان است. با این حال، آب‌های تفریحی با چنین استانداردهای باکتریایی ممکن است همچنان حاوی پاتوژن‌های ویروسی روده‌ای باشند، در حالی که باکتری‌های شاخص مدفوعی قادر به پیش‌بینی حضور آن‌ها نیستند. علاوه بر این، غلظت این باکتری‌ها اغلب با غلظت ویروس همبستگی ندارد که ممکن است به دلیل افزایش مقاومت ویروس‌ها در برابر فرآیندهای تخریبی در مقایسه با باکتری‌ها باشد (8).

ویروس‌های روده‌ای انسانی آلاینده‌های همیشگی آب-های تفریحی هستند (9). با این حال، آلودگی ویروسی در آب‌های تفریحی به ندرت مستقیماً نظارت می‌شود، زیرا سنجش‌های کشت سلولی زمان‌بر هستند. همچنین به دلیل هزینه بالای تجهیزات و معرف‌های آزمایشگاهی، تشخیص عوامل ویروسی در نمونه‌های محیطی می‌تواند دشوار باشد (10).

از آنجایی که عفونت با آدنووایروس ممکن است باعث ایجاد بیماری‌های جدی و حتی کشنده به خصوص در افراد دارای نقص ایمنی، کودکان و افراد مسن شود، نظارت بر چنین ویروس‌هایی در آب‌های تفریحی به ویژه استخرها مهم

آب به عنوان عنصر مهم در انجام فعالیت‌های انسانی در نظر گرفته می‌شود زیرا برای آشامیدن، آبیاری محصولات کشاورزی، فعالیت‌های تفریحی و مصارف صنعتی مورد نیاز است. حفاظت از این منبع طبیعی، در برابر هر گونه آلاینده برای جلوگیری از شیوع بیماری‌ها ضروری است (1).

مطالعات نشان می‌دهد که بیش از ۳۰ درصد کشورهای در حال توسعه به منابع آب آشامیدنی با کیفیت، دسترسی ندارند و حدود ۶۰۰ میلیون نفر از آب تصفیه نشده از جمله آب‌های زیرزمینی و سطحی استفاده می‌نمایند (2).

در سال ۲۰۱۲ تخمین زده شد؛ ۱/۸ میلیارد نفر که تقریباً ۲۵ درصد از جمعیت کل جهان را تشکیل می‌دادند، آب آلوده حاوی ویروس‌ها، تک یاخته‌ها و باکتری‌ها را مصرف می‌کردند که منجر به انواع بیماری‌ها به ویژه گاستروانتریت شده بود. یک بیماری منتقله از طریق آب، اسهال با ۱.۷ میلیارد مورد گزارش شده در سال است که منجر به مرگ ۵۲۵۰۰۰ کودک خردسال می‌شود (3).

آدنووایروس خانوادگی از ویروس‌ها با ویریون‌های ایکوساهدرال^۱ بدون پوشش و حاوی ژنوم‌های خطی DNA دورشته‌ای است و قطر آن‌ها ۹۰ تا ۱۱۰ نانومتر است. اعضای آن انواع میزبان‌های مهره‌دار را آلوده می‌کنند و به شش جنس تقسیم می‌شوند. آدنووایروس‌های شناسایی شده، بر اساس خواص هم‌گلویتیناسیون^۲، سرطان‌زایی در جوندگان، همسانی DNA و سازماندهی ژنوم به گونه‌های مختلفی تقسیم شده‌اند. آدنووایروس‌های انسانی نیز به هفت گونه A-G و بیش از ۱۰۰ زیرگونه، از جمله تیپ‌های ۵۲-۱ و ژنوتیپ‌های

³ Rotavirus

⁴ Shigella

¹ icosahedral

² Hemagglutination

می باشد. آدنووایروس ها نسبت به بسیاری از ویروس های دیگر، مقاومت بیشتری در برابر شرایط و فرایندهای تصفیه آب دارند. این ویژگی باعث می شود که حتی پس از مراحل گندزدایی و فیلتراسیون، همچنان قابل شناسایی باشند.

برخلاف برخی ویروس ها که فقط در فصل های خاصی شیوع دارند، آدنووایروس ها در تمام طول سال در منابع آبی یافت می شوند این ویژگی آنها را به شاخصی پایدار و قابل اعتماد تبدیل کرده است روش هایی مثل PCR و Real-time PCR امکان شناسایی دقیق و سریع آدنووایروس ها را حتی در غلظت های پایین فراهم می کنند این موضوع برای پایش کیفیت آب بسیار مهم است. شایان ذکر است بررسی آدنووایروس در آب های تفریحی استان مازندران انجام نشده است. بدین سبب در این پژوهش به بررسی وجود آدنووایروس ها و ارتباط آنها با آلودگی آب پرداخته شد.

در این مطالعه، از روش فیلتراسیون، با استفاده از فیلترهای غشایی برای تغلیظ ویروس ها از نمونه های آب استفاده شد. این روش به عنوان ابزاری مفید برای بازیابی ویروس ها از نمونه های محیطی می تواند استفاده شود و امکان تشخیص ویروس ها را با روش های مولکولی فراهم می نماید.

