

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 روتاویروس های انسانی شایع ترین عامل اسهال حاد کودکان در سطح جهان است. روتاویروس ها به طور گسترده ای در آب های محیطی پراکنده اند. 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 نمونه ها با روش رسوبی تغلیظ شدند. سپس گروه A روتاویروس های انسانی با استفاده از تکنیک الایزا (ELISA) شناسایی شدند.

یافته ها: از مجموع نمونه های مورد پژوهش، در ۶ نمونه (۷/۸۹٪) روتاویروس های 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 نمونه های آلوده به روتاویروس ها در فصل های تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۱ نمونه (۱۶/۶۶٪)، ۳ نمونه (۵۰٪) و ۲ نمونه (۳۳/۳۳٪) بود.

نتیجه گیری: این پژوهش، آلودگی آب های محیطی به گروه A روتاویروس های انسانی را نشان داد. از این رو پایش مداوم سیستم های تصفیه فاضلاب و آب رودخانه ها به منظور شناسایی روتاویروس ها ضروری است.

واژگان کلیدی: گروه A روتاویروس های انسانی، آب های محیطی، روش رسوبی، الایزا.

مقدمه

ایجاد گاستروانتریت منتقله از راه آب می شوند (۲). گروه A روتاویروس های انسانی در حال حاضر شایع ترین عامل گاستروانتریت حاد در نوزادان و کودکان کم سن و سال در سرتاسر جهان هستند (۳). روتاویروس های انسانی عامل بالاترین عفونت زایی در میان ویروس های قابل انتقال از طریق آب (آب زاد) هستند (۴). تخمین زده می شود که سالیانه ۳ تا ۵ میلیارد حمله اسهال در کودکان زیر ۵ سال در آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین اتفاق می افتد که منجر به ۱ میلیون مرگ می شود. 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 در سرتاسر جهان به وسیله روتاویروس ها ایجاد شده

بیماری های منتقله از راه آب نگرانی عمده ای در سطح جهان هستند که هزینه های زیادی را به کشورهای مختلف تحمیل می کنند. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۲/۲ میلیون نفر در سال، به دلیل بیماری های منتقله از راه آب جان خود را از دست می دهند که حدود ۱/۴ میلیون نفر از این تعداد را کودکان تشکیل می دهند (۱). انواع مختلفی از عوامل بیماری زای رودهای شامل باکتری ها و ویروس ها سبب

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

هدف پایش محیطی گروه A روتاویروس های انسانی در سیستم های تصفیه فاضلاب شهری، فاضلاب بیمارستانی و آب رودخانه های کرج و برغان در استان البرز انجام شد.

مواد و روشها

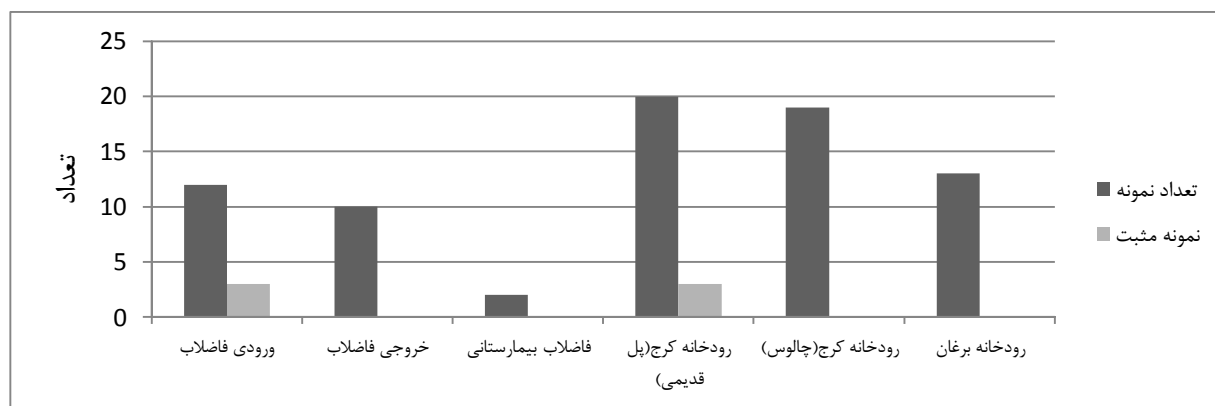
این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۷۶ نمونه شامل ورودی فاضلاب (۱۲ نمونه) و خروجی فاضلاب (۱۰ نمونه) جمع آوری شده از چهار تصفیه خانه ی استان البرز، فاضلاب بیمارستانی (۲ نمونه)، رودخانه ی کرج محدوده پل قدیمی (۲۰ نمونه)، رودخانه کرج محدوده ورودی جاده چالوس (۱۹ نمونه) و رودخانه برغان (۱۳ نمونه) انجام شد. نمونه های فاضلاب شهری با همکاری آزمایشگاه مرکزی آب و فاضلاب کرج و نمونه های فاضلاب بیمارستانی و رودخانه ای با مراجعه حضوری جمع آوری شدند. نمونه گیری در دوره منظم ۷ ماهه (مردادماه ۱۳۹۵ تا بهمن ماه ۱۳۹۵) انجام گرفت. حجم تمامی نمونه ها یک لیتر بود که در ظروف پروپیلنی در پوش دار استریل جمع آوری شدند و در جعبه سرد (Ice box) حاوی یخ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 بطری ها ثبت شد.

