مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۲، تابستان ۹۷، صفحات ۱۲۴ تا ۱۲۹

Original Article

Downloaded from iau-tmuj.ir at 6:09 +0430 on Tuesday July 17th 2018

تشخیص روتاویروس انسانی گروه A در نمونه های فاضلاب شهری، فاضلاب بیمارستانی و آب رودخانه در استان البرز به روش الایزا

زهرا طرفه[۱]، ناصر هرزندی[۲]، مصطفی قادری[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[۲]استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[۳]استادیار ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *گروه A روتاویروس‌های انسانی شایع‌ترین عامل اسهال حاد کودکان در سطح جهان است. روتاویروس‌ها به طور گسترده‌ای در آب‌های محیطی پراکنده‌اند. هدف از این پژوهش تشخیص روتاویروس های انسانی گروه A در نمونه های فاضلاب شهری، فاضلاب بیمارستانی و آب رودخانه در استان البرز به روش الایزا بود.*

روش بررسی: *این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۷۶ نمونه فاضلاب جمع آوری شده از ورودی و خروجی ۴ سیستم تصفیه فاضلاب شهری، فاضلاب بیمارستانی و آب رودخانه های کرج و برغان انجام شد. تمامی نمونه‌ها با روش رسوبی تغلیظ شدند. سپس گروه A روتاویروس های انسانی با استفاده از تکنیک الایزا (ELISA) شناسایی شدند.*

یافته‌ها: *از مجموع نمونه های مورد پژوهش، در ۶ نمونه (۷/۸۹٪) روتاویروس‌های انسانی گروه A شناسایی شد که ۳ مورد آن (۵۰٪) مربوط به ورودی فاضلاب و ۳ مورد (۵۰٪) مربوط به رودخانه کرج بود. همچنین فراوانی نمونه‌های آلوده به روتاویروس‌ها در فصل‌های تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۱ نمونه (۱۶/۶۶٪)، ۳ نمونه (۵۰٪) و ۲ نمونه (۳۳/۳۳٪) بود.*

نتیجه‌گیری: *این پژوهش، آلودگی آب‌های محیطی به گروه A روتاویروس‌های انسانی را نشان داد. از این رو پایش مداوم سیستم‌های تصفیه فاضلاب و آب رودخانه‌ها به منظور شناسایی روتاویروس‌ها ضروری است.*

واژگان کلیدی: *گروه A روتاویروس‌های انسانی، آب‌های محیطی، روش رسوبی، الایزا.*

مقدمه

بیماری‌های منتقله از راه آب نگرانی عمده‌ای در سطح جهان هستند که هزینه‌های زیادی را به کشورهای مختلف تحمیل می‌کنند. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۲/۲ میلیون نفر در سال، به دلیل بیماری‌های منتقله از راه آب جان خود را از دست می‌دهند که حدود ۱/۴ میلیون نفر از این تعداد را کودکان تشکیل می‌دهند (۱). انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زای روده‌ای شامل باکتری‌ها و ویروس‌ها سبب ایجاد گاستروانتریت منتقله از راه آب می‌شوند (۲). گروه A روتاویروس‌های انسانی در حال حاضر شایع‌ترین عامل گاستروانتریت حاد در نوزادان و کودکان کم سن و سال در سرتاسر جهان هستند (۳). روتاویروس‌های انسانی عامل بالاترین عفونت‌زایی در میان ویروس‌های قابل انتقال از طریق آب (آب زاد) هستند (۴). تخمین زده می‌شود که سالیانه ۳ تا ۵ میلیارد حمله اسهال در کودکان زیر ۵ سال در آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین اتفاق می‌افتد که منجر به ۱ میلیون مرگ می‌شود. در کشورهای توسعه یافته میزان ابتلا بالاست، اما میزان مرگ و میر پایین است. به طور معمول، تا ۵۰ درصد از موارد گاستروانتریت حاد کودکان بستری شده

آدرس نویسنده مسئول: کرج، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ناصر هرزندی
(**email**: naser.harzandi@kiau.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۷/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۹/۱

