

Investigation of Coronavirus RNA in Hospital Wastewater and Municipal Wastewater Treatment Plants in Ardabil Province

Dargahi A^{1,2}, Vosoughi M^{2,3}, Gholizadeh H², Karami Ch⁴, Sadeghi H*³, Normohammadi A³, Jeddi F⁵

1. Department of Environmental Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
2. Social Determinants of Health Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3. Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
4. Department of Microbiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
5. Department of Genetics and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +989141559018, Fax: +984533513775, E-mail: hsadeghi1079@gmail.com

Received: Jun 04, 2023 Accepted: Jan 13, 2024

ABSTRACT

Background & objectives: Since 2019, the spread of the coronavirus has caused an epidemic worldwide, and the transmission of the disease through respiratory droplets has been declared as the primary method of transmission in 2020. However, in this study, the indirect transmission of the virus through sewage has been investigated.

Methodology: Wastewater related to hospital and urban wastewater treatment plants in 5 regions of Ardabil province (northwest of Iran) were investigated. A total of 22 samples were kept in pre-test conditions (temperature -20 degrees Celsius) and were used to identify the viral genome. Specific primer and chain reaction probes targeting ORF1ab and N (nucleoprotein gene) genes were used.

Results: In this research, out of all the samples collected, the result of 3 samples was positive. All three positive samples are related to incoming sewage.

Conclusion: The results of this research showed that sewage epidemiology (WBE) can be considered a cost-effective method for diagnosing and predicting pathogenic agents and an effective method for making decisions to protect citizens' health.

Keywords: SARS-CoV-2; Hospital Wastewater; Municipal Wastewater; Coronavirus; Wastewater Treatment Plant; Collection Network

بررسی RNA کروناویروس در فاضلاب بیمارستانی و تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری استان اردبیل

عبداله درگاهی^{۱*}، مهدی وثوقی^۲، هلیا قلیزاده^۲، چیمین کرمی^۳، هادی صادقی^{۳*}، علی نورمحمدی^۳،
فرهاد جدی^۵

۱. گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

۲. مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

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

۴. گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۵. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۱۵۵۹۰۱۸ فکس: ۰۴۵۳۳۵۱۳۷۷۵ ایمیل: hsadeghi1079@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: از سال ۲۰۱۹ شیوع کرونا ویروس باعث یک اپیدمی در سراسر جهان شد و انتقال بیماری از طریق قطرات تنفسی به عنوان راه اصلی انتقال در سال ۲۰۲۰ اعلام شد. لذا در این مطالعه انتقال غیرمستقیم ویروس از طریق فاضلاب مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: پساب‌های مربوط به تصفیه‌خانه‌های فاضلاب بیمارستانی و شهری در ۵ منطقه استان اردبیل (شمال غرب ایران) مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۲۲ نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند و برای شناسایی ژنوم ویروس از پرایمر ویژه و پروب واکنش زنجیره ای که ژن‌های ORF1ab و N (ژن نوکلئوپروتئین) را هدف قرار می‌دهند، استفاده شد.

یافته‌ها: در این تحقیق از مجموع نمونه‌های برداشت شده نتیجه سه نمونه مثبت بود و هر سه نمونه مثبت مربوط به فاضلاب ورودی بودند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اپیدمیولوژی فاضلاب (WBE) می‌تواند به عنوان یک روش مقرون به صرفه در تشخیص و پیش بینی عوامل بیماری‌زا در نظر گرفته شود و روشی موثر برای تصمیم‌گیری در جهت حفظ سلامت شهروندان تلقی گردد.

واژه‌های کلیدی: SARS-CoV-2، فاضلاب بیمارستانی، فاضلاب شهری، کرونا ویروس، تصفیه‌خانه فاضلاب، شبکه جمع‌آوری فاضلاب

دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۳

مقدمه

بهداشت بسیار حائز اهمیت است. برخی از ویروس‌ها می‌توانند با علائم حاد بروز پیدا کنند و منجر به مرگ و میر شوند از طرفی بسیاری از ویروس‌ها هم بدون علائم قابل توجهی در بدن انسان وجود دارند (۱،۲).