تغلیظ به روش رسوبی

تمامی نمونه ها 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 سانتی گراد سانتریفیوژ انجام شد. در مرحله بعد، به مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ، به منظور از بین بردن باکتری ها و قارچ ها به ازای هر ۴ میلی لیتر از نمونه های تغلیظ شده، ۱ میلی لیتر کلروفورم خالص (Merck، آلمان) اضافه شد. نمونه ها به ترتیب در ۲۰۰ xg و ۲۰۰۰ xg به مدت ۲۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه و در دمای ۵ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. پس از پایان سانتریفیوژ، فاز آبی بالایی با کمک پی پت پلاستیکی استریل جدا و به لوله فالکون استریل منتقل شد. تمامی نمونه ها تا انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تشخیص روتاویروس های گروه A

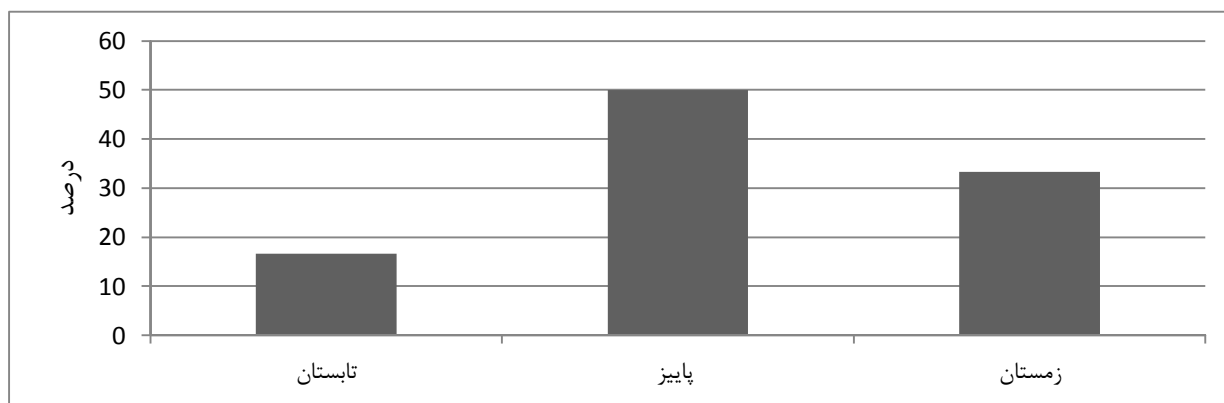
است. روتاویروس ها بر اساس شاخص های آنتی ژنی روی پروتئین ساختاری VP6 به ۷ گروه A تا G به اضافه یک گروه غیر قطعی H طبقه بندی می شوند (۵). روتاویروس ها متعلق به خانواده رتوویریده بوده و دارای تقارن بیست وجهی، فاقد پوشینه و دارای کپسید سه لایه هستند. ژنوم آنها RNA دو رشته ای شامل ۱۱ قطعه است که ۶ پروتئین ساختاری ویروسی (VP) و ۶ پروتئین غیر ساختاری (NSP) را کد می کند (۵، ۶). گروه A روتاویروس ها با توجه به نوع دو پروتئین VP4 و VP7 واقع بر لایه خارجی کپسید که هدف اصلی آنتی بادی های خنثی کننده ضد ویروس هستند، به ترتیب به ژنوتیپ های P و G تقسیم می شوند. با توجه به اینکه مسیر انتقال روتاویروس از طریق تماس مستقیم، مدفوعی-دهانی و یا از طریق آب و مواد غذایی آلوده به مدفوع انسانی یا حیوانی است؛ بنابراین تصفیه فاضلاب ها و رعایت مسائل بهداشتی ضروری به نظر می رسد (۵، ۷، ۸). واکسیناسیون به عنوان تنها راه پیشگیری از ابتلا به اسهال روتاویروسی و تلفات در کودکان مطرح است (۳). روتاویروس ها در آب های زائد، فاضلاب تیمار شده، رسوبات فاضلاب، آب های سطحی، آب های زیرزمینی و همچنین در آب های آشامیدنی شناسایی شده اند. این ویروس ها به تعداد بسیار زیاد از افراد بیمار دفع می گردند اما زمان ورود به آب و فاضلاب بسیار رقیق می شوند. برای برآورد خطر سلامتی نسبت داده شده به روتاویروس ها در آب های آلوده شده با فاضلاب روش های حساس و مطمئنی مورد نیاز است (۹، ۱۰، ۱۱). زنده ماندن و ثبات روتاویروس ها در انواع مختلف آب های محیطی و مقاومت آن ها در برابر فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی و شرایط نامناسب سیستم های تصفیه آب سبب می شود که انتقال آنها از طریق آب بسیار مهم جلوه کند. توزیع روتاویروس ها در فاضلاب و آب های آلوده به دو مورد میزان بیماری های ویروسی در جمعیت و در دسترس بودن سیستم پردازش فاضلاب شهری بستگی دارد. اهمیت انجام مطالعات و در نظر گرفتن نتایج بررسی های 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 زمین ها و مزارع زیر کشت نیز دارای اهمیت است (۲، ۱۲). با توجه به وجود نداشتن هیچ گزارشی از پایش محیطی روتاویروس ها در استان البرز، پژوهش حاضر با