۲. مواد و روش ها

در بازه زمانی فروردین تا اردیبهشت سال ۱۴۰۲ مقدار ۶۰ عدد نمونه آب های تفریحی (استخر، دریا، رودخانه و تالاب) در سطح استان مازندران جمع آوری شد. (شکل ۱ محل های جمع آوری نمونه ها) بطری های نمونه برداری

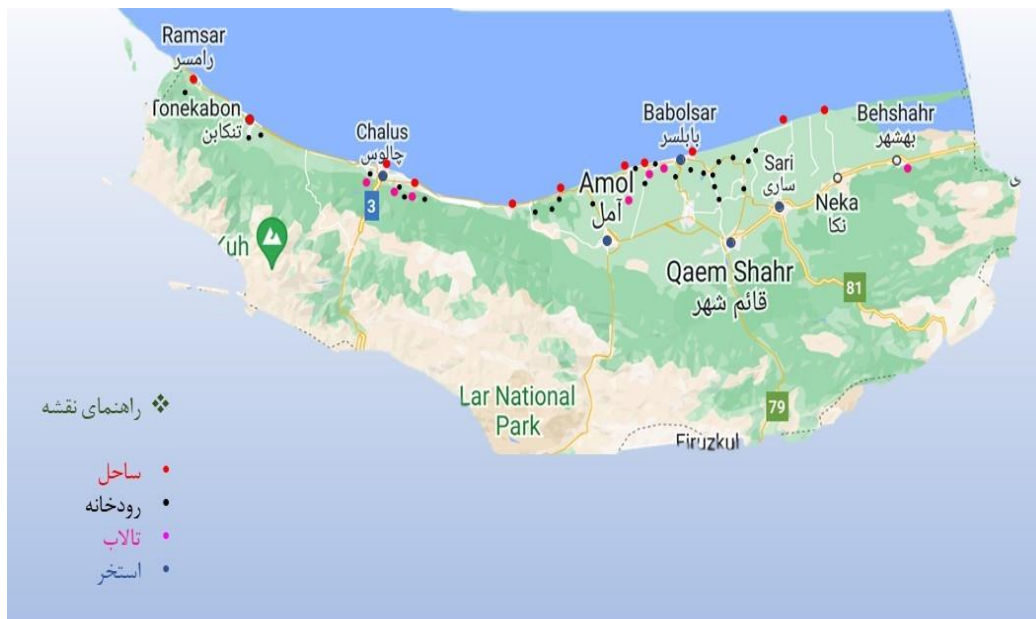
اتوکلاو شدند و مقدار یک میلی لیتر تیوسولفات سدیم^۱ به منظور خنثی سازی کلر به بطری ها اضافه شد. دمای نمونه های آب در محل، اندازه گیری شد و از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتی متری نمونه آب برداشته شد. نمونه های آب در حجم های یک لیتری گرفته شدند و سپس نمونه ها تا زمان آزمایش در کنار کیسه های یخ به یخچال آزمایشگاه ویروس شناسی دانشگاه مازندران انتقال داده شدند. بلافاصله بعد از انتقال، pH نمونه ها هم اندازه گیری شد. در تمامی موارد، مشخصات کامل مربوط به هر نمونه شامل محل نمونه برداری، نوع نمونه، تاریخ و ساعت در دفترچه ای ثبت شدند.

نمونه های آب به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا گل ولای و مواد اضافی آنها ته نشین شود. سپس به وسیله سیستم فیلتراسیون و فیلترهای کاغذی ۰/۴۵ میکرومتر و ۰/۲۲ میکرومتر فیلتراسیون انجام شد؛ ابتدا نمونه های آب از فیلتر ۰/۴۵ عبور داده شدند تا آلودگی باکتریایی از آنها جدا شود در ادامه مجدداً نمونه های آب از فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شدند تا ویروس ها روی این فیلتر جمع آوری شوند سپس کاغذ فیلتر در یک پلیت قرار داده شد و با یک میلی لیتر محلول PBS^۲ استریل کاملاً شسته شد.

ژنوم ویروس از نمونه های آب با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی از آب و فاضلاب شرکت مهرپردازان محیط زیست ثمین واقع در مرکز رشد دانشگاه علوم پزشکی قم، طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج گردید.

² Phosphate buffered saline

¹ Sodium thiosulfate



شکل ۱: نقشه استان مازندران. موقعیت جغرافیایی محدوده‌ی نمونه‌های آب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران در این مطالعه

جدول ۱: مثبت و منفی شدن نمونه‌ها از نظر وجود ویروس

ویروس	استخرشنا	تالاب	دریا	رودخانه	مجموع
مثبت	3	1	1	4	9
منفی	7	6	10	28	51
کل	10	7	11	32	60

برای آدنوهای ۳ و ۷ و نمونه گوارشی برای ۴۰ و ۴۱ استفاده شد. و برای کنترل منفی از آب کاملاً عاری از اسید نوکلئیک استفاده شد.