شیوع ویروس کرونا و اهمیت بررسی وجود این عامل ویروسی در محیط اطراف، در دوران پاندمی و پساپاندمی جهت اتخاذ تصمیمات مدیریتی در حوزه

همچنین بررسی وجود عوامل ویروسی در محیط اطراف می‌تواند در پیشگیری از شیوع انواع بیماری‌ها مثل کرونا موثر باشد. برای مثال بررسی و کنترل کیفیت آب، هوا و غذاهای مصرفی می‌تواند در پیشگیری از شیوع بسیاری از بیماری‌ها مفید باشد (۳). در طول تاریخ برخی از بیماری‌هایی مانند فلج اطفال و کووید-۱۹ (کرونا) در سال‌های اخیر، باعث تلفات و مرگ‌های بسیاری شده‌اند. با این حال، با توجه به پیشرفت علمی و پزشکی روش‌هایی برای پیشگیری، تشخیص و درمان این بیماری‌ها در دسترس قرار گرفته‌اند (۴،۵). در نهایت بهترین راه برای پیشگیری از شیوع بیماری‌های واگیردار رعایت بهداشت شخصی، اجتناب از تماس با افراد بیمار و همچنین رعایت فاصله اجتماعی و استفاده از ماسک است (۶،۷). با شیوع کروناویروس‌ها، علائم بالینی مختلفی ثبت شده است که از جمله این علائم می‌توان به سرفه، عطسه، سرگیجه، درد گلو، تنگی نفس و در برخی موارد عفونت ریه همراه با علائم تب و سردرد اشاره کرد. همچنین برخی بیماران درد عضلانی و خستگی شدید نیز داشته‌اند البته علائم گوارشی مانند اسهال، تهوع و استفراغ نیز در برخی موارد گزارش شده است. به‌طور کلی به علت ویژگی‌های مختلف هر فرد، علائم کووید-۱۹ می‌تواند بین افراد مختلف متفاوت باشد (۸-۱۰). نگرانی از مصرف آب آلوده به عوامل بیماری‌زا با وجود اپیدمی‌های مختلف در طول تاریخ همواره وجود داشته است. منابع آب می‌توانند توسط عوامل مختلفی مانند فرآیندهای نامناسب جمع‌آوری فاضلاب، فعالیت‌های غیرمجاز، عدم نظارت بر عملکرد سیستم‌های جمع‌آوری فاضلاب، پساب‌های بیمارستانی و سایر عوامل آلوده شوند. اگر آب آلوده به عنوان منبع آب مصرفی استفاده شود می‌تواند سلامت عمومی شهروندان و حتی افراد شاغل در مجموعه‌های تصفیه‌خانه را به خطر بیندازد (۱۱،۱۲). در این رابطه استفاده از واحدهای تصفیه آب و فاضلاب می‌تواند در پیشگیری از شیوع بیماری‌های

منتقله با آب موثر باشد. با تصفیه آب و فاضلاب، بیشتر عوامل آلودگی از آب حذف می‌شوند و آب فاضلاب تصفیه شده می‌تواند به عنوان منبع آب مصرفی استفاده شود. همچنین رعایت بهداشت در فرآیند جمع‌آوری، حمل و نگهداری و تصفیه آب و فاضلاب نیز بسیار مهم است (۱۳،۱۴). در مطالعات مختلف به وجود SARS-CoV-2 و RNA در فاضلاب‌های تخلیه شده اشاره شده است که لزوم توجه به سیستم‌های بهداشتی را نشان می‌دهد (۱۵،۱۶). اگرچه قطرات و ذرات معلق هوا در هوای تنفسی فرد بیمار به عنوان راه اصلی انتقال توسط سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۲۰ معرفی شده است با این حال توجه به منابع آب نیز به عنوان یکی از عوامل مهم در شناسایی و پیشگیری از انتقال عامل بیماری‌زا نیز معرفی شده‌اند (۱۵،۱۶). در مطالعات اخیر، نتایج نشان داده‌اند که RNA منتسب به SARS-CoV-2 در نمونه‌های مدفوع افراد بیمار و افراد ناقل بیماری کووید-۱۹ وجود دارد. این نتایج نشان می‌دهند که ویروس ممکن است از طریق مدفوع نیز به افراد دیگر منتقل شود. با توجه به این مطالعات لازم است که در فرآیند جمع‌آوری، حمل و دفع فاضلاب و همچنین در فرآیند تمیز کردن و ضدعفونی سطوح، نکات بهداشتی رعایت شود (۱۷-۱۹). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بررسی وضعیت شیوع ویروس‌ها در پساب‌ها می‌تواند به عنوان یک روش جدید در اپیدمیولوژی مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از این روش می‌توان با بررسی وجود RNA ویروس‌ها در پساب‌های تخلیه شده، وضعیت شیوع ویروس‌ها در جامعه را پیش از شناسایی بیماران مبتلا به بیماری تشخیص داد. این روش می‌تواند به عنوان یک روش سریع و کم هزینه برای بررسی وضعیت شیوع ویروس‌ها در جامعه استفاده شود و می‌تواند به عنوان یک ابزار موثر برای صدور هشدار و اتخاذ تدابیر احتیاطی در جامعه مورد استفاده قرار گیرد. همین‌طور با استفاده از این روش می‌توان

