مجله بهداشت ایران
سال هفتم ، شماره ۱ ، بهار ۲۵۳۷

جداسازی ویروس از آب*

احمد خوش زبان
ناهید صبوری
دکتر رخشنده ناطق

خلاصه:

طی مطالعه‌ای ۸ نمونه از ۴ فاضلاب اصلی ، ۱۰ نمونه از رودخانه‌های سد لار و سد فرحناز پهلوی (لتیان) که در تأمین آب آشامیدنی تهران سهمی دارند و نیز یک آب‌چاه نیمه عمیق جنوب شهر و ۲۲ نمونه آب جوی مناطق مختلف شهر تهران از لحاظ وجود ویروس وجداسازی آن ، باروش مستقیم وتغلیظ بافاز سپریشن Phase Separation) (Method مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج آزمایشات نشان داد که از ۸ نمونه فاضلاب اصلی ۳ نمونه باروش مستقیم و یک نمونه با روش تغلیظ و از ۱۰ نمونه رودخانه ۲ نمونه با روش تغلیظ واز ۲۲ نمونه آب جوی یک نمونه باروش مستقیم و ۳ نمونه با روش تغلیظ مثبت است که نتایج حاصله حساسیت روش بکار برده شده را در تغلیظ و جداسازی ویروسهای موجود در آب نشان میدهد .

از ۱۰ ویروس جدا شده ۵ ویروس از نوع پولیو ویروس تیپ I و یک ویروس از نوع پولیو ویروس تیپ II بوده و بقیه را سایر انترو ویروسها تشکیل میدهند که با اتکاء به آزمایش حرارتی rct 40 پولیو ویروسهای جدا شده از نوع واکسن تشخیص داده‌شدند .

---

* ـ این تحقیق در بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت با همکاری قسمت آب‌ـ شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه آذرآبادگان انجام گرفته است .

مقدمه:

انترو ویروسها ، آدنو ویروسها ، رئو ویروسها ، عاملین هپاتیت A,B (۱) و روتا ویروسها (۲) از طریق مدفوع دفع شده و در صورت راه یافتن به‌منابع آبهای مصرفی و آشامیدنی موجب آلودگی آنها میشوند و آب آلوده میتواند وسیله خوبی برای انتشاراین ویروسها چه بصورت تک‌تک و چه بصورت اپیدمی باشد Mosley (۳) ۸ اپیدمی مربوط به پولیو میلیت و ۵۰ مورد مربوط به هپاتیت عفونی ناشی از آب را که طی سالها درنقاط مختلف دنیا بوقوع پیوسته با شواهد و مدارک لازم گزارش نموده که بزرگترین آنها مربوط به دهلی هندوستان است و در آن ۲۸۷۴۵ نفر در سال ۱۹۵۵ با مصرف آب آشامیدنی تصفیه شده مبتلا به‌هپاتیت شدند .

این گزارشات و سایر گزارشات مشابه و تحقیقات آزمایشگاهی بروی‌آنها نشان‌میدهد که تصفیه منابع آب از لحاظ ویروس احتیاج به‌متدهای پیشرفته و تازه‌ای داشته و تنها بکار بردن آزمایشات باکتریائی جهت پاکی آب بخصوص گروه کلی فرم نمیتواند شاخص کافی برای سالم بودن آب باشد چه این ارگانیسمها تحت شرائط معیّن نسبت به‌اعمال تصفیه و یا عوامل از بین برنده دیگر خیلی حساستر از برخی انترو ویروسهای پاتوژن میباشند .

طبق ادعای Plotkin و Katz (۴) حتی یک واحد آلوده‌کننده کشت سلولی وقتی با سلولهای حساس انسان مستعد تماس پیدا میکند برای آلوده کردن کافی است . یعنی حتی موقعیکه غلظت ویروس به‌میزان یک واحد عفونی در یک لیتر آب باشد عده‌ای از افراد حسّاس با مصرف طبیعی ۲–۱ لیتر آب در روز ممکنست آلوده یا بیمار گردند .