واکنش با حجم نهایی ۱۵ mL، شامل Master Mix $1\mu\text{L}/\mu\text{L}$

$5/4\mu\text{L}$ آب تزریقی استریل، $5/0\mu\text{L}$ از هر پرایمر ریورس^۲ و فوروارد^۳ و $2\mu\text{L}$ DNA الگو انجام گردید.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر^۴ با شرایط دمایی ۵ min واسرشت شدن اولیه در دمای 94°C ، و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه

جهت انجام واکنش PCR، پرایمرهای مورد نظر (یونیورسال^۱ و اختصاصی) توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک طراحی پرایمر همچون Oligo-7 و با مطالعه مقالات طراحی و در برنامه بلاست بررسی شد و سپس به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند (توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است). به عنوان کنترل مثبت از نمونه های کلینیکی آدنوویروس های انسانی استفاده شد این نمونه ها توسط اساتید محترم (دکتر حسینی، دکتر عبدلی، خانم دکتر بامداد و خانم دکتر مشکات) به صورت هدیه در اختیار ما قرار گرفت. از نمونه های کنترل مثبت تنفسی (آدنو ۵)

³ Forward

⁴ Thermocycler

¹ universal

² Reverse

استفاده شد. و در نهایت از ژل با دستگاه ترانس لومیناتور^۴ تصویر برداری شد. توالی پرایمر ها از روی بخش محافظت شده ژن هگزون طراحی شده اند.

، اتصال در دمای ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۲۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگارز^۱ ۱٪ حاوی رنگ سیف^۲ منتقل و الکتروفورز^۳ گردید . از لدر DNA مدل ۱۰۰ جفت بازی و ۱۰۰۰ جفت بازی جدول ۲: توالی آغازگرهای عمومی و اختصاصی آدنووایروس

اندازه محصول (bp)	دمای ذوب پرایمر (°C)	توالی پرایمر	پرایمر
۱۳۲	۵۹.۸۲	TGCAACATGACMAARGACTGG	AD-F
	۵۵.۹۷	RCTCATRGGCTGGAAGTT	AD-R
۷۰۳	۵۶.۶۷	CCGGGAAGACAATACCTAC	AD3-F
	۵۵.۲۵	TGCATGAGAGTTATCAGACG	AD3-R
۴۹۶	۵۳.۶۹	CGAAGAGGCAATGTGTAC	AD7-F
	۵۵.۹۷	TGGGACTGGATCTAGTGC	AD7-R
۱۱۲۶	۵۶.۶۷	AACGCTGCGGGAAGAATAC	AD40-F
	۵۷.۳۰	CGAGACTGCTTTGGAGAATC	AD40-R
۴۹۶	۵۸.۸۳	CGCCACCGATACGTACTTC	AD41-F
	۶۰.۲۵	TTGTCAGTGGCACCAACTTCAC	AD41-R

۳. یافته ها

نتایج حاصل از الکتروفورز در ژل یک درصد بررسی شد .طبق نتایج به دست آمده از ۶۰ نمونه، ۹ نمونه از نظر حضور ویروس آدنو مثبت بودند. ولی سروتیپ های اختصاصی ۳، ۷، ۴۰ و ۴۱ در بین نمونه ها مشاهده نشد. که میتواند به دلیل غلظت پایین این سروتیپ های اختصاصی باشد چون در نمونه های آبی غلظت ویروس بسیار پایین است . سروتیپ های اختصاصی ۳ و ۷ بیشتر با عفونت های تنفسی و سروتیپ های ۴۰ و ۴۱ با عفونت های گوارشی مرتبط هستند اگر منبع

آنالیز داده ها

در این مطالعه نتایج حاصل از آنالیز نمونه ها با استفاده از نرم افزار SPSS,23 و آزمون Anova انجام گرفت. مرز معنی داری در $p \leq 0.05$ قرار داده شد. در دمای ۲۶: سه تا نمونه مثبت، دمای ۲۵: سه نمونه مثبت، دمای ۲۶: یک نمونه مثبت، دمای ۲۴: یک نمونه مثبت، دمای ۲۷: یک نمونه مثبت داشتیم پس ضریب همبستگی پیرسون به صورت تقریبی ۰/۷۶ - می باشد که نشان می دهد با افزایش دما تعداد نمونه های مثبت کاهش پیدا کرده است .