Downloaded from iau-tmuj.ir at 6:09 +0430 on Tuesday July 17th 2018

در سرتاسر جهان به وسیله روتاویروس ها ایجاد شده است. روتاویروس‌ها بر اساس شاخص‌های آنتی ژنی روی پروتئین ساختاری VP6 به ۷ گروه A تا G به اضافه یک گروه غیر قطعی H طبقه بندی می‌شوند (۵). روتاویروس‌ها متعلق به خانواده رئوویریده بوده و دارای تقارن بیست وجهی، فاقد پوشینه و دارای کپسید سه لایه هستند. ژنوم آنها RNA دو رشته‌ای شامل ۱۱ قطعه است که ۶ پروتئین ساختاری ویروسی (VP) و ۶ پروتئین غیر ساختاری (NSP) را کد می‌کند (۵، ۶). گروه A روتاویروس‌ها با توجه به نوع دو پروتئین VP4 و VP7 واقع بر لایه خارجی کپسید که هدف اصلی آنتی بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس هستند، به ترتیب به ژنوتیپ‌های P و G تقسیم می‌شوند. با توجه به اینکه مسیر انتقال روتاویروس از طریق تماس مستقیم، مدفوعی-دهانی و یا از طریق آب و موادغذایی آلوده به مدفوع انسانی یا حیوانی است؛ بنابراین تصفیه فاضلاب‌ها و رعایت مسائل بهداشتی ضروری به نظر می‌رسد (۵، ۷، ۸). واکسیناسیون به عنوان تنها راه پیشگیری از ابتلا به اسهال روتاویروسی و تلفات در کودکان مطرح است (۳). روتاویروس‌ها در آب‌های زائد، فاضلاب تیمار شده، رسوبات فاضلاب، آب‌های سطحی، آب‌های زیرزمینی و همچنین در آب‌های آشامیدنی شناسایی شده‌اند. این ویروس‌ها به تعداد بسیار زیاد از افراد بیمار دفع می گردند اما زمان ورود به آب و فاضلاب بسیار رقیق می‌شوند. برای برآورد خطر سلامتی نسبت داده شده به روتاویروس ها در آب‌های آلوده شده با فاضلاب روش‌های حساس و مطمئنی مورد نیاز است (۹، ۱۰، ۱۱). زنده ماندن و ثبات روتاویروس‌ها در انواع مختلف آب‌های محیطی و مقاومت آن‌ها در برابر فرآیندهای فیزیکوشیمیایی و شرایط نامناسب سیستم‌های تصفیه آب سبب می‌شود که انتقال آنها از طریق آب بسیار مهم جلوه کند. توزیع روتاویروس‌ها در فاضلاب و آب‌های آلوده به دو مورد میزان بیماری‌های ویروسی در جمعیت و در دسترس بودن سیستم پردازش فاضلاب شهری بستگی دارد. اهمیت انجام مطالعات و در نظر گرفتن نتایج بررسی‌های اپیدمیولوژی عفونت روتاویروسی در مطالعات بررسی کیفیت آب نه تنها به دلیل اهمیت آنها به عنوان عامل اصلی اسهال حاد مطرح است، بلکه با توجه به توانایی زنده ماندن طولانی مدت آنها در محیط های آبی و استفاده مجدد از این آب برای آبیاری زمین‌ها و مزارع زیر کشت نیز دارای اهمیت است (۲، ۱۲). با توجه به وجود نداشتن هیچ گزارشی از پایش محیطی روتاویروس‌ها در استان البرز، پژوهش حاضر با هدف پایش محیطی گروه A روتاویروس های انسانی در سیستم‌های تصفیه فاضلاب شهری ، فاضلاب بیمارستانی و آب رودخانه‌های کرج و برغان در استان البرز انجام شد.