جمع‌آوری، ذخیره سازی و انتقال نمونه

در این تحقیق از فاضلاب بیمارستانی و تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری، شهرستان‌های استان اردبیل، از جمله اصلاندوز، سرعین، مشگین شهر، گرمی، بیله سوار، پارس‌آباد و نمین، نمونه گرفته شد. استان اردبیل در شمال غربی ایران قرار دارد و به عنوان یکی از استان‌های دارای شرایط بحرانی از نظر شیوع ویروس کرونا می‌باشد.

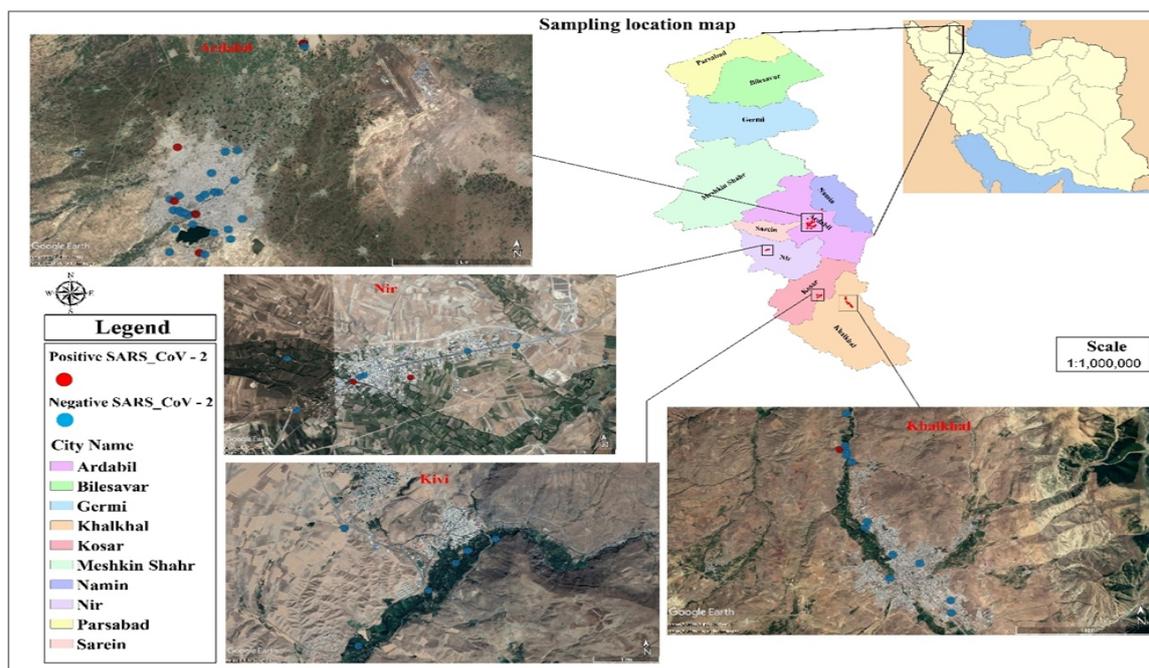
نمونه‌برداری از مناطق مورد نظر مطابق شکل ۱ بوده است و نمونه‌بردارها بر اساس پروتکل‌های بهداشتی نسبت به جمع‌آوری نمونه اقدام نموده و از تجهیزات حفاظت فردی بهداشتی و ایمنی استفاده نموده‌اند (۲۲). حجم هر نمونه جمع‌آوری شده ۲۵۰ میلی لیتر بود که شرایط نمونه‌برداری و نگهداری هر نمونه طبق تکنیک استاندارد انجام شد. در تعیین تعداد نمونه به عوامل متعددی توجه شد که از جمله آن می‌توان به تعداد بیمارستان‌ها و تصفیه‌خانه‌های موجود، بررسی مطالعات مشابه و مدل سازی از این مطالعات اشاره کرد و بر اساس این عوامل در نهایت ۲۲ نمونه از مناطق مذکور برداشت شد. نمونه برداری از یک نقطه مشخص در زمان‌های مختلف از ساعت ۱۰ صبح تا ۱۴ بعد از ظهر صورت گرفت و با ترکیب آنها (نمونه گیری ترکیبی) انجام شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند تا فعالیت باکتری‌ها غیرفعال شود تا نمونه‌ها در زمان مناسب تجزیه و تحلیل شوند. نمونه ۲۴ ساعته فاضلاب خام از فاضلاب گرفته شد و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه پاستوریزه شد تا ویروس طبق پروتکل بهداشتی نمونه برداری از فاضلاب غیرفعال شود.