³Electrophoresis

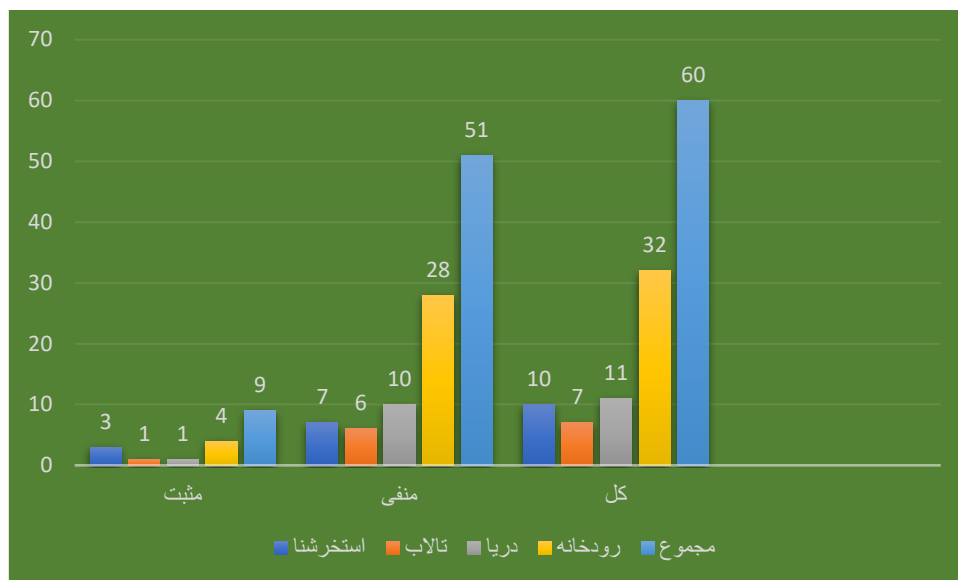
⁴ Trans Illuminator

¹ Agarose gel

² Safe stain

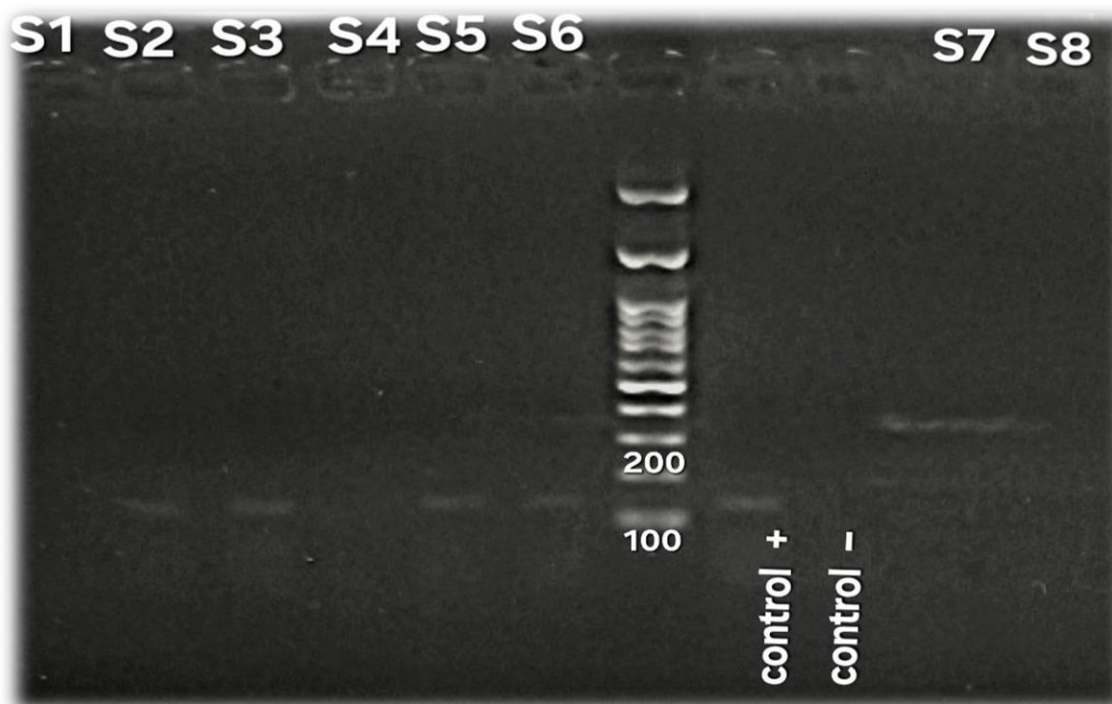
نمونه‌های مثبت با پرایمر عمومی در محدوده ۱۳۲ جفت بازی دیده شدند و در موارد منفی هیچ بانندی مشاهده نشد. برای تشخیص دقیق اندازه باندها از لدر 100bp استفاده گردید. در نمودار ۲ تعداد موارد مثبت و منفی نمونه‌ها مشخص شده است.

آلودگی آب از نوع تنفسی نبوده باشد احتمال حضور این سروتیپ‌ها کمتر است. اگر آلودگی از فاضلاب انسانی نبوده باشد مثلاً از حیوانات یا منابع غیر انسانی، ممکن است این سروتیپ‌ها اصلاً وارد آب نشده باشند. و همچنین سروتیپ‌های مختلف آدنو پایداری متفاوتی در محیط‌های آبی دارند.



نمودار ۲: تعداد موارد مثبت و منفی نمونه‌ها

نتایج الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های آب‌های تفریحی با پرایمر عمومی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از نمونه های آب های تفریحی با پرایمر عمومی آدنووایروس. لدر ۱۰۰ جفت بازی پس از کنترل مثبت، کنترل منفی بعد از کنترل مثبت قرار دارد. نمونه های S2, S3, S5, S6 مثبت می باشند.