مواد و روشها

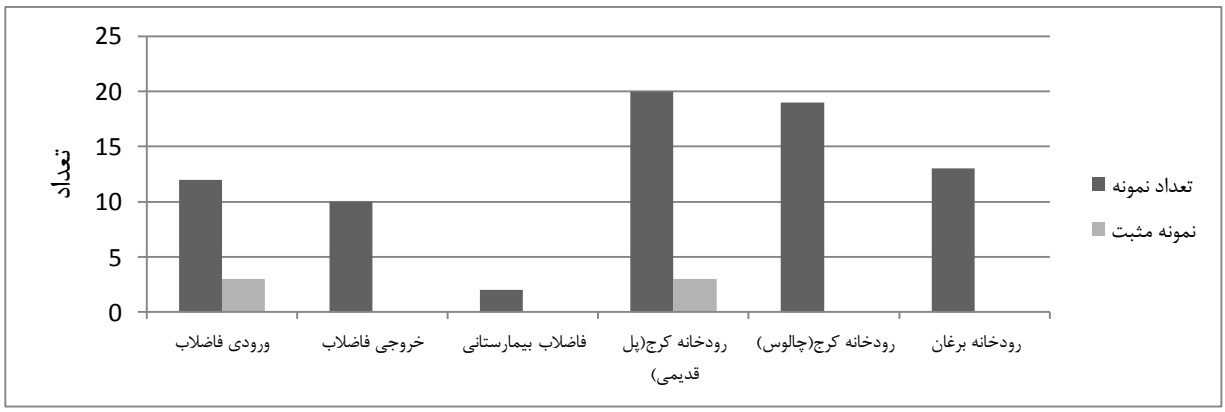
این پژوهش به صورت مقطعی – توصیفی بر روی ۷۶ نمونه شامل ورودی فاضلاب (۱۲ نمونه) و خروجی فاضلاب (۱۰ نمونه) جمع آوری شده از چهار تصفیه خانه ی استان البرز، فاضلاب بیمارستانی (۲ نمونه)، رودخانه ی کرج محدوده پل قدیمی (۲۰ نمونه)، رودخانه کرج محدوده ورودی جاده چالوس (۱۹ نمونه) و رودخانه برغان (۱۳ نمونه) انجام شد. نمونه‌های فاضلاب شهری با همکاری آزمایشگاه مرکزی آب و فاضلاب کرج و نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی و رودخانه‌ای با مراجعه حضوری جمع آوری شدند. نمونه گیری در دوره منظم ۷ ماهه (مردادماه ۱۳۹۵ تا بهمن ماه ۱۳۹۵) انجام گرفت. حجم تمامی نمونه‌ها یک لیتر بود که در ظروف پروپیلنی درپوش دار استریل جمع آوری شدند و در جعبه سرد (Ice box) حاوی یخ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروب شناسی مجتمع آزمایشگاهی عباسپور در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج منتقل شدند. مشخصات کامل هر نمونه شامل مکان نمونه برداری، نوع نمونه، فصل، ماه و روز نمونه گیری بر روی بطری‌ها ثبت شد.

تغلیظ به روش رسوبی

تمامی نمونه‌ها با روش رسوبی (Pellet) پیشنهاد شده توسط کارگر و همکاران تغلیظ شدند (۲، ۱۰). در این روش در ابتدا از هر نمونه ۷۵ میلی لیتر برداشته شد و به ۵ لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری استریل منتقل و در دور ۵۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام شد. در مرحله بعد، به مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ، به منظور از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها به ازای هر ۴ میلی لیتر از نمونه-های تغلیظ شده، ۱ میلی لیتر کلروفرم خالص (Merck، آلمان) اضافه شد. نمونه‌ها به ترتیب در ۲۰۰ xg و ۲۰۰۰ xg به مدت ۲۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از پایان سانتریفیوژ، فاز آبی بالایی با کمک پی پت پلاستیکی استریل جدا و به لوله فالکون استریل منتقل شد. تمامی نمونه‌ها تا انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