به سرعت تغییرات شیوع ویروس‌ها در جامعه را پیگیری کرد و برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماری را به‌روزرسانی کرد (۲۳-۲۰).

با توجه به گسترش زیاد این بیماری در سراسر جهان، ایران نیز مستثنی نبود و افراد زیادی به این بیماری مبتلا شدند به طوری که در مقطعی از زمان ایران رتبه اول جهان را از نظر میزان ابتلا به خود اختصاص داد و از طرفی بررسی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آزمایشات به دست آمده از پساب، از دیدگاه محققین مختلف بسیار حائز اهمیت است و آمار نشان داد که حضور حداکثر ۳ روزه این ویروس‌ها در فاضلاب تصفیه‌نشده می‌تواند اثرات مختلفی داشته باشد و با نفوذ به آب‌های سطحی و زیرزمینی سلامت انسان را تهدید کند (۲۵، ۲۴، ۷). مطالعات مختلف در این زمینه در کشورهای اروپایی، استرالیا، آمریکا و... انجام شده است (۲۵، ۲۴، ۱۷). لذا در این تحقیق SARS-CoV-2 در تصفیه‌خانه‌های فاضلاب بیمارستانی شهرهای سرعین، مشگین شهر، گرمی، بیله سوار و پارس‌آباد مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

این مطالعه از نوع توصیفی-مقطعی می‌باشد. با توجه به اینکه این استان اردبیل دارای جمعیتی بالغ بر یک میلیون و ۳۰۰ هزار نفر است و دارای ۱۰ شهرستان و ۱۸ بیمارستان (۱۳ بیمارستان دولتی و ۵ بیمارستان خصوصی) می‌باشد، بررسی شیوع ویروس SARS-CoV-2 در فاضلاب بیمارستانی و تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری در این منطقه می‌تواند به عنوان یک ابزار موثر در جهت کنترل و پیشگیری از شیوع بیماری کووید-۱۹ در جامعه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک مرجع ارزشمند برای برنامه‌ریزی و اجرای برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماری در این منطقه و مناطق مشابه استفاده شود.



شکل ۱. موقعیت نقاط نمونه گیری مختلف در این مطالعه

روش استخراج RNA

در این مطالعه از فیلتر Millipore Sigma با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر برای حذف سلول‌های باکتریایی استفاده شد. ۱۰۰-۲۰۰ میلی لیتر از نمونه (Universal 320R) در ۴۷۵۰ گرم به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

این موارد برای تغلیظ نمونه‌های جدا شده از فاضلاب انجام شد و در نهایت مایع رویی با دقت و بدون ایجاد مزاحمت خارج شد. سپس مایع رویی در ۳۵۰۰ گرم به مدت ۱۵ دقیقه همراه با فیلتر سانتریفیوژ با قطع ۱۰ کیلو دالتون سانتریفیوژ شد. سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد البته در این مدت ظرف حاوی نمونه برعکس در بالای فنجان فیلتر نمونه قرار گرفت. برای جمع‌آوری نمونه از کیت استخراج RNA (کیت اسید نوکلئیک ویروسی با خلوص بالا) استفاده شد و ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه غلیظ با پیپت برداشت شد.