مرگ و میر انسان ها به دلیل بیماری های اسهالی رخ می دهد که به آب آلوده و فقدان بهداشت ناکافی نسبت داده شده اند. آب های سطحی می توانند از طریق فاضلاب حاوی ویروس ها آلوده شوند. افراد مبتلا به گاستروانتریت یا هپاتیت^۱ از ۱۰^۵ تا ۱۰^{۱۱} ذرات ویروسی را در هر گرم مدفوع دفع می کنند و تماس یا بلع آب آلوده به مدفوع ممکن است به نوبه خود منجر به عفونت های انسانی شود. تحت تاثیر فاضلاب ممکن است در آب های سطحی، بیش از ۱۰۰ گونه ویروسی یافت شود. نظارت بر حضور ویروس ها به دلیل سطح نسبتاً پایین ذرات ویروسی موجود در آب های محیطی، می تواند چالش برانگیز باشد. با این حال، این محدودیت را می توان با استفاده از روش های تغلیظ نمونه آب، استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی و تکنیک های حساس تر تشخیص ویروسی، برطرف کرد. با توجه به ویژگی های آدنووایروس ها از قبیل مقاومت محیطی و فراوانی نسبی در طول سال، توانایی ایجاد اثرات سایتوپاتیک^۲ در کشت سلولی، شباهت ظاهری به ویروس های بیماری زای انسانی مثل روتاوایروس و نورووایروس^۳ و خطر کمتر، برای محققان به عنوان یک الگوی مناسب جهت ارزیابی آلودگی ویروسی محیط های آبی در نظر گرفته می شوند. به دلیل افزایش آگاهی از این پاتوژن در محیط، تعداد گزارش ها در مورد وقوع آدنووایروس در آب های تفریحی (رودخانه و دریا، استخر) در سال های اخیر افزایش یافته است. شایان ذکر است بررسی آدنووایروس در آب های تفریحی استان مازندران انجام نشده است لذا این پژوهش جهت پایش حضور آدنووایروس در نمونه آب های تفریحی استان مازندران در بازه زمانی فروردین تا اردیبهشت ۱۴۰۲ انجام شد و در مجموع ۶۰ نمونه جمع آوری شد و با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که بیان شد تعداد ۹

طبق نتیجه ای که از آزمون Anova بدست آمد؛ مشخص شد که وجود ویروس آدنو با pH نمونه های جمع آوری شده، ارتباط معنی داری ندارد (p-value ۰/۹).

pH

Tukey HSD^{a, b}

place	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
D=darya	10	7.2500	
roodkhaneh	28	7.3582	
estakhr	7	7.3586	
talab	6	7.3833	
Sig.		.900	

شکل ۴: بررسی ارتباط بین pH و حضور ویروس

طبق نتیجه ای که از آزمون Anova بدست آمد؛ مشخص شد که وجود ویروس آدنو با دمای نمونه ها ارتباط معنی داری دارد (p-value ۰/۰۵) و هرچه دما پایین تر باشد حضور ویروس بیشتر است.

temperature

Tukey HSD^{a, b}

place	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
roodkhaneh	28	25.11	
D=darya	10	25.80	
talab	6	26.00	26.00
estakhr	7		27.29
Sig.		.284	.058

شکل ۵: بررسی ارتباط بین دما و حضور ویروس

۴. بحث

کیفیت و ویژگی میکروبی آب یکی از مهمترین عوامل موثر بر سلامت انسان است. سالانه حدود ۲۵۰ میلیون مورد بیماری های انسانی توسط پاتوژن های منتقله از آب ایجاد می شود که از این تعداد ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر جان خود را از دست می دهند. رشد جمعیت و شهرنشینی فشار زیادی بر کمیت و کیفیت منابع آبی کره زمین وارد می کند. حدود ۹۰ درصد

³ Norovirus

¹ Hepatitis

² Cytopathic

این فصل نمونه برداری انجام شد. در مطالعه حاضر شیوع آدنووایروس در نمونه رودخانه بیشتر از نمونه‌های آب دریا بود. این یافته با نتایج مطالعه وین جونز^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت، که گزارش داد شیوع آدنووایروس در آب شیرین (۴۱٪) بیشتر از آب دریا (۲۷٪) بوده است (16). گرومن^۶ و همکاران نشان دادند که تقریباً ۱۲٪ از آب رودخانه و ۲۴-۹٪ از آب‌های ساحلی در سیدنی، استرالیا آلوده به آدنووایروس است که نتایج آن‌ها با آنچه که در این تحقیق بدست آمده قرابت دارد (17). مسئله مهم در بازیابی ویروس‌ها از آب، تغلیظ آن‌ها در حجم زیادی از آب است. مطالعات زیادی برای معرفی روش‌های تغلیظ در آب انجام شده است. که از این روش‌ها می‌توان به روش‌های جذب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG)^۷، شناورسازی آلی، اولترافیلتراسیون^۸ و اولتراسانتریفیوژ^۹ اشاره کرد. در مطالعه گیراردی^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۱۸، تنوع آدنووایروس در یکی از شاخه‌های رودخانه کای برزیل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها به دو صورت غلیظ و غلیظ نشده مقایسه شدند. آدنووایروس در ۲۴ نمونه از ۵۵ نمونه غلیظ (۴۳٪) شناسایی شد. ۲۳٪ (۱۳/۵۵) از نمونه‌های غلیظ نشده مثبت بودند و نتیجه گرفتند که مرحله غلظت انجام شده به شناسایی آدنووایروس در نمونه‌های بیشتری کمک کرد (18).

