



مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت
دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

عنوان طرح تحقیقاتی

شناسایی ویروس (SARS-CoV-2 (Covid-19 در فاضلاب شهری - مطالعه

موردی: فاضلاب شهری اردبیل

مجری طرح

دکتر عبدالله درگاهی

استادیار مهندسی بهداشت محیط مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

همکاران طرح:

دکتر حامد زندیان

دکتر مهدی وثوقی

دکتر چیمین کرمی

فهرست مطالب	صفحه
چکیده	۳
مقدمه	۴
بیشینه تحقیق	۶
مواد و روش ها	۷
نتایج	۸
بحث و نتیجه گیری	۲۸
پیشنهادات	۳۰
منابع	۳۰
پیوست	۳۲

چکیده

کروناویروس ها ویروس های RNA مثبت هستند که به خانواده کروناویریده و دسته Nidovirales تعلق دارند که بصورت گسترده ای در گونه های انسانی و پستانداران پخش شده اند. اگرچه بیشتر عفونت های کرونا ویروس ها ملایم هستند، اما اپیدمی های ناشی از دو نوع بتاکرونا ویروس سبب ایجاد کروناویروس سندرم تنفسی حاد (SARS-CoV) و کروناویروس سندرم حاد تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) می گردد. ویروس موجود در فاضلاب ممکن است به روش های مختلف به انسان منتقل شده و مجدد باعث بروز بیماری در افراد در معرض شود. یک مطالعه نشان داده است که کرونا ویروس در مدفوع قادر است تا ۳ روز و در آب خام فاقد کلر و فاضلاب بیمارستانی به مدت ۲ روز در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد زنده بماند. که در صورت عدم تصفیه فاضلاب، این ویروس می تواند وارد آب های سطحی و زیرزمینی شده و از آن طریق باعث ایجاد آلودگی محیط زیست و ایجاد بیماری در انسان شوند. با توجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه ای در زمینه شناسایی coronavirus COVID-19 در فاضلاب شهری (شامل فاضلاب بیمارستانها، فاضلاب شهری، فاضلاب ناشی از شبکه جمع آوری فاضلاب و ..) انجام نشده است بدین منظور این مطالعه با هدف شناسایی coronavirus COVID-19 در فاضلاب های تولیدی شهر اردبیل انجام شد. بنابراین در مطالعه حاضر ۶۷ نمونه از فاضلاب شهری اردبیل (۹ نمونه از تصفیه خانه های فاضلاب و ۱۴ نمونه از فاضلاب بیمارستانی بیمارستانهای مختلف و ۴۴ نمونه از شبکه های جمع آوری فاضلاب اردبیل) جهت تعیین حضور کروناویروس در فاضلاب برداشت گردید. نمونه ها با استفاده از روش نمونه گیری مرکب جمع آوری شد. در مجموع ۱۵ مورد از ۶۷ نمونه (۲۲,۳۸٪) جمع آوری شده از فاضلاب اردبیل، برای SARS-CoV-2 مثبت بودند. همچنین تعداد مشخصی نمونه از منابع آب (آبهای سطحی، زیرزمینی و چاهها و چشمه ها) جهت شناسایی کروناویروس نمونه برداری گردید. نتایج نشان داد که در تمامی نمونه های منابع آب استان اردبیل، کروناویروس شناسایی نگردید.

واژگان کلیدی: کروناویروس، فاضلاب شهری، شبکه جمع آوری فاضلاب، فاضلاب بیمارستانی

مقدمه

کرونا ویروس جدید انسانی که به نام سندروم تنفسی حاد شدید ۲ (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)) شناخته می شود اولین بار در ووهان چین در اواخر سال ۲۰۱۹ میلادی شناسایی شد. و پس از آن بطور سریعی در ۲۱۰ کشور در سراسر جهان چه کشورهای توسعه یافته و چه کشورهای در حال توسعه گسترش یافت (۱). اعضای خانواده کورونا ویریده شامل ویروس های RNA دار زنجیره مثبت به علاوه پوشینه لیپیدی با اندازه ویریون بزرگ هستند که در راسته نیدوویرال قرار دارند. این راسته شامل دو خانواده کورونا ویریده و آرتری ویریده هستند. خانواده کورونا ویریده شامل ۴ جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا کورونا ویروس ها هستند. در حال حاضر ۶ گونه از این ویروس ها شناخته شده اند که باعث بیماری در انسان می شوند که در میان اینها HCoV-OC43، HCoV-HKU1، SARS-CoV و Middle (MERS-CoV) East respiratory syndrome coronavirus متعلق به جنس بتا کورونا ویروس ها هستند (2). دو گونه دیگر HCoV-229E و HCoV-NL63 متعلق به جنس آلفا کورونا ویروس ها هستند. ویریون کورونا ویروس ها به شکل گرد با قطر ۱۶۰-۱۰۰ نانومتر هستند. ژنوم کورونا ویروس با اندازه ۲۷-۳۲ Kb در میان RNA ویروس ها دارای بزرگترین ژنوم می باشد. کورونا ویروس ها یکی از اصلی ترین پاتوژن هایی هستند که مجاری تنفسی انسان را مورد هدف قرار می دهند و تا به امروز مسئول بیش از ۱۵ درصد از سرماخوردگی های معمول در انسان بوده اند. شیوع های قبلی این خانواده ویروسی شامل سندروم حاد تنفسی SARS-CoV و سندروم تنفسی حاد خاورمیانه (MERS)-CoV که قبلا به عنوان عواملی که سلامت عمومی را تهدید کرده بود شناخته شده بودند. در اواخر ماه دسامبر ۲۰۱۹ مجموعه ای از بیماران با پنومونی با یک عامل ناشناخته در بیمارستان بستری شدند. این بیماران از لحاظ اپیدمیولوژیکی با بازار فروش غذاهای دریایی در شهر ووهان و استان هوئی چین مرتبط بودند. اولین گزارش پیش بینی شروع پتانسیل شیوع کورونا ویروس ها مربوط به کورونا ویروس جدید ۲۰۱۹ (که به وسیله سازمان بهداشت جهانی COVID-19 نامگذاری شد در ۱۱ فوریه ۲۰۲۰ بود). این ویروس به طور قابل توجه ای بزرگتر از کورونا ویروس های دیگر بود (رنج آن از ۲/۲۴ تا ۳/۵۸ بود) (۳). وقایع شیوع COVID-19 به این شکل دنبال شد که اولین مورد آن در دسامبر ۲۰۱۹ گزارش شد از ۱۸ دسامبر ۲۰۱۹ تا ۲۹ دسامبر ۲۰۱۹ پنج بیمار با سندرم حاد تنفسی در بیمارستان بستری شدند که یکی از این بیماران فوت شدند (4). در ۲ ژانویه ۲۰۲۰، ۴۱ بیمار در بیمارستان بستری شدند که ویژگی های آزمایشگاهی آنها عفونت COVID-19 تایید کرد، نیمی از این بیماران دارای بیماری های زمینه ای مثل دیابت، فشار خون و سایر بیماری های زمینه ای بودند. در مورد این بیماران فرض بر این بود که به واسطه حضور در بیمارستان به عفونت های بیمارستانی مبتلا شده اند. نتیجه گرفتند که COVID-19 یک ویروس با شیوع فوق العاده است که به وسیله یک بیمار به