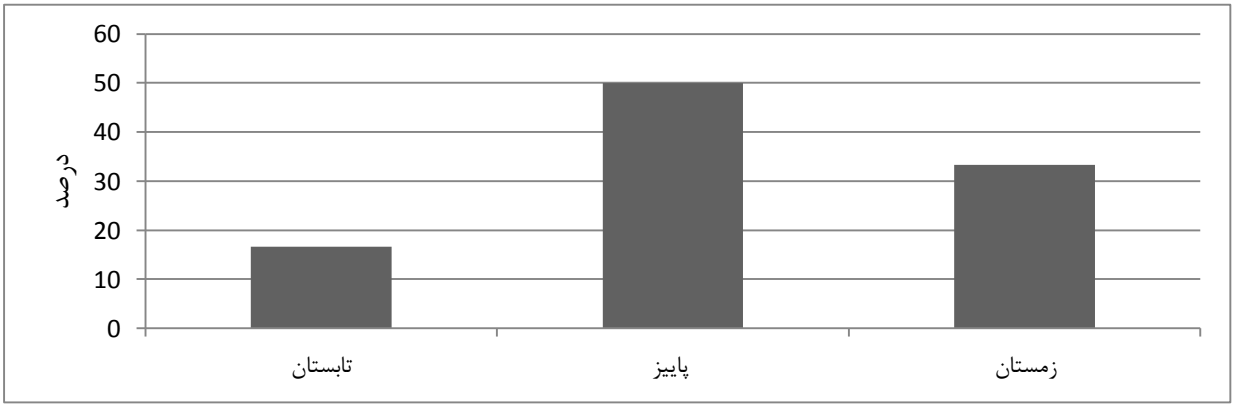
تشخیص روتاویروس های گروه A

Downloaded from iau-tmuj.ir at 6:09 +0430 on Tuesday July 17th 2018



نمودار۱. فراوانی روتاویروس‌های شناسایی شده بر اساس محل نمونه گیری

نمودار ۲. توزیع فراوانی و تعداد نمونه‌های مثبت در ماه‌های مختلف



نمودار ۳. توزیع فراوانی فصلی و نسبت روتاویروس‌های شناسایی شده

به منظور سنجش آنتی ژن گروه A روتاویروس های انسانی در نمونه‌ها به روش الایزای مستقیم از کیت Rotavirus RIDASCREEN® شرکت R-Biopharm آلمان با میزان حساسیت ۹۵/۶٪ و ویژگی ۹۹/۱٪ استفاده شد. پلیت ۹۶ چاهکی شامل ۱۲ استریپ ۸ چاهکی بود که تمام چاهک‌های آن با آنتی بادی‌های مونوکلونال ضد پروتئین VP6 روتاویروسی کد شده بودند. در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه، درون چاهک جداگانه‌ای ریخته شد و به هر چاهک محلول کونژوگه ۱ اضافه شد؛ سپس انکوباسیون اول به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. پس از شست و شو، محلول کونژوگه ۲ حاوی استرپتاویدین پلی پراکسیداز به هر چاهک اضافه شد و انکوباسیون دوم به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. دوباره شست و شو انجام و سوبسترای آنزیم اضافه شد و انکوباسیون سوم به مدت ۱۵ دقیقه و در تاریکی انجام شد (ایجاد رنگ آبی). در مرحله آخر، به منظور متوقف کردن واکنش، به چاهک‌ها محلول توقف اضافه شد (ایجاد رنگ زرد). در نهایت، نتایج براساس OD قرائت شده توسط دستگاه خوانشگر الایزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد؛ سپس Cut off point محاسبه

Downloaded from iau-tmuj.ir at 6:09 +0430 on Tuesday July 17th 2018

شد. مقادیر ۱۰ درصد بالاتر از Cut off point مثبت در نظر گرفته شدند.

تحلیل آماری

داده‌ها پس از جمع آوری و دسته بندی، توسط نرم افزار IBM SPSS Statistics version 23 تحلیل شدند. بدین منظور از آزمون‌های استقلال (مربع کای) و دقیق فیشر استفاده شد. در همه آزمون‌های آماری، $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ۲۰۱۰ رسم شدند.