روش‌های فیلتراسیون موجود جهت تغلیظ نمونه‌های آب برای مطالعاتی که به تعداد زیادی نمونه نیاز دارند، بسیار پرهزینه هستند. یا برای کاربردهای میدانی معمولی قابل حمل نیستند. لامبرتینی^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۰۸ عملکرد فیلترهای پشم شیشه را در تغلیظ آدنووایروس، نورووایروس و انتروویروس^{۱۲} ارزیابی کردند. میانگین راندمان بازیابی برای آدنووایروس تیپ ۴۱، ۲۱ درصد بود. آنها به این نتیجه

نمونه (۱۵٪) برای آدنووایروس مثبت شدند. ولی سروتیپ-های اختصاصی مورد بررسی شناسایی نشدند. همچنین برای پردازش داده‌ها از روش‌های آماری ناپارامتریک^۱ استاندارد استفاده شد و ارتباطی بین pH آب‌های مورد بررسی و وجود ویروس مشاهده نشد ولی بین دما و شیوع ویروس ارتباط معناداری وجود داشت. چندین بررسی سیستماتیک و متآنالیز در مورد حضور آدنووایروس در آب انجام شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی نشان داد که غلظت آدنووایروس در نمونه‌های مثبت به طور گسترده‌ای در انواع مختلف منابع آبی متفاوت است. سینکلر^۲ و همکارانش گزارش کردند که ۴۸ درصد شیوع آدنووایروس در استخرها، ۴۰ درصد در دریاچه‌ها یا برکه‌ها و ۱۲ درصد باقی‌مانده در فواره‌ها، چشمه‌های آب گرم و رودخانه‌ها رخ می‌دهد. مناطق مورد نظر این مطالعه با پژوهش حاضر مطابقت دارد (11) مطالعه انجام شده توسط روسینول^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۴ شیوع آدنووایروس را ۷۳٪ در (رودخانه گلافکوس) و ۶۰٪ در رودخانه Umealven، در فصل زمستان گزارش کردند (12). شیوع آدنووایروس در زمستان بیشتر از تابستان است زیرا گسترش آدنووایروس با دما همبستگی معکوس دارد (13). علاوه بر این، آدنووایروس‌ها در سطوح رطوبت بالا پایدار هستند و نرخ بقای بالا یعنی (۸۰٪) را نشان می‌دهند. در مقابل، میزان بقای آدنووایروس‌ها در سطوح رطوبت پایین تنها ۵۰ درصد است (14). در مطالعه لیب^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۱، نیز بیان شد دمای پایین بقای ویروس‌های روده‌ای را برای مدت طولانی در محیط آب افزایش می‌دهد (15). در مطالعه حاضر نیز، بروز آدنووایروس بیشتر در ماه‌های بهار و سرد شناسایی شد. البته امکان نمونه برداری در تمام فصول سال وجود دارد ولی به دلیل محدودیت زمانی در

⁷ Polyethylene glycol

⁸ Ultra-filtration

⁹ Ultra-centrifuge

¹⁰ Girardi

¹¹ Lambertini

¹² Enterovirus

¹ Non-parametric

² Sinclair

³ Rusinol

⁴ Lip

⁵ Wayne jones

⁶ Grumman

رسیدند که فیلتراسیون پشم شیشه برای نمونه های با حجم بالا (۱۰۰۰ لیتر) مناسب است و هزینه پایین آن باعث می شود که برای مطالعاتی که به نمونه های زیادی نیاز دارند مفید باشد (19).

در پژوهش حاضر برای تشخیص وجود آدنووایروس ها یک لیتر از هر نمونه آب در ظروف استریل جمع آوری شد. برای استخراج اسید نوکلئیک، نمونه ها به روش فیلتراسیون دو گانه با استفاده از فیلترهای غشایی نیتروسلولزی ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرومتر تیمار شدند و استخراج ژنوم با استفاده از کیت اختصاصی استخراج اسید نوکلئیک از آب و فاضلاب، مطابق پروتکل سازنده انجام شد. راندمان بازیابی ویروس یا استفاده از فیلتراسیون غشایی به شدت به اندازه ویروس، نوع غشا، فشار فیلتراسیون و شرایط نمونه بستگی دارد و ویروس ها معمولاً در بازه ای از ۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر قرار دارند بنابراین فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فقط می تواند ویروس های بزرگتر یا ویروس هایی که به ذرات دیگر چسبیده اند را حذف کند فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر موثرتر است و میتواند بسیاری از ویروس ها را به دام بیندازد ولی ویروس های خیلی کوچک مثل پیکورنا ویروس ها ممکن است عبور کنند. بر اساس منابع آزمایشگاهی فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر می تواند راندمانی بین ۵۰٪ تا ۹۰٪ بسته به نوع ویروس و شرایط نمونه برداری داشته باشد.

فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر معمولاً راندمانی زیر ۵۰٪ دارد و برای بازیابی ویروس های آزاد مناسب نیست. مگر اینکه ویروس ها به ذرات بزرگتر چسبیده باشند. این روش نیز به دلیل هزینه کم می تواند به عنوان ابزاری مفید برای بازیابی ویروس ها از نمونه های آبی مورد استفاده قرار گیرد. ولی در مقایسه با روش های جذب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG)، شناورسازی آلی، اولترافیلتراسیون و اولتراسانتریفیوژ راندمان کمتری دارد.