دیگران منتقل می شود اما احتمالاً سرعت پخش آن به واسطه تعدادی از بیماران در بخش های مختلف بیمارستان با مکانیسم ناشناخته است. بنابراین این احتمال بود که تعداد بیشتری با ویروس عفونی هستند. به تدریج مواردی از این بیماری در کشورهای دیگر مثل تایلند، فیلیپین، ژاپن، سنگاپور و کره جنوبی دیده شد. سکانس ژنومی COVID-19 بیش از ۸۰ درصد با SARS-CoV و ۵۰ درصد با MERS-CoV شباهت داشت اما منشأ ویروس SARS-CoV و MERS-CoV خفاش می باشد COVID-19. هفتمین عضو از خانواده کورونا ویروس است که باعث عفونت در انسان می شود و در زیر خانواده اورتوکورونا ویرینه دسته بندی می شود (5). با توجه به گستردگی شیوع بیماری ویروس COVID-19 در سراسر جهان و میزان مرگ و میر و ابتلا بسیار بالای این بیماری، محققان مختلف در سراسر جهان به دنبال بررسی قابلیت انتقال از مسیرهای مختلف از جمله از طریق آب و هوا و فاضلاب و... این بیماری در بین افراد هستند. شواهد علمی اسید ریبونوکلیک اسید-SARS-CoV (RNA) 2 در مدفوع نه تنها بیماران دارای علائم بلکه افراد بدون علائم بیماری SARS-CoV-2 نیز تشخیص داده شده و انتقال آن به فاضلاب را تایید کرده اند (۶-۹). این مشاهدات بالینی حاکی از آن است که فاضلاب شهری جوامع مبتلا ممکن است دارای ویروس باشد. اپیدمیولوژی مبتنی بر فاضلاب (WBE) یک روش امیدوار کننده برای درک شیوع ویروس ها در یک مجموعه جمعیت تصفیه خانه فاضلاب (WWTP) است، زیرا فاضلاب حاوی ویروس هایی است که از افراد علامت دار و بدون علامت در یک حوضه فاضلاب دفع می شوند (۱۰، ۱۱). WBE بویژه برای هشدار زودهنگام در مورد شیوع بیماری و آگاهی از کارایی مداخلات بهداشت عمومی مفید است، همانطور که قبلاً برای ویروسهای روده نظیر نوروویروس، ویروس هپاتیت A و پولیوویروس نشان داده شده است (۱۲، ۱۳). با توجه به عدم امکان آزمایش همزمان تمام افراد جامعه، دهها گروه تحقیقاتی در سراسر جهان در حال بررسی روش های آنالیز فاضلاب به عنوان روشی برای برآورد تعداد کل افراد آلوده به ویروس کرونای جدید هستند. به اعتقاد دانشمندان این روش ها به ویژه در صورت بازگشت کووید ۱۹ به جوامع می توانند مورد استفاده قرار گیرند. همچنین ویروس موجود در فاضلاب ممکن است به طرق مختلف به انسان منتقل شود و مجدد باعث بروز بیماری در افراد در معرض شود. یک مطالعه نشان داده است که کرونا ویروس قادر است در مدفوع به مدت ۳ روز و در آب خام فاقد کلر و فاضلاب بیمارستانی به مدت ۲ روز در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد زنده بماند. که در صورت عدم تصفیه فاضلاب، این ویروس می تواند وارد آب های سطحی و زیرزمینی شده و از آن طریق باعث ایجاد آلودگی محیط زیست و ایجاد بیماری در انسان شوند (۱۴، ۱۵).

با توجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه ای در زمینه شناسایی SARS-CoV-2 در فاضلاب شهری (شامل فاضلاب بیمارستانها، فاضلاب شهری، فاضلاب ناشی از منهول و ..) انجام نشده است بدین منظور این مطالعه با هدف شناسایی SARS-CoV-2 در فاضلاب های تولیدی شهر اردبیل انجام شد.