وقتی مقدار ویروس در نمونه آبی مانند فاضلاب خانگی زیاداست‌میتوان‌آنرابراحتی مستقیماً آزمایش نموده و ویروس را جدا نمود اما از آنجائیکه تعداد ویروس در آبهای سطحی ، رودخانه‌ها وآبهای مصرفی و آشامیدنی همیشه بمیزانی نیست که با روش مستقیم بتوان آنرا جدا کرد بناچار ابتدا باید آنها را تغلیظ نمود و برای اینکارروشهای‌گوناگونی توسط دانشمندان مختلف بکار برده شده است (۵،۶،۷،۸،۹،۱۰) .

یکی از این متدها روش فاز سپریشین یا P . S است که توسط Shuval (۱۱،۱۲) برای آبهای فاضلاب ، رودخانه و آبهای سطحی پیشنهاد شده و میتواند تمام ویروسهای موجود در آب بخصوص انترو ویروسها را ۵۰۰ – ۲۰۰ برابر تغلیظ نماید .

جهت بررسی میزان آلودگی ویروسی چند نوع آب مختلف تهران همچنین تعیین میزان حساسیت روش P . S در جداسازی ویروس از آب مطالعه‌ای بعمل آمد که ذیلا شرح داده میشود .

مواد لازم و روش کار:

الف ــ جمع‌آوری نمونه:

جمعاً ۴۱ نمونه آب مختلف از لحاظ وجود ویروس مورد آزمایش قرار گرفتند که‌نوع، محل و تاریخ نمونه‌برداری در جدول نتایج گزارش شده است.

ب ــ مواد لازم:

۱ ــ سلول B . G . M که سلول مداوم کلیه میمون سبز افریقائی است و ازآزمایشگاه Environmental Health بسرپرستی Dr . Shuval از دپارتمان اکولژی‌پزشکی دانشگاه اورشلیم اسرائیل گرفته شده است و بنا به‌گزارش Dahling (۱۳) و همکارانش یکی از مناسبترین سلولها برای جداسازی انترو ویروسها از آب است.

۲ــ سدیم دکستران سولفات (کارخانه داروئی A.B سوئد).

۳ــ پولی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ (کارخانه مرک آلمان).

۴ــ کلرور سدیم خالص (کارخانه مرک آلمان).

ج ــ روش آزمایش P.S, (Phase Separation Method):

نمونه‌ها را در ظروف استریل برداشت نموده و بلافاصله به‌آزمایشگاه آورده وتاآماده کردن مواد دیگر در سردخانه ۴ درجه سانتی‌گراد قرار میدهیم. بازاء هر یک لیتر نمونه آب مورد آزمایش ۲ گرم سدیم دکستران سولفات، ۶۴/۵ گرم پولی اتیلن گلیکول‌و۱۷/۵ گرم کلرور سدیم وزن نموده در یک ارلن مایر استریل ریخته و نمونه آب را بروی آن‌اضافه مینماییم وبادستگاه بهم‌زدن مغناطیسی‌خوب بهم‌میزنیم تامواد شیمیائی حل و یکنواخت گردد. محلول حاصل را به‌قیف دکانتاسیون استریل منتقل و ۲۴ــ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار میدهیم بعد از این مدت فاز تحتانی را به‌آرامی با باز کردن شیر قیف به یک لوله استریل ریخته وبازاء هرمیلی‌لیتر ۵۰ میلی‌گرم کلرورسدیم خالص بآن اضافه کرده و ۲۴ــ۱۲ ساعت دیگر در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار میدهیم این بار فاز بالائی را جدا نموده وبادور g ×۱۵۰۰۰ بمدت نیمساعت سانتریفوژ نموده ومایع روئی را جدامینمائیم. سپس پنی‌سیلین بمیزان (۲۰۰۰۰ u /ml) استرپتومایسین (۲۰۰۰۰ ηg / ml) و فونگیزون (۶ ηg / ml) بآن اضافه و نیمساعت جهت تأثیر آنتی‌بیوتیک در حرارت آزمایشگاه قرار میدهیم بعد از این مدت ماده تغلیظ شده را به پلیتهای سلولی B.G.M تزریق مینمائیم و تعداد ویروس موجود در یک لیتر نمونه را با شمردن تعداد پلاکهای ایجاد شده از روی فرمول زیر محاسبه میکنیم:

محاسبه

$$* \text{PFU/liter} = \frac{A \times C}{B \times D}$$

A = مجموع پلاکهای ایجاد شده روی تمام پلیتهای تزریق شده.
B = حجم آب تغلیظ شدهٔ تزریق شده.
C = حجم نهائی آب تغلیظ شده برحسب میلی‌لیتر.
D = حجم آب مورد آزمایش برحسب لیتر.

نتیجه:

کلیه نتایج آزمایشات انجام یافته همراه با محل و تاریخ نمونه‌برداری و میزان آلودگی در جدولهای ۱، ۲، ۳، ۴ خلاصه شده است.

تعیین تیپهای ویروسی با استفاده از روش نوترالیزاسیون انجام گرفته و نوع وحشی و واکسن ویروس با تست حرارتی rct40 (۱۴) مشخص گردید.

بحث:

بطوریکه از جدولهای ۱و۲و۳ پیداست رویهمرفته ۱۰ ویروس از تمام نمونه‌های مورد آزمایش جدا گردیده که ۴ ویروس از فاضلابهای اصلی و ۲ ویروس از آب رودخانه‌ها و ۴ ویروس از آب جویها بوده است که از این ۱۰ ویروس ۵ ویروس ازنوع پولیوویروس تیپ I و یک ویروس از نوع پولیو ویروس تیپ II و بقیه را سایر انترو ویروسها که احتمالا از نوع کوکساکی یا اکو هستند تشکیل میدهند و آزمایش حرارتی rct40 نشان داد که پولیو ویروسهای جدا شده از نوع واکسن میباشند.

همچنین نتایج آزمایشات نشان میدهد که از ۱۰ نمونه مثبت بغیر از سه فاضلاب اصلی و یک فاضلاب سطحی (جوی) بقیه در اثر تغلیظ با روش P . S مثبت‌شده‌اندواین امر نشان میدهد که روش مزبور در تغلیظ و جداسازی ویروسها بخصوص انترو ویروسها از اینگونه آبها روش ساده و در عین حال حساسی است.

جداشدن پولیوویروس واکسن ازآبها وچرخش آن دربین جمعیت از طریق فاضلابها

---

* ــ تعداد واحد عفونی ویروس برحسب پلاک ایجاد شده در یک لیتر آب
(Plaque Forming Unit/l)

قبلا نیز مورد بررسی قرارگرفته و گزارش شده است بطوریکه Zdrazilek وهمکارانش (۱۵) از نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۴۳ پرورشگاه کودک و ۲۲ فاضلاب اصلی در چکسلواکی توانستند پولیو ویروس واکسن را بعد از ۷ــ۶ ماه واکسیناسیون از راه خوراکی با ویروس زنده جدا نموده و چرخش نسبتاً طولانی پولیو ویروسهای واکسن را در بین جمعیت نشان دهند.

همچنین Bottiger (۱۶) از نمونه‌های جمع‌آوری شده بمدت دو سال از مدخل سه تصفیه‌خانه بزرگ در استکهلم سوئد، ویروس پولیو و سایر انترو ویروسها را جدا نموده و نشان داد که گردش و انتشار انترو ویروسهای انسانی موجود در یک جمع را میتوان از طریق جدا کردن عامل عفونی از فاضلاب کنترل کرده و نیز دفع پولیو ویروس را بدنبال واکسیناسیون دسته جمعی از راه خوراکی با ویروس زنده جستجو نمود.

در ایران از حدود ۱۰ سال پیش واکسیناسیون برعلیه بیماری فلج اطفال با واکسن زنده شروع و ادامه داشته و بنابراین جدا شدن پولیو ویروس واکسن از آبهای مورد آزمایش غیرمنتظره نیست و بنظر میرسد که در تهران و حومه بتدریج سوش واکسن جایگزین سوش وحشی میگردد.