باکتریوفاژ به عنوان کنترل خارجی به منظور تعیین اثربخشی استخراج RNA استفاده شد و پرایمرها و

پروپ‌های مناسب برای ژن‌های N و RDRP برای انجام Real Time PCR طراحی شدند. برای شناسایی ویروس در مرحله غربالگری اولیه، به عوامل مختلفی توجه شد که می‌توان به غلظت معرف‌ها، بررسی چرخه دما و تعداد چرخه‌های تولیدمثل اشاره کرد. پرایمر خاص و پروب واکنش زنجیره‌ای رونوشت معکوس- پلیمر (Real Time PCR) که ژن‌های ORF1ab و N (ژن نوکلئوپروتئین) را هدف قرار می‌دهد برای شناسایی ژنوم‌های ویروسی و بررسی SARS-CoV-2 در نمونه‌های فاضلاب استفاده شد. برای اجرای Real Time PCR از Applied Biosystems™ Real-Time PCR System 7500 نرم افزار v2.0.5 استفاده شد

کنترل مثبت و منفی

کنترل مثبت ۲۰۱۹-nCoV-qPCR برای نظارت بر عملکرد صحیح qRT-PCR در هر مرحله استفاده شد. استفاده از کنترل منفی ۲۰۱۹-nCoVqPCR برای نظارت بر وجود هرگونه آلودگی برای دوره rRT-PCR در هر مرحله تشخیص نیز مورد توجه

نشانیگر نتایج نمونه برداری از ۵ منطقه سرعین، مشکین شهر، گرمی، بیله سوار و پارس آباد است. در هر یک از این مناطق دو نوع نمونه از فاضلاب ورودی و خروجی گرفته شده است و در مجموع از ۱۰ نمونه جمع آوری شده ۳ نمونه مثبت است. هر سه نمونه مثبت مربوط به فاضلاب ورودی است که وضعیت ویروس کرونا در این سه نمونه نیز طبق جدول گزارش شده است. جدول ۳ شناسایی ویروس کووید-۱۹ را در فاضلاب بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی در این ۵ منطقه نشان می‌دهد که داده‌های جمع آوری شده از ۱۲ بیمارستان را نشان می‌دهد که نتایج منفی را در این بررسی گزارش کرده‌اند.

قرار گرفت همچنین یک کنترل داخلی در مرحله استخراج توسط کیت ژن N ویروس کرونا ووهان (TIB Molbiol، برلین، و آلمان) برای مجاز کردن استخراج و روش تقویت PCR استفاده شد.

اجرای زمان واقعی PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها
برای شناسایی ویروس SARS-CoV-2، میکروتیوب حاوی ژنوم استخراج شده به همراه سایر اجزای واکنش تحت یک چرخه حرارتی واقعی قرار گرفت و سپس نتایج Real-time PCR توسط اپراتور بر اساس معیارهای تجزیه و تحلیل داده‌ها تفسیر شد.

یافته‌ها

جدول ۱ پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده در این تحقیق و ژن‌های مورد نظر را نشان می‌دهد. جدول ۲،

جدول ۱. پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده در این مطالعه

ارگانیزم‌ها	ژن هدف	دنباله (۳-۵)	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-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ	55°C 10' 94°C 3' 94°C 15'' 58°C 30'' 45x.

جدول ۲. شناسایی ویروس کووید ۱۹ در تصفیه‌خانه‌های فاضلاب

تصفیه‌خانه فاضلاب	وضعیت ویروس کرونا	نتایج	
		Ct- ORF1ab	Ct- N
سرعین	فاضلاب ورودی	منفی	-
	فاضلاب خروجی	منفی	-
مشکین شهر	فاضلاب ورودی	مثبت	۳۶.۲۶
	فاضلاب خروجی	منفی	-
گرمی	فاضلاب ورودی	مثبت	۳۵.۸۱
	فاضلاب خروجی	منفی	-
بیله سوار	فاضلاب ورودی	منفی	-
	فاضلاب خروجی	منفی	-
پارس آباد	فاضلاب ورودی	مثبت	۳۳.۴۱
	فاضلاب خروجی	منفی	-

جدول ۳. شناسایی ویروس کووید ۱۹ در فاضلاب بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی

شهرها	بیمارستان‌ها	نتایج	ژن Ct- ORF1ab	ژن Ct- N
	امام خمینی	منفی	-	-
	شهدا	منفی	-	-
پارس آباد و اصلاندوز	آراز	منفی	-	-
	مرکز بهداشت اصلاندوز	منفی	-	-
	مرکز بهداشت پارس آباد	منفی	-	-
گرمی	ولایت	منفی	-	-
	مرکز بهداشت گرمی	منفی	-	-
بيله سوار	امام خمینی	منفی	-	-
	مرکز بهداشت بيله سوار	منفی	-	-
مشگین شهر	امام خمینی	منفی	-	-
	مرکز بهداشت مشگین شهر	منفی	-	-
نمین	مرکز بهداشت نمین	منفی	-	-