پیشینه تحقیق:

(۱) Ahmed و همکاران (۲۰۲۰) مطالعه ای با عنوان تعیین SARS-CoV-2 در فاضلاب تصفیه نشده استرالیا انجام دادند. در این مطالعه، SARS-CoV-2 RNA از فاضلاب یک حوضه آبریز در استرالیا تغلیظ شد و نسخه های RNA ویروس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی واکنش رونویسی معکوس (RTqPCR) شمارش شدند. از تعداد تخمین کپی RNA مشاهده شده در فاضلاب برای تخمین تعداد افراد آلوده در حوضه فاضلاب از طریق شبیه سازی مونت کارلو استفاده شد (۱۶).

(۲) Lodder و همکاران (۲۰۲۰) مطالعه ای با هدف شناسایی SARS-CoV-2 در فاضلاب انجام دادند. این مطالعه اولین گزارش در مورد وجود SARS-CoV-2 در فاضلاب انسانی بود. در این کشور، از ۱۷ فوریه ۲۰۲۰ به بعد، نمونه هایی بصورت هفتگی از فاضلاب انسانی فرودگاه شهر آمستردام هلند جمع آوری شد و نمونه ها از ۴ روز بعد از اولین مورد مثبت SARS-CoV-2 شناسایی شده در هلند مثبت شدند. چنین یافته ای بیانگر دفع ویروس از افراد دارای علائم بالقوه بیماری، افراد بدون علائم و افراد ناقل عبوری از این فرودگاه به سیستم فاضلاب می باشد. علاوه براین، حضور RNA ویروسی در فاضلاب انسانی نمونه برداری شده در محدوده سکونت افراد مبتلا به این بیماری در تیلبورگ هلند نیز مثبت بود. این یافته ها بیانگر آن است که فاضلاب میتواند یک سیستم نظارتی حساس و ابزاری برای هشدار اولیه در رابطه با ورود این ویروس به جامعه و ایجاد آلودگی باشد. انتقال مدفوعی-دهانی SARS-CoV-2 در مناطقی که سیستم بهسازی و جمع آوری فاضلاب ضعیفی دارند و ظرفیت تشخیصی آنها محدود باشد، می تواند مشکلاتی ایجاد کند. اندازه گیری این ویروس در فاضلاب می تواند ابزاری نظارتی برای ردیابی ورود و چرخش ویروس در جامعه باشد (۱۴).

(۳) مطالعه ی دیگری در سال ۲۰۲۰ با هدف "چگونه از طریق آزمایش فاضلاب میتوان میزان شیوع ویروس کرونای جدید را آشکار کرد؟" انجام شد. نتایج نشان داد که آزمایش فاضلاب در مقیاس جمعیت یک شهر یا یک محله می تواند تخمین بهتری از میزان گسترش ویروس کرونا نسبت به روش های مرسوم آزمایشگاهی فراهم کند. چرا که این آنالیز با استفاده از فاضلاب تمام جمعیت از جمله کسانی است که هنوز آزمایش نشده اند و فقط علائم خفیف دارند یا حتی بدون علائم هستند. همچنین نتایج نشان داد که مواد ژنتیکی ویروس بیماری کوید-

۱۹ (با اصطلاح RNA) در فاضلاب قابل ردیابی است. و آزمایش فاضلاب تصفیه خانه ها می تواند به عنوان روشی برای برآورد تعداد کل مبتلایان و روند تغییرات به شمار رود (۱۷).

۴) Medema و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه ای با هدف حضور SARS-Coronavirus-2 در فاضلاب هلند انجام دادند. در این مطالعه نمونه فاضلاب ۷ شهر و فرودگاه با استفاده از RT-PCR مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که تشخیص ویروس در فاضلاب، حتی اگر شیوع SARS-CoV-2 کم باشد، نشان می دهد که نظارت بر فاضلاب می تواند ابزاری حساس برای نظارت بر گردش ویروس در جمعیت باشد (۱۵).

مواد و روش کار

این تحقیق مبتنی بر نمونه برداری از فاضلاب ورودی و پساب خروجی تصفیه خانه های فاضلاب شهری و بیمارستانی و چند نمونه از منهل های فاضلاب شهری اردبیل می باشد. نمونه برداری بصورت مرکب انجام شد. نمونه ها در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام واکنش نگهداری می شوند. سپس این نمونه ها ۴ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد مایع رویی را دور ریخته و بر روی باقی مانده میکروتیوپ با استفاده از کیت High pure viral nucleic acid بر روی ۲۰۰ µl استخراج انجام داده و با استفاده از کیت سنتز cDNA اقدام به ساخت cDNA کرده و با استفاده از پرایمرهای مناسب طراحی شده برای ژن های RNA پلی مراز و N PCR Real time انجام داده شد. در موقع نمونه برداری، پرسنل نمونه برداری مجهز به تجهیزات محافظ شخصی (PPE) استاندارد طبق پروتکل بهداشتی برای نمونه برداری از فاضلاب بودند. حجم نمونه در هر بار نمونه برداری ۲۵۰ میلی لیتر در ظروف شیشه ای مخصوص در بسته بود. لازم بذکر است تمامی مراحل نمونه برداری مطابق استاندارد متد انجام شد (۱۸). نمونه ها با استفاده از روش نمونه گیری مرکب جمع آوری شد (بدین صورت که از یک نقطه مشخص در زمان های مختلف نمونه برداری کرده و با هم ترکیب نمودیم). نمونه ها بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد و نمونه ها در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام آنالیز نگهداری می شوند. در مطالعه حاضر ۹ نمونه از تصفیه خانه های فاضلاب اردبیل و ۱۴ نمونه (از هر بیمارستان یک نمونه فاضلاب) از فاضلاب بیمارستانی بیمارستاهای مختلف اردبیل و ۴۴ نمونه از شبکه های جمع اوری فاضلاب اردبیل نمونه برداشت گردید. که جمعا ۶۷ نمونه از فاضلاب اردبیل جهت تعیین حضور کروناویروس در فاضلاب نمونه برداری انجام شد.