یافته‌ها

از مجموع ۷۶ نمونه مورد بررسی در ۶ نمونه (۷/۸۹٪)، گروه **A** روتاویروس‌های انسانی شناسایی شد. از ۶ نمونه آلوده به روتاویروس، ۳ نمونه (۵۰٪) مربوط به ورودی فاضلاب شهری و ۳ نمونه (۵۰٪) مربوط به رودخانه کرج محدوده پل قدیمی بودند. با توجه به کمی تعداد نمونه ها، نتایج آزمون دقیق فیشر نشان داد که بین شیوع روتاویروس و محل نمونه گیری (ورودی فاضلاب و آب های سطحی (رودخانه کرج و برغان)) اختلاف معناداری وجود نداشت (p=۰/۰۷۴) (نمودار ۱). در پژوهش حاضر که به مدت ۷ ماه انجام گرفت، از ۶ نمونه مثبت، ۱ نمونه در شهریور ماه، ۱ نمونه در مهر ماه، ۲ نمونه در آذر ماه و ۲ نمونه در دی ماه مثبت تشخیص داده شدند (نمودار ۲). نمودار ۳، توزیع فراوانی فصلی روتاویروس‌های شناسایی شده را نشان می‌دهد. بین شیوع روتاویروس و فصل نمونه گیری اختلاف معناداری وجود نداشت (**p**=۰/۸۸۹).

بحث

عوامل بیماری‌زای منتقله از راه آب و بیماری‌های مرتبط با آنها از نگرانی‌های عمده در زمینه بهداشت عمومی در جهان محسوب می‌شوند (۱). اگرچه عوامل باکتریایی، انگلی و عوامل ویروسی مانند آدنوویروس‌های روده‌ای (تیپ ۴۰ و ۴۱)، کالیسی ویروس‌ها، آستروویروس‌ها و نوروویروس‌ها از عوامل ایجاد گاستروانتریت هستند، ولی گروه A روتاویروس‌های انسانی علت بیش از ۵۰ درصد گاستروانتریت حاد در نوزادان و کودکان زیر ۵ سال محسوب می‌شوند (۵، ۱۳). انتقال گروه A روتاویروس‌های انسانی از آب و حضور آنها در منابع آبی از اهمیت ویژه‌ای در بهداشت عمومی برخوردار است (۴، ۱۰). آب‌هایی که توسط مدفوع انسانی آلوده می‌شوند، بیش‌ترین اهمیت را در انتقال بیماری‌های ویروسی دارند (۱۲). از آن جا که میزان ویروس‌ها در محیط‌های آبی پایین است، انتخاب روش تغلیظ مناسب جهت شناسایی و جداسازی ویروس از نمونه‌های مورد بررسی ضروری است (۱۴). در پژوهش حاضر به جای استفاده از روش پر هزینه تغلیظ دوفازی (Two-phase) که نخستین بار توسط Hovi و همکاران در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد شد، از روش تغلیظ رسوبی (Pellet) که توسط کارگر و همکارانش در سال ۲۰۰۹ پیشنهاد و کارایی آن اثبات شده است، استفاده شد (۱۵، ۱۶). پس از انجام تغلیظ با استفاده از روش الایزا، روتاویروس‌ها شناسایی شدند.

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ توسط کارگر و همکاران انجام شد، از مجموع ۶۰ نمونه فاضلاب جمع آوری شده از شهر شیراز که به دو روش دوفازی و رسوبی تغلیظ شده بودند، با استفاده از روش الایزا و nested RT-PCR، ۱۵ نمونه مثبت گزارش شد (۲، ۱۰). همچنین در مطالعات انجام شده توسط کارگر و همکارانش در تهران، با استفاده از روش الایزا، از مجموع ۹۲ نمونه فاضلاب جمع آوری شده در ۳۰ نمونه، وجود روتاویروس به اثبات رسید (۹). در پژوهشی دیگر که توسط Chigor و همکارانش در کشور آفریقای جنوبی و با استفاده از روش RT-PCR انجام شد، از ۷۲ نمونه جمع آوری شده از رودخانه بوفالو، ۱۳/۹٪ نمونه‌ها به روتاویروس آلوده بودند (۱۷). همچنین در پژوهش انجام شده توسط Rigotto و همکارانش در کشور برزیل با استفاده از روش RT-PCR، از ۸۴ نمونه مختلف انواع آب‌های سطحی، در ۱۶ نمونه روتاویروس شناسایی شد (۱۸).