بحث

همانطور که قبلاً در رابطه با روش‌های مختلف انتقال ویروس کرونا صحبت شد، می‌دانیم که قطرات تنفسی راه اصلی انتقال است، اما انتقال از طریق فاضلاب آلوده نیز قابل توجه است و از آنجایی که ۱/۸ میلیارد نفر در جهان از آب آلوده به عنوان آب آشامیدنی استفاده می‌کنند این موضوع مهم است و بررسی میزان آلودگی فاضلاب می‌تواند در نظارت بر شیوع بیماری موثر باشد (۲۶، ۲۷). در واقع فاضلاب مجموعه پیچیده‌ای از ویروس‌ها است که طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا را شامل می‌شود (۲۸). انجام آزمایش‌های مبتنی بر شناسایی ژنتیکی کروناویروس می‌تواند در شناسایی سایر عوامل بیماری‌زا مؤثر باشد، اما خطر آلودگی فاضلاب علاوه بر ویروس‌های کرونای انسانی با ویروس‌های کرونای حیوانی نیز امکان‌پذیر است (۲۹).

وجود ویروس کرونا در مدفوع بیماران حتی پس از گذشت ۵ هفته از منفی‌شدن نمونه‌های تنفسی نشان می‌دهد که نظارت بر این مورد می‌تواند موثر باشد. حتی زمانی که شرایط بیماری بهتر است، می‌تواند در پیش‌بینی وضعیت آینده کمک کند (۳۰، ۳۱). نظارت بر فاضلاب را می‌توان به عنوان یک ابزار حساس در گردش ویروس در محیط در نظر گرفت (۳۲، ۳۳).

بررسی این‌گونه عوامل غیرمستقیم در گسترش بیماری حائز اهمیت است. به ویژه در کشورهای در حال توسعه، زیرا در این کشورها احتمال آلودگی آب شیرین در زهکشی زیاد است. در بررسی اپیدمیولوژی مبتنی بر فاضلاب (WBE)، شواهد نشان می‌دهد که ماندگاری ویروس کرونا در فاضلاب شهری و بیمارستانی تا حد زیادی به دما بستگی دارد. و عملاً بیشترین پایداری ویروس در دمای پایین اتفاق می‌افتد (۳۴، ۳۵).

در مطالعات انجام شده برای بررسی روش‌های مختلف و ارزیابی خطر ویروس در منابع آب WBE به‌عنوان یک روش مقرون به صرفه که دارای مراحل متداول (نمونه‌برداری، ذخیره‌سازی، غلظت، جداسازی، تشخیص) است، معرفی شده و از جمله مواردی که برای مدیریت محدودیت‌ها و بهبود بازده پیشنهاد شده است می‌توان به استفاده از نمونه‌های مرکب ۲۴ ساعته برای افزایش اطمینان از نتایج آنالیزها، نگهداری نمونه‌ها در دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد) و انجام آنالیزها در اسرع وقت جهت پیشگیری از احتمال به‌وجود آمدن خطا در نتایج و توجه به میزان غلظت برای غنی‌سازی اشاره کرد (۳۶، ۳۷).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که یکی از راه‌های مقرون به صرفه برای پایش شرایط کرونا، انجام آزمایشات بر روی فاضلاب است که امکان شناسایی افراد آلوده و حتی ناقلین بیماری با این روش وجود دارد و اقدامات پیشگیرانه لازم می‌تواند قبل از هر پیک صورت گیرد. در این مطالعه مشکلات و محدودیت‌هایی وجود داشت که از جمله آن‌ها می‌توان به عدم وجود معیارهای کنترل خارجی و کمبود امکاناتی مانند اولتراسانتریفیوژ، توالی‌سنجی DNA اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انجام آزمایش‌های ذکر شده در فاضلاب امکان پذیر است و استخراج RNA برای تشخیص روند پیشرفت همه‌گیری می‌تواند موثر باشد و استفاده از این نتایج می‌تواند برای تصمیم‌گیران حوزه سلامت مناسب باشد تا اقدامات پیشگیرانه را قبل از وقوع پیک بیماری انجام دهند و به طور کلی می‌توان گفت WBE روشی مناسب و اقتصادی برای تشخیص شیوع بیماری است.