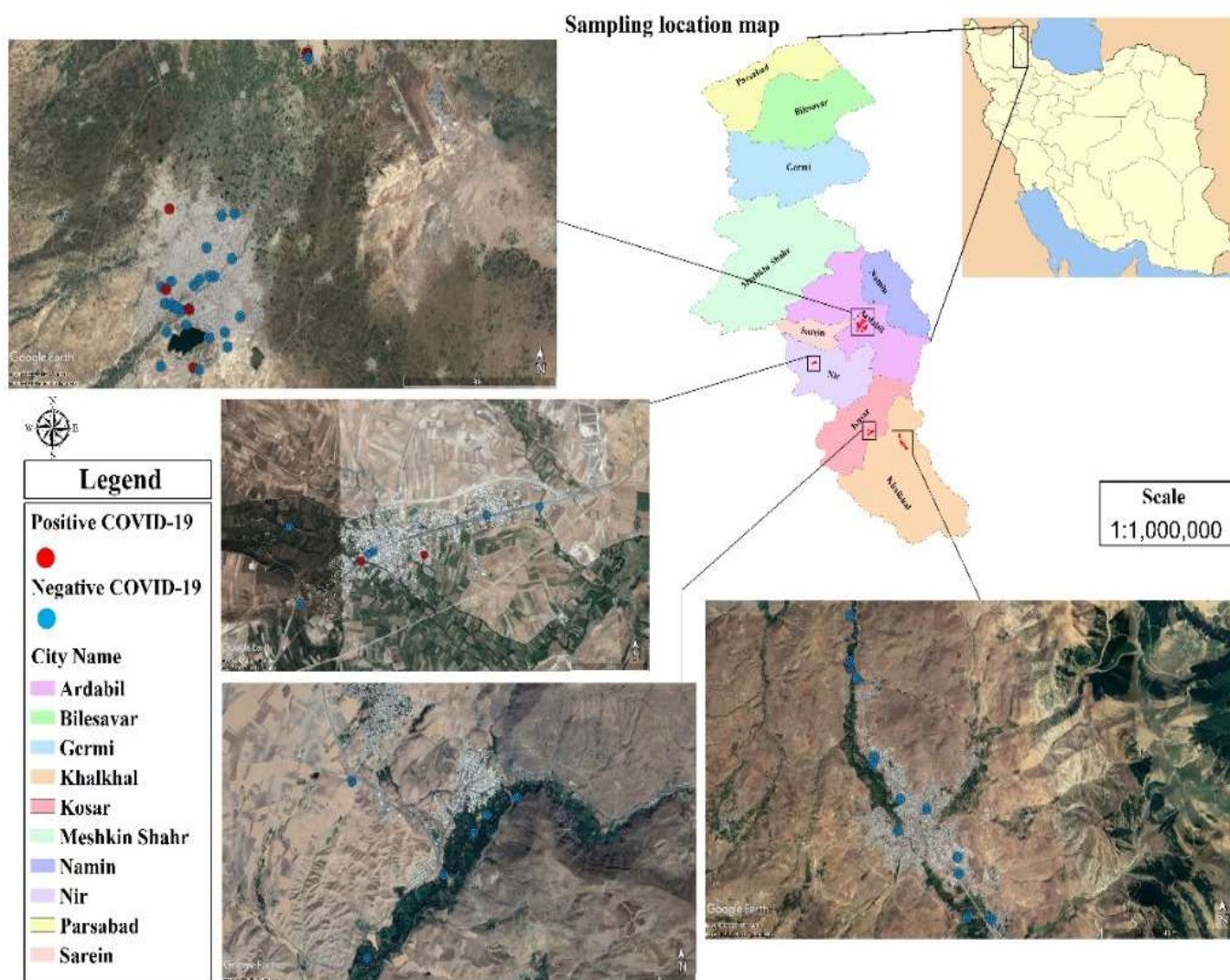
برای تغلیظ نمونه های جدا شده از فاضلاب ۱۰۰ - ۲۰۰ میلی لیتر از نمونه را در ۴۷۵۰ g برای ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی را با دقت برداشته بدون اینکه حالت سکون مواد را بر هم بزنیم و مجدد در

۳۵۰۰ g برای ۱۵ دقیقه از طریق فیلتر گریز از مرکز همراه با cut-off of 10 kDa سانتریفیوژ نمودیم. ظرف های مخصوص تغلیظ را به صورت وارونه در بالای کاپ فیلتر نمونه قرار دادیم و برای ۲ دقیقه در ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ نمودیم. ۲۵۰ μ L از نمونه تغلیظ از collection cup با پپت جمع اوری کرده و مستقیم با استفاده از کیت استخراج RNA اقدام به استخراج نمونه کردیم. نمونه ۲۴ ساعته فاضلاب خام از فاضلاب گرفته شد و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه برای غیرفعال کردن ویروس پاستوریزه می شود. پس از آن فاضلاب از طریق غشای ۰٫۲ میلی متر (Millipore Sigma) فیلتر شد تا سلولهای باکتریایی و بقایای آن حذف شود زیرا آزمایشات اولیه نشان داد که ویروس بیشتری وجود دارد. از این نمونه ها سپس RNA استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای مناسب برای ژن های E و RDRP و با روش RT-Q pcr اقدام به شناسایی RNA ویروس در نمونه های فاضلاب نمودیم.