آنچه از نظر آلودگی آبها با ویروس مهم است مدت زنده ماندن و دوام ویروس در آب و عدم تأثیر تصفیه‌های معمول بروی آنست که این مسئله از نظر اپیدمیولژی بیماریهای ویروسی ناشی از آب حائز کمال اهمیت میباشد.

تحقیقات اخیر Schwartzbrod (۱۴) وهمکارانش نشان داده که پولیوویروس نسبت به‌یافته‌های قبلی دیگران در حرارت ۲۴ــ۱۸ درجه سانتیگراد عمر طولانی‌تری داشته و در ۴ درجه سانتیگراد بعد از ۵۵۰ روز تیتر ویروس خیلی کم پائین میآید و از روی محاسبه ریاضی میتوان گفت که برای از بین رفتن کامل آن ۱۵ــ۱۰ سال وقت لازم است.

از نظر تصفیه نیز بررسیهای زیادی چه از مراحل مختلف آن (۱۷ و ۱۸) و چه بعد از آن یعنی از آب تصفیه شده (۱۹) صورت گرفته که همگی نشان میدهند تصفیه فیزیکی و شیمیائی فعلی قادر به‌حذف کامل ویروسهای آب نمیباشد.

برای مقایسه تأثیر کلر بروی کلی فرمها و ویروسها مطالعه‌ای توسط Shuval (۱۲) انجام گرفته که نتایج حاصله نشان داده است مقدار کلر لازم برای از بین بردن ویروسها تحت شرائط یکسان در حدود ۱۰ برابر مقدار لازم جهت کلی فرم میباشد، بنابراین آزمایش آبها از لحاظ ویروس و بکار بردن تکنیکهای بسیار دقیق حذف ویروسها از آب از مسائلی است که امروزه باید مورد توجه کامل قرار بگیرد بخصوص با توجه به مصرف روزافزون آب و کمبود آن در برخی از ممالک دنیا که ایران نیز جزو اینده از کشورهاست و مسئله

تصفیه و مورد استفاده قرار دادن آبهای مصرف شده در آینده نزدیک مطرح است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری صمیمانه خانم دکتر شکوهی رئیس آزمایشگاه سازمان آب تهران و آقای مهندس عمومی سرپرست منطقه ۵ عمرانی و آقایان رزمجو و ضرغامی کارمندان سازمان آب که با راهنمائی و ایجاد تسهیلات در امر نمونه‌برداری ما را یاری فرموده‌اند تشکر و سپاسگزاری مینماید.

جدول شماره ۱ - نتایج آزمایش مستقیم و تغلیظ با روش P.S فاضلابهای اصلی

شماره ردیف	محل نمونه برداری	تاریخ نمونه برداری	نتیجه آزمایش		تعداد پلاک در لیتر	نوع ویروس جدا شده
			مستقیم	تغلیظ		
۱	فاضلاب دانشگاه تهران	۳۶/۲/۱۱	منفی	منفی	—	—
۲	" " "	۳۶/۵/۱۶	مثبت	مثبت	۴۹	پولیو ویروس ۲
۳	فاضلاب خاصاحب قرانیه	۳۶/۲/۱۷	منفی	منفی	—	—
٤	" " "	۳۶/۵/۱۶	مثبت*	مثبت	آلودگی قارچی	پولیو ویروس ۱
٥	فاضلاب تصفیه‌شده صاحبقرانیه	۳۶/۲/۱۷	منفی	منفی	—	—
٦	" " " "	۳۶/۵/۱۶	منفی	منفی	—	—
۷	فاضلاب شهر فیروز آباد	۳۶/۲/۲٤	منفی	مثبت*	آلودگی باکتریایی	انتروویروس نامشخص
۸	" " " "	۳۶/۳/۸	مثبت	مثبت*		

* این نمونه ها بوسیله سنجر توی لوله مثبت شده اند.