نمودار ۱. فراوانی روتاویروس‌های شناسایی شده بر اساس محل نمونه‌گیری



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



نمودار ۳. توزیع فراوانی فصلی و نسبت روتاویروس‌های شناسایی شده

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 الیزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد؛ سپس Cut off point محاسبه

به منظور سنجش آنتی ژن گروه A روتاویروس های انسانی در نمونه‌ها به روش الیزای 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

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 روش‌های مولکولی به ویژه PCR و همچنین بررسی نتایج پژوهش‌هایی که در آن‌ها از روش RT-PCR به منظور تشخیص روتاویروس‌های انسانی گروه A استفاده شده است، به دلیل استفاده از پرایمرهای اختصاصی، حساسیت و دقت بالا، استفاده از این روش برای تایید نتایج توصیه می‌شود. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات در داخل و خارج از کشور، شیوع روتاویروس در ماه‌های 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

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، $P < 0/05$ 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 نمونه‌ها، نتایج آزمون دقیق فیشر نشان داد که بین شیوع روتاویروس و محل نمونه‌گیری (ورودی فاضلاب و آب‌های سطحی (رودخانه کرج و برغان)) اختلاف معناداری وجود نداشت ($p=0/074$) (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 نمونه‌گیری اختلاف معناداری وجود نداشت ($p=0/889$).

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)، کالسی 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 آن‌جا که میزان ویروس‌ها در محیط‌های آبی پایین است، انتخاب

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 جمع‌آوری 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 روتاویروس‌ها را نشان داد. این امر ضرورت پایش محیطی عوامل بیماری‌زای روده‌ای 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 همکاری‌هایشان کمال تشکر را دارند.

مثبت (آلوده به روتاویروس) گزارش شد، ولی هیچ نمونه مثبت روتاویروسی مربوط به خروجی فاضلاب مشاهده نشد. در سایر پژوهش‌های 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 تصفیه‌خانه‌های 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 روتاویروس‌ها 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 نمونه‌گیری 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.

REFERENCES

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

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 Amazonia, 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.