تشکر و قدرانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1399.350 مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد.

در مطالعه با هدف مشابه نیز بر تخمین میزان شیوع و توزیع ویروس با استفاده از استخراج RNA تاکید شده است در این مطالعه از تکنیک‌های پلی اتیلن گلیکول (PEG)، آلوم یا فیلتراسیون استفاده شده است که همبستگی غلظت RNA ویروس با همه‌گیری بیماری را نشان داد و می‌توان این مطالعه را به عنوان اثبات مفهومی برای استفاده از داده‌های ویروسی مستقیم خام مرتبط با فاضلاب نیز در نظر گرفت (۳۸). شناسایی سریع انواع SARS-CoV-2 در حال گردش در آب و فاضلاب نیز می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد تکامل ویروسی و اپیدمیولوژی ارائه دهد. نظارت بر محیط زیست مبتنی بر ژنوم می‌تواند به تشخیص زودهنگام شیوع بیماری قبل از شناسایی موارد بالینی کمک کند و تنوع ویروسی را شناسایی کند که می‌تواند برای طراحی مداخلات مبتنی بر خطر استفاده شود. در این تحقیق از ۲۲ سایت نمونه‌های فاضلاب از ۱۶ سایت (۸۰٪) دارای SARS-CoV-2 قابل تشخیص بودند و ۴۷ جهش در ژنوم SARS-CoV-2 مشاهده شد. برخی از جهش‌های شناسایی شده ($n = 9$, ۲۲٪) در زمان تجزیه و تحلیل داده‌ها جدید بودند و هنوز در پایگاه داده جهانی گزارش نشده بودند (۳۹). به طور کلی پایداری ویروس‌های کرونا در آب بیشتر از ویروس‌های رودهای بدون پوشش است، بنابراین نظارت بر فاضلاب ویروس کرونا از نظر بهداشت محیطی مهم تلقی می‌شود (۴۰).

References

- 1- A Alygizakis N, Markou AN, Rousis NI, Galani A, Avgeris M, Adamopoulos PG, Scorilas A, Lianidou ES, Paraskevis D, Tsioupras S, Tsakris A. nalytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021;134:116125.
- 2- Chekol WB, Melesse DY. Operating room team safety and perioperative anesthetic management of patients with suspected or confirmed novel corona virus in resource limited settings: A systematic review. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2020;34:14-22.
- 3- Amoah ID, Kumari S, Bux F. Coronaviruses in wastewater processes: source, fate and potential risks. *Environment international*. 2020;143:105962.

- 4- Lai C-C, Ko W-C, Lee P-I, Jean S-S, Hsueh P-R. Extra-respiratory manifestations of COVID-19. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;56(2):106024.
- 5- 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.
- 6- Han J, He S. Urban flooding events pose risks of virus spread during the novel coronavirus (COVID-19) pandemic. *Science of the Total Environment*. 2021;755:142491.
- 7- Jiehao C, Jin X, Daojiong L, Zhi Y, Lei X, Zhenghai Q, et al. A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(6):1547-51.
- 8- Shaldam MA, Yahya G, Mohamed NH, Abdel-Daim MM, Al Naggar Y. In silico screening of potent bioactive compounds from honeybee products against COVID-19 target enzymes. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28(30):40507-14.
- 9- Michael-Kordatou I, Karaolia P, Fatta-Kassinou D. Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *Journal of environmental chemical engineering*. 2020;8(5):104306.
- 10- Vosoughi M, Karami C, Dargahi A, Jeddi F, Jalali KM, Hadisi A, et al. Investigation of SARS-CoV-2 in hospital indoor air of COVID-19 patients' ward with impinger method. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28(36):50480-8.
- 11- Mallapaty S. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. *Nature*. 2020;580(7802):176-7.
- 12- Lahrish S, Laghrib F, Farahi A, Bakasse M, Saqrane S, El Mhammedi M. Review on the contamination of wastewater by COVID-19 virus: Impact and treatment. *Science of The Total Environment*. 2021;751:142325.
- 13- Carducci A, Federigi I, Liu D, Thompson JR, Verani M. Making waves: coronavirus detection, presence and persistence in the water environment: state of the art and knowledge needs for public health. *Water research*. 2020;179:115907.
- 14- Waggoner JJ, Stittleburg V, Pond R, Saklawi Y, Sahoo MK, Babiker A, et al. Triplex real-time RT-PCR for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*. 2020;26(7):1633.
- 15- Wilson AM, Sleeth DK, Schaefer C, Jones RM. Transmission of respiratory viral diseases to health care workers: COVID-19 as an example. *Annual Review of Public Health*. 2022;43:311-30.
- 16- Manoj M, Kumar MS, Valsaraj K, Sivan C, Vijayan SK. Potential link between compromised air quality and transmission of the novel corona virus (SARS-CoV-2) in affected areas. *Environmental research*. 2020;190:110001.
- 17- 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.
- 18- Gao QY, Chen YX, Fang JY. 2019 Novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *Journal of digestive diseases*. 2020;21(3):125.
- 19- 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;382(10):929-36.
- 20- Xagorarakis I, O'Brien E. Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks. *Women in water quality: Investigations by prominent female engineers*. 2020:75-97.
- 21- Sen-Crowe B, Boneva D, Elkbali A. Municipal sewage COVID-19 testing: a much needed public health community prevention intervention. *The American Surgeon*. 2020;86(11):1518-9.
- 22- Hellmér M, Paxéus N, Magnius 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.
- 23- Hillary LS, Malham SK, McDonald JE, Jones DL. Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19. *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2020;17:14-20.