جدول شماره ۲ - نتایج آزمایش مستقیم و تغلیظ با روش P.S آبهای رود خانه‌ها و یک چاه نیمه عمیق

شماره ردیف	محل نمونه برداری	تاریخ نمونه برداری	نتیجه آزمایش		تعداد پلاک در لیتر	نوع ویروس جدا شده
			مستقیم	تغلیظ		
۱	رود خانه الرم یکی از رود های سد لار	۳۶/۳/۱۱	منفی	منفی	—	—
۲	" لار " " "	" " "	منفی	مثبت	۳۲	انتروویروس نامشخص
۳	" الرم+لار " " "	" " "	منفی	منفی	—	—
٤	" سفید آب " " "	" " "	منفی	منفی	—	—
٥	" دلی چای " " "	" " "	منفی	منفی	—	—
٦	دریاچه سد لتیان (فرحناز پهلوی)	۳۶/۳/۱۷	منفی	منفی	—	—
۷	رود خانه دوآب یکی از ورهای سد لتیان در محل ده نیکنام	" " "	منفی	منفی	—	—
۸	رود خانه هلی یسون " " " انتهای قبل از الحاقیه دوآب	" " "	منفی	منفی	—	—
۹	رود خانه لواسان یکی از رود های سد لتیان در محل ده کلان	" " "	منفی	مثبت	۲٤	پولیوویروس ۱
۱۰	رود خانه لوارک یکی از رود های سد لتیان در محل کمپ کارمندان	" " "	منفی	منفی	—	—
۱۱	چاه نیمه عمیق خیابان شاهپور جهارراه مولوی	۳۵/۱۲/۲۱	منفی	منفی	—	—

جدول شماره ۳- نتایج آزمایش مستقیم و تغلیظ با روش P.S فاضلابهای سطحی (جویها)

شماره ردیف	محل نمونه برداری	تاریخ نمونه برداری	نتیجه آزمایش		تعداد پلاک در یک لیتر	نوع ویروس جدا شده
			مستقیم	تغلیظ		
۱	حوی محوطه دانشگاه تهران خیابان مرآت	۳۵/۱۲/۱۴	منفی	منفی	—	—
۲	" خیابان مولوی چهار راه شاهپور	۳۵/۱۲/۲۱	"	"	—	—
۳	" " امیریه چهارراه مختاری	۳۵/۱۲/۲۲	"	"	—	—
٤	" " نیاکان محله نازی آباد	۳٦/ ۲ /۲٤	"	مثبت		انتروویروس نامشخص
٥	" علی آباد اول کوچه هشت متری اول شاهپور غلامرضا	۳٦/ ۳ / ۸	مثبت	مثبت	٥۸	پولیوویروس ۱
٦	" ششم بهمن چهارراه گمرک	۳٦/ ٤ / ٥	منفی	منفی	—	—
۷	" آراهگاه اول خیابان بلورسازی	" " "	"	مثبت	۲٦	پولیوویروس ۱
۸	" خزانه جنب بیمارستان خزانه	" " "	"	منفی	—	—
۹	" میدان شوش جنب پمپ بنزین	" " "	"	"	—	—
۱۰	" اعدام (محمدیه) جنب بانک صادرات	" " "	"	مثبت	۱٦	پولیو ویروس ۱
۱۱	" خیابان پهلوی بالا تراز میدان ونک	۳٦/ ٤ /۱٤	"	منفی	—	—

جداسازی ویروس از آب

دنباله جدول شماره ۳- نتایج آزمایش مستقیم و تغلیظ با روش P.S فاضلابهای سطحی (جویها)

شماره ردیف	محل نمونه برداری	تاریخ نمونه برداری	نتیجه آزمایش		تعداد پلاک در یک لیتر	نوع ویروس جدا شده
			مستقیم	تغلیظ		
۱۲	جوی خیابان امیرآباد سه راه فرحزاد	۳۶/۴/۱۴	منفی	منفی	—	—
۱۳	" " شهرآرا جنب پارک شهرآرا	" " "	"	"	—	—
۱۴	" " تاج نرسیده به مرکز برق آلستوم	" " "	"	"	—	—
۱۵	" " کورش کبیر دوراهی قلهک	" " "	"	"	—	—
۱۶	" قیطریه چهارراه دولت	۳۶/۵/۱۶	"	"	—	—
۱۷	" بلوار الیزابت چهارراه کاخ	" " "	"	"	—	—
۱۸	" محله نارمک جنب مسجد جامع	۳۶/۶/۲۶	"	"	—	—
۱۹	" میدان شهناز اول خیابان شهناز	" " "	"	"	—	—
۲	" خیابان ژاله اول ده متری کوکاکولا	" " "	"	"	—	—
۲۱	" " فردوسی چهارراه استانبول	" " "	"	"	—	—
۲۲	" " آذربایجان اول خیابان خوش	" " "	"	"	—	—