در مطالعه جاکوب^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۵ حضور پروتوزوآها^۲، اشریشیا کلی^۳ و آدنووایروس در سه رودخانه بزرگ در فرانسه بررسی شدند، بیشترین غلظت آدنووایروس-ها در دو رودخانه و در فصل بهار یافت شد. در واقع، حداکثر دفع میزبان در تابستان اتفاق می افتد که همزمان با فعالیت های تفریحی و تماس انسان با آب است اما بقا و عفونت پذیری آن ها در طول زمستان که دما کمتر است، حداکثر است. این مشاهدات می تواند توضیح دهد که حداکثر وقوع آدنووایروس ها در فصلی با دمای معتدل مانند فصل بهار یافت می شود. جمع آوری نمونه های این پژوهش نیز در فصل بهار انجام شد (20). در مطالعه حاضر، در دو مرحله، ابتدا با پرایمر یونیورسال و سپس با پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپ، آدنووایروس های ۳، ۷، ۴۰ و ۴۱ ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که سروتیپ های اختصاصی آدنووایروس در نمونه ها وجود ندارند، ولی با پرایمرهای یونیورسال ۹ مورد آدنووایروس شناسایی شد. در مطالعه دوستی^۴ و همکاران در سال ۱۳۹۸، نیز در دو مرحله، با استفاده از پرایمر یونیورسال آدنووایروس و سپس با پرایمرهای اختصاصی آدنووایروس-های ۴۰ و ۴۱ ارزیابی شدند که این سروتیپ های اختصاصی شناسایی نشدند ولی با پرایمرهای یونیورسال نتایج مثبت مبنی بر حضور آدنووایروس به دست آمد. از ۶۰ نمونه آب فاضلاب بررسی شده آدنووایروس ها در ۱۶ نمونه (۲۶٪) با روش مولکولی تشخیص داده شدند (۲۱). که این مسئله می-تواند نشان دهنده غالب بودن سروتیپ های دیگر آدنووایروس در آبهای محیطی ایران باشد. این مطالعه با پژوهش حاضر مشابه می باشد.

ابراهیم^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۱۰۲ نمونه فاضلاب بیمارستانی را مورد بررسی قرار دادند و از واکنش PCR

⁴ Doosti

⁵ Ibrahim

¹ Jacob

² Protozoa

³ Escherichia coli

داشت اما با برنامه‌های راهبردی و نظارت بیشتر می‌توان از آلودگی آب‌های استخرها جلوگیری نمود. از جمله این اقدامات اندازه‌گیری کلر باقیمانده می‌باشد که باید در سطح مناسب (معمولاً بین ۱ تا ۳ ppm) حفظ شود. pH مناسب (بین ۷/۲ تا ۷/۸) باعث افزایش اثربخشی کلر در گندزایی می‌شود. گندزایی با پرتو فرابنفش در کنار کلر، می‌تواند اثربخشی بیشتری در حذف ویروسها داشته باشد سیستم‌های تصفیه باید به طور پیوسته آب را پالایش کنند تا از تجمع آلودگی جلوگیری شود. حضور مامورین بهداشت برای بررسی روزانه وضعیت محیطی و آب استخر ضروری است. با وجود تلاش در طراحی دقیق و اجرای این مطالعه، برخی محدودیت‌ها قابل توجه اند. نخست، نمونه برداری از تعدادی منابع آبی انجام شده و ممکن است نتایج به طور کامل قابل تعمیم به سایر مجموعه‌های آبی با شرایط متفاوت نباشد. همچنین استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR اگرچه حساسیت بالایی دارد، اما به تنهایی کافی نیست و باید روش‌های توالی‌یابی نسل جدید، روش‌های کشت سلولی، Real Time PCR برای بررسی دقیق‌تر انجام شوند. همچنین برای بررسی حضور سروتیپ‌های دیگر نمونه‌های مثبت با پرایمر یونیورسال توالی‌یابی شوند. از سوی دیگر، بررسی تنها یک بازه زمانی محدود، امکان تحلیل فصلی یا بررسی تغییرات بلندمدت را فراهم نکرده است. نبود داده‌های بالینی از شناگران نیز مانع ارزیابی مستقیم ارتباط بین آلودگی آب و بروز علائم بیماری شده است. بنابراین با توجه به این محدودیت‌ها نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد.

سپاسگزاری:

این مطالعه در دانشگاه مازندران انجام شد. از جناب آقای دکتر عجم و جناب آقای دکتر عبدلی بابت تهیه نمونه و

تودرتو^۱ برای ارزیابی آدنووایروس‌ها استفاده کردند. ژنوتیپ نمونه‌های آدنووایروس مثبت با تعیین توالی محصولات PCR به دست آمد. آدنووایروس‌ها در ۶۴٪ (۶۵/۱۰۲) از نمونه‌های فاضلاب مثبت تشخیص داده شد و از بین سروتیپ‌های گونه‌های F آدنووایروس تنها وجود تیپ ۴۱ مثبت شد در مطالعه حاضر هیچ کدام از این سروتیپ‌ها مشاهده نشدند که می‌تواند به علت شرایط متفاوت نمونه‌ها و روش مورد بررسی باشد (7).

۵. نتیجه گیری

با توجه به مشکلات ناشی از کمبود آب، بررسی عوامل آلودگی آب ضروری به نظر می‌رسد از این رو مطالعه حاضر از روش PCR معمولی برای شناسایی ویروس‌ها در آب‌های تفریحی استفاده نمود.