در پژوهش Sdiri-Loulizi و همکارانش در کشور تونس، با استفاده از روش RT-PCR، از ۲۵۰ نمونه فاضلاب خام و تصفیه شده، ۸۰ نمونه (۳۲٪) به روتاویروس آلوده بودند (۱۹). در پژوهش حاضر، روتاویروس‌ها در ۶ نمونه (۷/۸۹٪) تشخیص داده شدند. با توجه به گسترش روز افزون روش های مولکولی به ویژه PCR و همچنین بررسی نتایج پژوهش هایی که در آن ها از روش RT-PCR به منظور تشخیص روتاویروس های انسانی گروه A استفاده شده است، به دلیل استفاده از پرایمرهای اختصاصی، حساسیت و دقت بالا، استفاده از این روش برای تایید نتایج توصیه می شود. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات در داخل و خارج از کشور، شیوع روتاویروس در ماه های سرد سال بیشتر است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز شیوع گروه A روتاویروس‌های انسانی را در ماه‌های سرد سال تایید می‌کند. پژوهش ما بر روی پایش محیطی روتاویروس‌ها در نمونه‌های فاضلاب و رودخانه، نشان‌گر حضور این ویروس روده‌ای در این منابع است. در پژوهش حاضر، در نمونه‌های مربوط به ورودی فاضلاب و آب رودخانه، نمونه

مثبت (آلوده به روتاویروس) گزارش شد، ولی هیچ نمونه مثبت روتاویروسی مربوط به خروجی فاضلاب مشاهده نشد. در سایر پژوهش های انجام شده در داخل کشور، نمونه مثبت روتاویروسی در خروجی فاضلاب گزارش شده است، اما در پژوهش حاضر نمونه مثبت خروجی فاضلاب یافت نشد که این موضوع می‌تواند به دلیل کمبود نمونه‌های مورد بررسی و یا کارایی احتمالی روش‌های تصفیه باشد. اما دلیل دیگری که می‌توان برای این امر متصور شد که البته نیاز به تحقیقات بیشتر در سطح جهانی دارد، این است که در تمام تصفیه خانه‌های استان البرز در مرحله آخر از فرایند تصفیه فاضلاب از مقادیر بسیار زیاد کلر استفاده می‌شود. از آن جا که در تحقیقات انجام شده در خارج از کشور تاثیر کلر در غیرفعال کردن روتاویروس ها به تایید رسیده است، مرحله بعدی تحقیقات می‌تواند بررسی اثر این ماده بر روی عدم ردیابی روتاویروس‌ها باشد (۲۰، ۲۱). همچنین در این پژوهش به دلیل محدودیت‌های ایجاد شده، امکان نمونه گیری بیشتر از فاضلاب‌های بیمارستانی وجود نداشت.

در پژوهش حاضر برای نخستین بار در ایران وجود روتاویروس‌ها در آب رودخانه‌ها به اثبات رسید. از مجموع ۶ نمونه مثبت روتاویروسی، ۳ نمونه (۵۰٪) مربوط به آب رودخانه کرج بودند که این امر نشانگر آلودگی مدفوعی و تخلیه فاضلاب در این رودخانه است.

از آن جا که در ایران، سطح بهداشت، شرایط آب و هوایی و دسترسی و عدم دسترسی به سیستم‌های تصفیه فاضلاب با توجه به مناطق مختلف، متفاوت است؛ بر این اساس یافتن روش جدید تصفیه فاضلاب با تاکید بر حذف ویروس‌هایی نظیر روتاویروس‌ها توصیه می‌شود.

در مورد آلودگی آب رودخانه‌ها به عوامل بیماری‌زای مدفوعی از جمله روتاویروس‌ها، در وهله اول جمع آوری لوله‌های فاضلاب شهری و بیمارستانی از حریم رودخانه‌ها و جلوگیری از ساخت و ساز در حریم رودخانه‌ها و در مرحله بعدی رعایت بهداشت فردی توصیه می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر، آلودگی آب‌های محیطی به روتاویروس ها را نشان داد. این امر ضرورت پایش محیطی عوامل بیماری-زای روده ای از جمله روتاویروس‌ها را نشان می‌دهد. در نتیجه، ایجاد یک برنامه مدون و منظم کشوری به منظور پایش محیطی این عوامل در منابع آبی و در دوره‌های زمانی مشخص برای حفظ سلامت شهروندان ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای خیری مسئول آزمایشگاه مرکزی آب و فاضلاب استان البرز و سرکار خانم اسدی کارشناس آزمایشگاه تحقیقات مولکولی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به دلیل حمایت‌ها و همکاری-هایشان کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Ramirez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-Gonzalez FJ, Harel J, et al. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. Pathogens 2015;4:307-34.