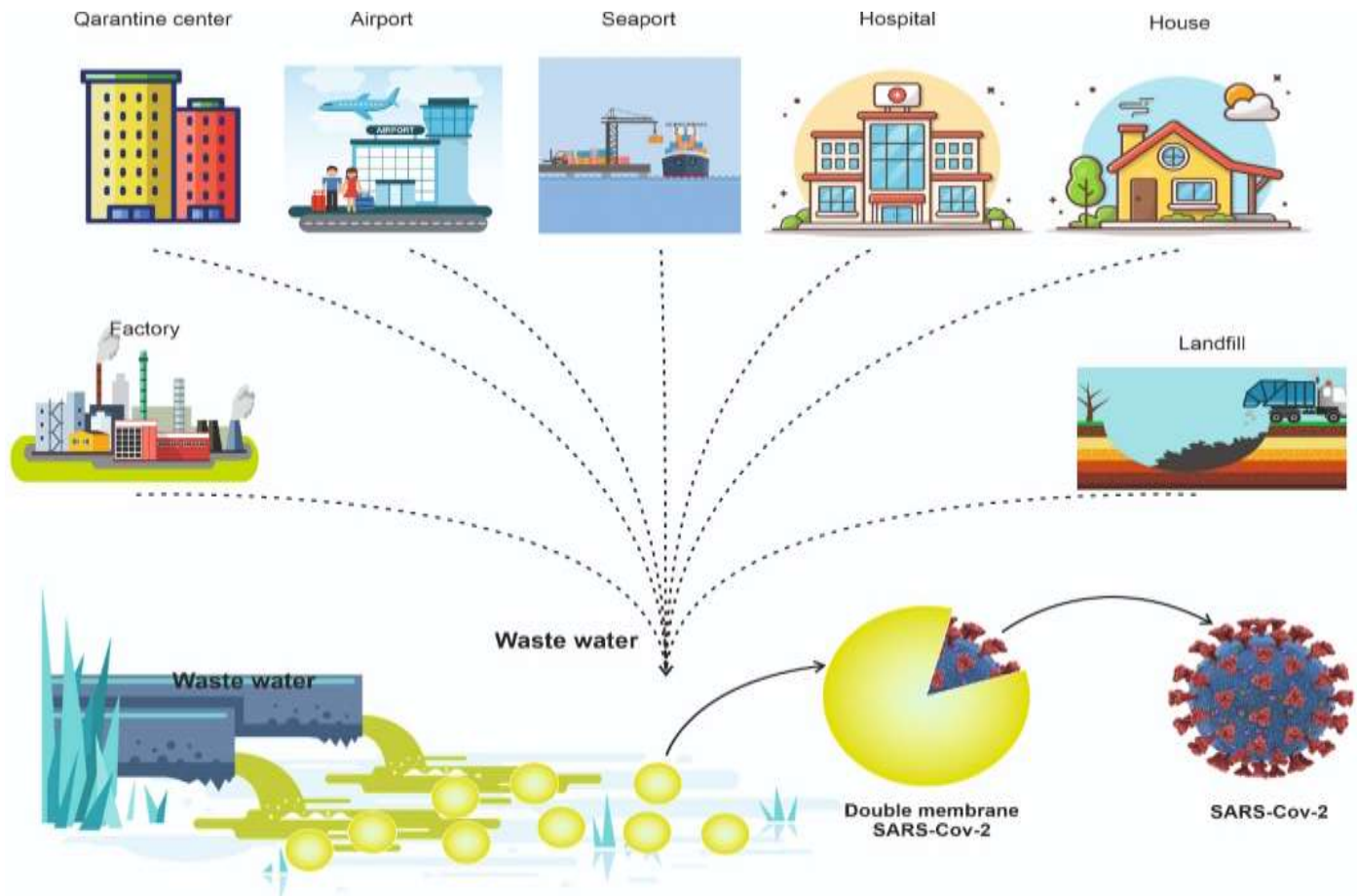
نتایج

قبل از شروع نمونه برداری در ابتدا نامه نگاری به سازمان آب و فاضلاب شهری و آب منطقه ای استان اردبیل جهت هماهنگی برای نمونه برداری از شبکه جمع آوری فاضلاب و تصفیه خانه های فاضلاب اردبیل انجام شد. همچنین نامه نگاری به ریاست بیمارستان های اردبیل جهت هماهنگی برای نمونه برداری از فاضلاب بیمارستان های اردبیل انجام شد. با توجه به اینکه فاز اول گزارش طرح مربوط به مطالعات کتابخانه ای و جمع آوری نمونه ها می باشد لذا در این بخش عکس های مربوط به نمونه برداری از مکان های مختلف نمونه برداری ارائه شده است. لذا قابل ذکر است موقع نمونه برداری از تصفیه خانه فاضلاب اجازه عکس برداری داده نشد. نقشه محل های نمونه برداری در این مطالعه در شکل ۱ ارائه شده است. مکانیسم مولکولی SARS-COV-2 پایدار در تصفیه خانه فاضلاب در شکل ۲ ارائه شده است. مطابق شکل ۲، در شرایط معمول ویروس های پوشش دار روده ای در مقابل اسیدهای صفراوی و معده ای به سرعت تخریب می شوند و انهایی که قابلیت ماندگاری در شرایط سخت مثل مدفوع و فاضلاب را دارند غالباً بدون پوشش هستند اما کرونا ویروس ها در این مورد استثنا هستند آنها با تشکیل یک double membrane vesicol قابلیت ماندگاری در شرایط سخت مثل ماندگاری در فاضلاب را دارند این ویروس حتی با وجود تخریب این ساختار باز هم قادر به ایجاد همانندسازی هستند جالب اینجاست که این قابلیت در بتا کرونا ویروس های قبلی مشاهده نشده است شاید کسب این ویژگی یک advantage برای ماندگاری در شرایط سخت باشد.