- 24- 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. *Environmental Science & Technology Letters*. 2020;7(7):51. ۶-۱
- 25- Wu F, Zhang J, Xiao A, Gu X, Lee WL, Armas F, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *Msystems*. 2020;5(4):10.1128/msystems.00614-20.
- 26- Bhowmick GD, Dhar D, Nath D, Ghangrekar MM, Banerjee R, Das S, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak: some serious consequences with urban and rural water cycle. *NPJ Clean Water*. 2020;3(1):32.
- 27- Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;55(3):105924.
- 28- Martínez-Puchol S, Rusiñol M, Fernández-Cassi X, Timoneda N, Itarte M, Andrés C, et al. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Science of the Total Environment*. 2020;713:136604.
- 29- Martínez-Puchol S, Itarte M, Rusiñol M, Forés E, Mejías-Molina C, Andrés C, et al. Exploring the diversity of coronavirus in sewage during COVID-19 pandemic: Don't miss the forest for the trees. *Science of the Total Environment*. 2021;800:149562.
- 30- Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-9.
- 31- Lesté-Lasserre C. Coronavirus found in Paris sewage points to early warning system. *Science*. 2020.
- 32- Yuan J, Chen Z, Gong C, Liu H, Li B, Li K, et al. Sewage as a possible transmission vehicle during a coronavirus disease 2019 outbreak in a densely populated community: Guangzhou, China, April 2020. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73(7):e1795-e802.
- 33- Elsamadony M, Fujii M, Miura T, Watanabe T. Possible transmission of viruses from contaminated human feces and sewage: Implications for SARS-CoV-2. *Science of the Total Environment*. 2021;755:142575.
- 34- Ali M, Zaid M, Saqib MAN, Ahmed H, Afzal MS. SARS-CoV-2 and the hidden carriers: Sewage, feline, and blood transfusion. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(11):2291.
- 35- Mandal P, Gupta AK, Dubey BK. A review on presence, survival, disinfection/removal methods of coronavirus in wastewater and progress of wastewater-based epidemiology. *Journal of environmental chemical engineering*. 2020;8(5):1. ۴۳۱۷
- 36- Kumar M, Alamin M, Kuroda K, Dhangar K, Hata A, Yamaguchi H, et al. Potential discharge, attenuation and exposure risk of SARS-CoV-2 in natural water bodies receiving treated wastewater. *npj clean Water*. 2021;4(1):8.
- 37- Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Zambon M. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. *World Health Organization*. 2020;17:1-13.
- 38- Bar-Or I, Yaniv K, Shagan M, Ozer E, Weil M, Indenbaum V, et al. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance. *Frontiers in Public Health*. 2022;9:561710.
- 39- Napit R, Manandhar P, Chaudhary A, Shrestha B, Poudel A, Raut R, et al. Rapid genomic surveillance of SARS-CoV-2 in a dense urban community of Kathmandu Valley using sewage samples. *PLoS One*. 2023;18(3):e0283664.
- 40- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *Jama*. 2020;323(18):1843-4.