جدول شماره ٤ ـ میزان آلودگی آبهای مورد آزمایش

شماره ردیف	نوع آب مورد آزمایش	تعداد نمونه مورد آزمایش	تعداد نمونه‌های مثبت	درصد آلودگی
١	فاضلابهای اصلی	٨	٤	٥٠٪
٢	رود خانه ها	١٠	٢	٢٠٪
٣	چاه نیمه عمیق	١	٠	٠
٤	فاضلابهای سطحی (جویها)	٢٢	٤	١٨/١٪
٥	جمع	٤١	١٠	٢٤/٣٪

جداسازی ویروس از آب

REFERENCES

1. Detection of enteric viruses in water and wastewater, standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Assoc. 968, 1975.
2. Rota viruses. Lancet, 2:1083, Nov. 1974.
3. J.W. Mosley in transmission of viruses by water rute (G. Berg. Ed), page: 5, wiley-interscience New York, 1967.
4. S.A. Plotkin and M. Katz in transmission of viruses by water rute (G. Berg, Ed) page: 151 wiley-interscience New York, 1967.
5. J.L. Melnic, et al coxsakie viruses from sewage. Amer. J. Hyg. 59:185, 1954.
6. B.D. Rawal, et al. A simple tissue culture method for detection of viruses in drinking water: sample incorporation method. Environ. Health. 6:234, 1964.
7. D.O. Cliver, et al. Ultracentrifugation in the concentration and detection of enteroviruses. Ap.l microbiol. 13:387, 1965.
8. W. Jakubowski, et al. Comparative study of four microporous filters for concentration of polioviruses from sewage. App. Microbiol. 32(5):653, 1976.
9. S.H. Robenstein, et al. Freeze concentration of viral agents from large volumes of water. J. Amer. Water Works Assoc. 63(5): 301, May 1971.
10. J. Konowalchuk, et al. Concentration of enteric viruses from water with lettuce extract. App. Microbiol. 28(4): 717, Oct. 1974.
11. H.I. Shuval, et al. The detection of enteric viruses in water environment. Water Pollution Microbiology. (R. Mitchell, Ed.) Pg. 347, 1972.
12. H.I. Shuval. Detection and control of enteroviruses in the water environment. Water quality research: 47–71, Ann. Arbor London Ann Arbor Humphrey Science publishers 1970.
13. D.R. Dahling, et al. Health Lab. Sci. 11(4): 275, Oct. 1974.
14. J. Schwartzbrod, et al. Etude du conpartment du virus polio-myelitique de type I dans differents milieux hydriques. Rev.

Epidem. Med. Soc. 23(4-5):235, 1975.

15. J. Zdrazilek, et al. Presence of Poliovirus and other enteroviruses in sewage. Bull. Org. Mond. Sante, 50:562, 1974.
16. M. Bottiger. Experiences from investigations of virus isolations from sewage. Arch. Ges. Virusforsch, 41:80, 1973.
17. N.A. Clark, et al. Human enteric viruses in sewage. Health Lab. Sci. 1(1): 44, Jan. 1964.
18. Foliquet, J.M. et al. La pollution virale des Edux usees, de surface et d'alimentation. Bull. Org. Mond. Sante, 35:737, 1966.
19. Coin, L. et al. Modern Microbiological and Virological Aspects of Water Pollution in advance Water Pollution Research. Proc. Second Intl. Conf. (O. Jaag, editor). Pergamon Press, London , 1964.