پرایمر و پراب های مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است. همچنین نتایج مربوط به شناسایی ویروس کووید ۱۹ در تصفیه خانه های فاضلاب اردبیل، فاضلاب بیمارستانی و شبکه های جمع اوری فاضلاب شهر اردبیل در جداول ۲ تا ۴ ارائه شده است. با توجه به نتایج ارائه شده حضور کرونا ویروس در پساب خروجی فاضلاب اردبیل مثبت بدست آمد که نشان دهنده عدم کلرزنی کافی فاضلاب در بخش کلرزنی می باشد. با توجه به بازدید به عمل آمده عدم کارایی بخش کلرزنی تایید گردید. و پیشنهاد گردید که اقدامات لازم جهت بهبود فرایند کلرزنی به عمل آید.



شکل ۱: نقشه محل های نمونه برداری در این مطالعه



شکل ۲- مکانیسم مولکولی SARS-COV-۲ پایدار در تصفیه خانه فاضلاب

نمونه هایی از عکس های نمونه برداری از فاضلاب شهری اردبیل



























جدول ۱: پرایمر و پراب های مورد استفاده در این مطالعه

Organisms	Target gene	Sequence (5'-3')	Cycling parameters
SARS-CoV-2	Probe & Primer ORF1a/b	FACAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ F-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG R-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	55°C 10' 94°C 3' 94°C 15'' 58°C 30'' 45x.
	Primer & Probe N gene	F-AAATTTTGGGGACCAGGAAC R-TGGCAGCTGTGTAGGTCAA PFAM-ATGTCGCGCATTTGGCATGGA-BHQ	55°C 10' 94°C 3' 94°C 15'' 58°C 30'' 45x.

جدول ۲- شناسایی ویروس کووید ۱۹ در تصفیه خانه های فاضلاب اردبیل

wastewater treatment plant		Corona virus status			
		White	Red		
		Results	Results	Ct- ORF1ab gene	Ct- N gene
Ardabil and Nir	Inlet wastewater	Negative	Positive	35.12	32.21
	Aeration basin	Negative	Positive	36.31	32.68
	Secondary sedimentation basin 1 (before chlorination)	Negative	Positive	35.95	33.5
	Secondary sedimentation basin 2 (before chlorination)	Negative	Positive	35.72	32.3
	Outlet wastewater (after chlorination)	Negative	Positive	37.8	34.01
Khalkhal and Givi	Inlet wastewater	Negative	Positive	36.31	33.17
	Secondary sedimentation basin	Negative	Positive	35.46	31.61
	Sludge drained into the bed	Negative	Positive	36.73	32.48
	Outlet wastewater (after chlorination)	Negative	Positive	34.66	30.57

جدول ۳- شناسایی ویروس کووید ۱۹ در فاضلاب بیمارستانی اردبیل

City	Hospitals	Results	Ct- ORF1ab gene	Ct- N gene
Ardabil and Nir	Imam Khomeini (Corona wards)	Positive	38.45	33.68
	Imam Khomeini (Public wards)	Negative	-	-
	Imam Reza	Negative	-	-
	Ghaem	Negative	-	-
	Alavi	Negative	-	-
	Bouali	Negative	-	-
	Fatemi	Negative	-	-
	Isar	Negative	-	-
	Sabalan	Negative	-	-
	Ardabil City Health Center	Positive	38.19	34.4
	Nir City Health Center	Negative	-	-
Khalkhal and Givi	Imam Khomeini Khalkhal	Negative	-	-
	Imam Khomeini Givi (Infectious wards)	Negative	-	-
	Imam Khomeini Givi (Public wards)	Negative	-	-

جدول ۴- شناسایی ویروس کووید ۱۹ در شبکه هاب جمع آوری فاضلاب اردبیل

City	Sample code	Results	Ct- ORF1ab	Ct- N gene	City	Sample code	Results	Ct- ORF1a	Ct- N gene
Ardabil	1	Negative	-	-	Nir	3	Negative	-	-
	2	Negative	-	-		4	Negative	-	-
	3	Negative	-	-		5	Negative	-	-
	4	Positive	38.51	36.71		6	Negative	-	-
	5	Negative	-	-	Khalkhal	7	Negative	-	-
	6	Negative	-	-		8	Positive	37.69	33.4
	7	Negative	-	-		1	Negative	-	-
	8	Negative	-	-		2	Negative	-	-
	9	Negative	-	-		3	Negative	-	-
	10	Negative	-	-		4	Negative	-	-
	11	Positive	39.47	36.57		5	Negative	-	-
	12	Negative	-	-		6	Negative	-	-
	13	Negative	-	-		7	Negative	-	-
	14	Negative	-	-		8	Negative	-	-
	15	Negative	-	-		9	Negative	-	-
	16	Negative	-	-		10	Negative	-	-
	17	Negative	-	-	Givi	1	Negative	-	-
	18	Negative	-	-		2	Negative	-	-
	19	Negative	-	-		3	Negative	-	-
	20	Negative	-	-		4	Negative	-	-
Nir	1	Negative	-	-		5	Negative	-	-
	2	Positive	37.85	36.26		6	Negative	-	-