2. Kargar M, Javdani N, Najafi A, Tahamtan Y. First molecular detection of group A rotavirus in urban and hospital sewage systems by nested-RT PCR in shiraz, Iran. J Environ Health Sci Eng 2013;11:2-6.

3. Harzandi N, Samiee P, Dezfulian M. Molecular detection and genotyping of rotaviruses in children with acute gastroenteritis in Karaj hospital. J Qazvin Univ Med Sci 2014;18:21-7.

4. Kiulia MN, Nynke H, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G, Rose JB. Global occurrence and emission of rotavirus to surface waters. Pathogens 2015;4:229-55.

5. Carrol KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Jawetz-Melnick, & Adelberg,s Medical Microbiology. 27th ed. New York: McGraw Hill; 2016. P. 531-6.

6. Koroglu M, Yakupogullari Y, Otlu B, Ozturk S, Ozden M, Ozer A, et al. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. New Microbiol 2011;34:17-24.

7. Ruggeri MF, Bonomo P, Ianiro J, Battistone A, Delogu R, Germinario C, et al. Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute diarrhea in Italy in 2010 and 2011. Appl Environ Microbiol 2015;81:241-9.

8. Kargar M, Najafi A, Zandi K, Barazesh A. Frequency and demographic study of rotavirus acute gastroenteritis in hospital children of Borazjan city during 2008-2009. JSSU 2011;19:94-103.

9. Kargar M, Razeghi Z, Najafi A. Removal of human rotaviruses type A from concentrated sewage of Ghods and Mahallati wastewater treatmen systems in Tehran. J Health 2016;7:395-403.

Downloaded from iau-tmuj.ir at 6:09 +0430 on Tuesday July 17th 2018

10. Javdani N, Kargar M, Ghodsi M. The assessment of efficiency of eliminating group A human rotaviruses in urban and hospitalized sewage refining system of Shiraz city. Medical Sciences 2012;22:226-31.

11. Bitton G. Wastewater Microbiology. 4th ed. United States of America: A John Wiley & Sons; 2011. P. 151-2.

12. Rodriguez-Diaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, et al. Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. Appl environ microbiol 2009;75:387-94.

13. Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Mendes LD, Luiz B Luz S, et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. Appl environ microbiol 2008;47:375-82.

14. Kittigul L, Raengsakulrach B, Siritantikorn S, anyok R, Utrarachkij F, Diraphat P, et al. Detection of Poliovirus, Hepatitis A Virus and rotavirus from sewage and water samples. Southern Asian J Trop Med Public Health 2000;31:41-6.

15. Hovi T, Stenvik M, Partanen H, Kangas A. Poliovirus surveillance by examining sewage specimens. Quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. Epidemiol infect 2001;127:101-6.

16. Kargar M, Sadeghpour S, Nategh. Environmental surveillance of non-polio enterovirus in Iran. Virol J 2009;6:1-5.

17. Chigor VN, Okoh AI. Quantitative RT-PCR Detection of Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Source Water Dam in the Eastern Cape Province of South Africa. Int J Environ Res Public Health 2012;9:4017-32.

18. Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolensnikovas CK, Correa AA, Souza DSM, et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. J Appl Microbiol 2010;109:1979-87.

19. Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-Khelifi H, Chouchane S, Sakly N, et al. Detection and molecular characterization of enteric viruses in environmental samples in Monastir, Tunisia between January 2003 and April 2007. J Appl Microbiol 2010;109:1091-104.

20. Li D, Gu AZ, Zeng S, Yang W, He M, Shi H. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. J Environ Sci (China) 2011;23:1691-8.

21. Xue B, Li C, Zhang B, Zhao T, Shen Z, Qiu Z, et al. Quantitative reverse transcription PCR to determine the inactivation of Human Rotavirus by chlorine. Int J Hyg Environ Health 2017;220:719-25.

Downloaded from iau-tmuj.ir at 6:09 +0430 on Tuesday July 17th 2018