در مطالعه حاضر، در دو مرحله، ابتدا با پرایمر یونیورسال، حضور آدنووایروس و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپ، تیپ‌های ۳، ۷، ۴۰ و ۴۱ ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ژنوتایپ‌های مورد بررسی در نمونه‌ها وجود ندارند، ولی با پرایمرهای یونیورسال ۹ مورد آدنووایروس شناسایی شد. این یافته نشان می‌دهد که قطعا ژنوتایپ‌های دیگری از آدنووایروس در این نمونه‌ها وجود دارد. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین pH و حضور ویروس نبود ولی بین دما و شیوع ویروس رابطه معناداری وجود داشت و تعداد موارد مثبت در نمونه رودخانه با pH متوسط ۷.۳۲ و دمای متوسط ۲۴.۵ بیشتر بود.

از آنجایی که عفونت با آدنووایروس ممکن است باعث ایجاد بیماری‌های جدی به خصوص در افراد دارای نقص ایمنی، کودکان و افراد مسن شود، نظارت بر چنین ویروس‌هایی در آب‌های تفریحی بویژه استخرها مهم می‌باشد چرا که با توجه به نتایج این تحقیق ۳۰ درصد استخرها علی‌رغم تصور جامعه از آب‌های پاک آن، آلوده به ویروس بودند و این مسئله زنگ خطر برای مسئولین بهداشت است. اگرچه به طور گسترده نمی‌توان روی تالاب‌ها و رودخانه‌ها نظارت

¹ Nested PCR

تسهیل پروژه کمال تشکر را داریم. همچنین از جناب آقای دکتر نظیفی برای انجام تحلیل های آماری تشکر می کنیم.

منابع

1. Célia da Silva Lanna M, Viancelli A, Michelon W, Castro Carvalho SV, de Almeida dos Reis D, Fernandez de Salles LA, et al. Household-based biodigesters promote reduction of enteric virus and bacteria in vulnerable and poverty rural area. *Environ Pollut*. 2019;252:8–13.
2. Adelodun B, Ajibade FO, Ibrahim RG, Bakare HO, Choi KS. Snowballing transmission of COVID-19 (SARS-CoV-2) through wastewater: Any sustainable preventive measures to curtail the scourge in low-income countries? *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;742:140680. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140680>
3. Pooi CK, Ng HY. Review of low-cost point-of-use water treatment systems for developing communities. *npj Clean Water* [Internet]. 2018;1(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41545-018-0011-0>
4. Al-Heeti OM, Cathro HP, Ison MG. Adenovirus Infection and Transplantation. *Transplantation*. 2022;106(5):920–7.
5. do Nascimento LG, Fialho AM, de Andrade J da SR, de Assis RMS, Fumian TM. Human enteric adenovirus F40/41 as a major cause of acute gastroenteritis in children in Brazil, 2018 to 2020. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15413-1>
6. Kundu A, McBride G, Wuertz S. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. *Water Res* [Internet]. 2013;47(16):6309–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.002>
7. Ibrahim C, Hassen A, Pothier P, Mejri S, Hammami S. Molecular detection and genotypic characterization of enteric adenoviruses in a hospital wastewater. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(11):10977–87.
8. Wyer MD, Wyn-Jones AP, Kay D, Au-Yeung HK, Girones R, Lopez-Pila J, et al. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. *Water Res* [Internet]. 2012;05/29. 2012;46(13):4130–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22633054>
9. Brouwer AF, Masters NB, Eisenberg JNS. Quantitative microbial risk assessment and infectious disease transmission modeling of waterborne enteric pathogens. *Curr Environ Heal reports*. 2018;5:293–304.
10. Farkas K, Mannion F, Hillary LS, Malham SK, Walker DI. Emerging technologies for the rapid detection of enteric viruses in the aquatic environment. *Curr Opin Environ Sci Heal* [Internet]. 2020;16:1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.007>
11. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *J Appl Microbiol*. 2009;107(6):1769–80.
12. Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Hundesa A, Vieira C, Kern A, Eriksson I, et al. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res*. 2014;59:119–29.
13. Du Prel JB, Puppe W, Gröndahl B, Knuf M, Weigl JAI, Schaaff F, et al. Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):861–8.
14. Davis GW, Griesemer RA, Shaddock JA, Farrell RL. Effect of relative humidity on dynamic aerosols of adenovirus 12. *Appl Microbiol*. 1971;21(4):676–9.
15. Lipp EK, Kurz R, Vincent R, Rodriguez-Palacios C, Farrah SR, Rose JB. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries*. 2001;24(2):266–76.
16. Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, et al. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res*. 2011;45(3):1025–38.
17. Grohmann GS, Ashbolt NJ, Genova MS, Logan G, Cox P, Kueh CSW. Detection of viruses in coastal and river water systems in Sydney, Australia. *Water Sci Technol*. 1993;27(3–4):457–61.
18. Girardi V, Demoliner M, Gularte JS, Spilki FR. 'Don't put your head under water': enteric viruses in Brazilian recreational waters. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2019;29:100519. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100519>
19. Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from

- drinking water by use of glass wool filters. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(10):2990–6.
20. Jacob P, Henry A, Meheut G, Charni-Ben-Tabassi N, Ingr V, Helmi K. Health risk assessment related to waterborne pathogens from the river to the tap. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(3):2967–83.
21. P Atabakhsh 1, M Kargar1,* AD. Molecular monitoring effectiveness of human adenovirus removal in Isfahan water treatment plant. *Iran J Heal Env.* 2019;12(2):235–46.