بحث و نتیجه گیری

جدول ۲ مشخصات تمام نمونه های SARS-CoV-2 جمع آوری شده در تصفیه خانه های فاضلاب را نشان می دهد. نمونه های SARS-CoV-2 جمع آوری شده در تصفیه خانه فاضلاب در دو شرایط مختلف سفید و قرمز از نظر کروناویروس مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲، زمانی که شرایط منطقه از نظر کروناویروس سفید بود، نتایج همه نمونه های مورد بررسی از قسمت های مختلف تصفیه خانه فاضلاب منفی بدست آمد و در مورد وضعیت هشدار (شرایط قرمز)، نتایج نمونه ها نیز مثبت بودند. نتایج بدست آمده از فاضلاب بیمارستان ها در جدول ۲ خلاصه شده است. در مجموع ۱۵ نمونه آلوده SARS-CoV-2 از فاضلاب بیمارستانهای استان اردبیل (اردبیل، نیر، خلخال و کوثر) جمع آوری شد (جدول ۳). نمونه های گرفته شده از فاضلاب بیمارستان در شرایط سفید از نظر کروناویروس مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج ارائه شده، دو نمونه مورد مطالعه (بخش های کرونای امام خمینی (ره) و مرکز بهداشت شهرستان اردبیل) در فاضلاب بیمارستان از نظر وجود ویروس کرونا مثبت بودند. نتایج بدست آمده از شناسایی ویروس SARS-CoV-2 در شبکه جمع آوری فاضلاب در جدول ۴ خلاصه شده است. در مجموع ۴ نمونه آلودگی SARS-CoV-2 از شبکه جمع آوری فاضلاب استان اردبیل (اردبیل، نیر، خلخال، و کوثر) بدست آمد (جدول ۴). در واقع، نمونه های جمع آوری شده از شبکه جمع آوری فاضلاب در شرایط سفید از نظر کرونا ویروس مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج ارائه شده، کلیه نمونه های مورد مطالعه در شبکه جمع آوری فاضلاب استان اردبیل (شهرهای اردبیل، نیر، خلخال و کوثر) (به جز ۴ مورد) از نظر وجود کرونا ویروس منفی اعلام شد.

هنگامی که شیوع کرونا ویروس در جامعه کم است، اگر نمونه ویروس در فاضلاب جامعه مثبت شود، بررسی آلودگی فاضلاب به ویروس می تواند وسیله ای برای نظارت بر گسترش ویروس در جامعه باشد. علیرغم این واقعیت که RT-PCR SARS-CoV-2 را در تعداد زیادی از نمونه های مدفوع تشخیص می دهد، تنها دو تحقیق وجود دارد که کشت ویروسی عفونی را از مدفوع ثبت کرده اند. در نتیجه، به نظر نمی رسد که فاضلاب راه اصلی انتقال SARS-CoV-2 باشد. این یافته ها پیامدهای قابل توجهی برای تعیین چگونگی کمک WBE به شناسایی بیماریها در بین جوامع و پیش بینی بروز جامعه بدون نیاز به آزمایشات جداگانه و همچنین آموزش مقامات بهداشت عمومی در مورد اثربخشی درمان ها دارد. با توجه به سوابق موجود، به نظر می رسد SARS-CoV-2 از ثبات ضعیفی در محیط برخوردار باشد. این ویروس ها را می توان با استفاده از روش های سنتی تصفیه فاضلاب غیرفعال یا حذف کرد. از سوی دیگر، RNA ویروسی هنوز می تواند در فاضلاب تصفیه شده وجود داشته باشد.

با توجه به شکل ۲، SARS-CoV-2 از طریق مدفوع خارج شده و وارد محیط می شود. یافتن ویروس های پوششی روده ای در نمونه های محیطی بسیار جالب است. اکثر ویروس های پوشیده، عفونت را در دستگاه گوارش ایجاد نمی کنند، زیرا پوشش های ویروسی مستعد تجزیه توسط مواد شوینده مانند نمک های صفاوی هستند. کروناویروس های روده ای از استثنائات قابل توجه هستند، اما مشخص نیست که چرا این ویروس های پوشیده می توانند شرایط سخت در دستگاه گوارش را تحمل کنند. RNA مربوط به کروناویروس های مرتبط با غشاهای میزبان اصلاح شده مانند وزیکول های دو غشایی (DMVs) که از غشاهای مسیر ترشحی مشتق شده اند، سنتز کرده و ممکن است نقش مهمی در مقاومت ویروس کرونا در شرایط محیطی سخت مانند فاضلاب ایفاء کند. باکتریوفازها دارای ویژگی های بیولوژیکی منحصر به فردی با ویروس های روده ای هستند و به عنوان جایگزین کمک می کنند. دما یکی از عوامل مهمی است که ماندگاری ویروس را در محیط کنترل می کند. مطالعات *in vitro* بر روی SARS-CoV-1 در نمونه مدفوع و ادرار، بیمارستان و شبکه فاضلاب خانگی و آب لوله کشی، ماندگاری ویروس را در دمای متوسط (۴ درجه سانتی گراد) پایین تر نشان داد. SARS-CoV-1 به مدت ۲ روز در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد، در حالی که به مدت ۱۴ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد ماندگاری دارد. نمونه های ادرار ماندگاری طولانی مدت (۱۷ روز) را در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نشان دادند. به نظر می رسد کارخانه های تکثیر برای کرونا ویروس SARS-CoV-2 زودتر از ویروس های روده ای انسان بدون پوشش که با انتقال از طریق آب ارتباط دارند، در آب غیرفعال شده اند. در مطالعات نشان داده شده است که دما عامل اصلی در بقای ویروس است. در حالی که SARS-CoV-2 دو روز در فاضلاب پزشکی و خانگی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و ۱۴ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد زنده می ماند. بر اساس یافته های این تحقیق، تمام قسمت های مختلف تصفیه خانه فاضلاب اردبیل و خلخال در شرایط قرمز، مثبت بود. خروجی های اصلی هر دو شهر مثبت بود، که نشان می دهد پیگیری کرونا ویروس از طریق فاضلاب یکی از بهترین و اقتصادی ترین روش ها برای تشخیص این نوع ویروس است.

بطور کلی نتایج نشان داد که آزمایش SARS-CoV-2 در فاضلاب امکان پذیر است. این نتایج می تواند به تصمیم گیرندگان کمک کند تا در مورد اقدامات اصلی پیشگیری مانند فاصله گذاری اجتماعی و تلاش های قرنطینه بر اساس برآورد میزان شیوع SARS-CoV-2 در فاضلاب تصمیم گیری کنند. نتایج نشان داد که از کل نمونه ها، ۱۵ نمونه (۲۲/۳۸ درصد) برای SARS-CoV-2 مثبت بودند. اپیدمیولوژی مبتنی بر فاضلاب روشی مناسب برای تشخیص شیوع ویروس ها در بین مردم بر اساس تصفیه خانه های فاضلاب است، زیرا فاضلاب حاوی ویروس های از افراد با و بدون علائمی است که وارد تصفیه خانه فاضلاب می شوند.

لازم بذکر است که تعداد مشخصی نمونه از منابع آب (آبهای سطحی، زیرزمینی و چاهها و چشمه ها) جهت شناسایی کروناویروس نمونه برداری گردید. نتایج نشان داد که در تمامی نمونه های منابع آب استان اردبیل، کروناویروس شناسایی نگردید.

پیشنهادهات

پیشنهاد می شود که مطالعاتی در زمینه تأثیر گندزدهای مختلف و فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته (استفاده از اشعه UV) جهت حذف کرونا ویروس انجام گیرد.

منابع

۱. Hemalatha M, Kiran U, Kuncha SK, Kopperi H, Gokulan C, Mohan SV, et al. Surveillance of SARS-CoV-2 spread using wastewater-based epidemiology: Comprehensive study. Science of The Total Environment. 1920:144704.
۲. King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Elsevier; 2011.
۳. Zhao S, Lin Q, Ran J, Musa SS, Yang G, Wang W, et al. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, from 2019 to 2020: A data-driven analysis in the early phase of the outbreak. International journal of infectious diseases. 2020;92:214-7.
۴. Du Toit A. Outbreak of a novel coronavirus. Nature Reviews Microbiology. 2020;18(3):123.-
۵. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine. 2020.
۶. Gao QY, Chen YX, Fang JY. 2019 novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. Journal of digestive diseases. 2020;21(3):125-6.
۷. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. New England Journal of Medicine. 2020.
۸. Cai J, Xu J, Lin D, Xu L, Qu Z, Zhang Y, et al. A Case Series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. Clinical Infectious Diseases. 2020.
۹. Wu F, Xiao A, Zhang J, Gu X, Lee WL, Kauffman K, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. medRxiv. 2020.
۱۰. Sinclair RG, Choi CY, Riley MR, Gerba CP. Pathogen surveillance through monitoring of sewer systems. Advances in applied microbiology. 2008;65:249.
۱۱. Xagorarakis I, O'Brien E. Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks. Women in Water Quality: Springer; 2020. p. 75-97.
۱۲. Hellmér M, Paxéus N, Magnusius L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, et al. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. Applied and environmental microbiology. 2014;80(21):6771-81.
۱۳. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, El Bassioni L, et al. Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. The Journal of infectious diseases. 2014;210(suppl_1):S294-S303.
۱۴. Lodder W, de Roda Husman AM. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. 2020;5(6):533-4.

- .^{۱۵} Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. medRxiv. Preprint here. 2020.
- .^{۱۶} 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. Science of The Total Environment. 2020;138764.
- .^{۱۷} Mallapaty S. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. Nature. 2020;580(7802):176-7.
- .^{۱۸} Association APH ,Association AWW, Federation WPC, Federation WE. Standard methods for the examination of water and wastewater: American Public Health Association.; 1915.

پیوست ها

با سلام مقاله چاپ شده در مجله نمایه ISI و Q1 و با ایمپکت فاکتور ۴,۵ به پیوست می باشد.

Environmental Science and Pollution Research

<https://doi.org/10.1007/s11356-021-15374-4>

NOVEL CORONA VIRUS (COVID-19) IN ENVIRONMENTAL ENGINEERING PERSPECTIVE



SARS-CoV-2 in municipal wastewater treatment plant, collection network, and hospital wastewater

Chiman Karami^{1,2} · Abdollah Dargahi³ · Mehdi Vosoughi^{3,4} · Ali Normohammadi⁴ · Farhad Jeddi⁵ · Vahid Asghariazar⁶ · Ahamad Mokhtari⁴ · Anoshirvan Sedigh⁴ · Hamed Zandian³ · Morteza Alighadri⁴

Received: 11 May 2021 / Accepted: 6 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The current outbreak of coronavirus disease (COVID-19) has led to creating a public health emergency conditions since 2019. COVID-19, which is caused by SARS-CoV-2, is spread via human-to-human transmission by direct contact or droplets. Through conducting this study, we were looking for detecting SARS-CoV-2 in wastewater produced in Iran country (Ardabil, Nir, Khalkhal, and Kowsar) (wastewater collection network, wastewater treatment plant, and hospital wastewater). In this research, samples ($n=76$) were collected from influent and effluent of municipal and hospital wastewater treatment plants, and some samples were also collected from Ardabil municipal wastewater manholes. The sampling duration included the white (lower risk of COVID-19) and red (high risk of COVID-19) conditions. Samples were stored at -20°C for further diagnostic tests. The specific primer and probe real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real-time PCR) targeting ORF1ab and N genes (nucleoprotein gene) were applied to detect viral genomes of the SARS-CoV-2 virus in the wastewater samples. Out of 76 samples, a total of 15 samples (19.73%) collected from wastewater in Ardabil province (Ardabil, Nir, Khalkhal, and Kowsar), were positive in terms of SARS-CoV-2. Wastewater epidemiology can facilitate detection of the incidence of pathogens through metropolises, measurement of population prevalence without direct testing, and provision of information to the public health system about the efficiency of intervening efforts.

Keywords SARS-CoV-2 · Municipal wastewater · Coronavirus · Wastewater treatment plant · Collection network · Hospital wastewater

Highlights

- Double-membrane vesicles may play a role in SARS-CoV-2 resistance in harsh conditions.
- 19.7 % of wastewater samples were positive for coronavirus.
- When the area was a white condition for coronavirus, the results of all the samples examined from different parts of the wastewater treatment plant were negative.