Molecular monitoring of water resorts in Mazandaran province with some adenovirus strain

Fatemeh jamali fard[1], **Fatemeh roodbari[1]***, Salman ahmady asbchin[1]
Department of Pathogenic Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received Date:2025.05.10 Accepted Date:2025.09.05

Abstract

Adenoviruses are associated with various diseases such as respiratory infections and eye infections. A variety of biological contaminants can reduce water quality. *Adenoviruses* are considered a suitable model for assessing the pollution of aquatic environments due to their environmental resistance and abundance throughout the year. Therefore, this study investigated *adenoviruses* and their relationship with water pollution. For this purpose, 60 samples were collected from recreational water areas. The temperature and pH of the water samples were also measured and filtered. Genome extraction was performed according to the kit instructions. Primers for types 3, 7, 40, and 41 were designed and examined in the BLAST program. PCR was used to identify the viruses. In this study, using general primers, 9 samples were positive, but specific serotypes were not identified. There was no statistically significant difference between pH and the presence of the virus, but there was a significant relationship between low temperatures and the prevalence of the virus. Although specific serotypes were not identified in this study, the presence of adenovirus in the waters studied was confirmed. On the other hand, the presence of *adenovirus* in pools containing clean water highlights the need for greater monitoring by authorities.

Keywords: *Human adenovirus*, recreational waters, PCR, filtration

* roudbari@umz.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

EXTENDED ABSTRACT

Introduction:

Water is considered an important element in human activities because it is needed for drinking, irrigation of crops, recreational activities, and industrial uses. It is necessary to protect this natural resource against any pollution to prevent the spread of diseases Silva Lanna. Studies show that more than 30% of developing countries do not have access to quality drinking water sources, and about 663 million people use untreated water, including underground and surface water. It was estimated in 2012; 1.8 billion people, which constituted approximately 25% of the population, consumed contaminated water containing viruses, protozoa and bacteria, which led to various diseases, especially gastroenteritis. Was. A waterborne disease is diarrhea with 1.7 billion reported cases per year, resulting in the death of 525,000 young children Adenoviridae virus family with non-enveloped icosahedral virions contain linear double-stranded DNA genomes and are 90-110 nm in diameter. Its members infect vertebrate hosts and are divided into six genera. The identified adenoviruses are divided into different types based on hemagglutination, carcinogenesis in rodents, DNA homology, and genome organization. Human adenoviruses are also classified into seven types A and more than 100 subtypes, including types 1-52 and genotypes 53-103. Adenovirus types 3 and 7 belonging to subgenus B1 cause lesions that are usually self-limiting. Epidemics of these viruses show that they are the cause of respiratory diseases in children under five years of age worldwide. Intestinal adenovirus types 40 and 41 belonging to the F species are considered to be important agents of gastroenteritis in children and are pathogenically similar to rotavirus and Shigella. Adenoviruses occur in many water environments and these viruses are exceptionally resistant to purification and disinfection processes. To prevent the spread of these microorganisms, the Environmental Protection Agency (USEPA) published a list of water system contaminants, and human adenovirus is one of the nine microbes on this list. Fecal indicator bacteria are relatively easy to measure. However, recreational waters meeting such bacterial standards may still contain enteric viral pathogens, while fecal indicator bacteria fail to predict their presence. In addition, the concentration of these bacteria often does not correlate with the concentration of the virus, which may be due to the increased resistance of viruses to destructive processes compared to bacteria. Human enteroviruses are frequent contaminants of recreational waters. However, viral contamination in recreational waters is rarely directly monitored because of time-consuming cell culture assays. and molecular techniques tend to overestimate the concentration of infectious viruses in a sample. Also, due to the high cost of laboratory equipment and reagents, it can be not easy to detect viral agents in environmental samples. In this study, the filtration method used membrane filters to concentrate viruses from water samples. This method can be used as a useful tool for recovering viruses from environmental samples and allows the detection of viruses by molecular methods. Because adenoviruses may cause serious and even fatal illnesses, particularly in immunocompromised individuals, children, and the elderly, monitoring for such viruses in recreational waters, especially swimming pools, is essential. For this purpose, in this research, the presence of adenoviruses and their relationship with water were investigated.

Method and material:

Between April and May 2023, 60 recreational water samples (pool, sea, river, and wetland) were collected in Mazandaran province. (Figure 1 Sample collection) locations Sampling bottles were autoclaved, and one milliliter of sodium thiosulfate was added to the bottles to neutralize chlorine. temperature Water samples were measured on site and water samples were taken from a depth of 15 to 30 cm. Water samples were taken in one-liter volumes. Then the samples were transferred to the Mazandaran University virology laboratory with ice bags until the time of testing. After the transfer, the pH of the samples was also measured. In all cases, the full details of each sample, including sampling location, sample type, date, and time, were recorded in a prepared questionnaire. The water samples are kept in the refrigerator for 24 hours to settle the mud and their extra substances. Then, filtration was done using a filtration system and a paper filter of 0.45 micrometers and 0.22 micrometers. First, the samples were passed through a 0.45 filter to separate the diseased water from them, then the water samples were passed through a 0.22 filter to collect the viruses on this filter. The filter paper was placed on a plate and washed thoroughly with one milliliter of sterile PBS solution. The virus genome was extracted from water samples using a special nucleic acid extraction kit of Mehrpardazan Samin Environment Company according to the manufacturer protocol. In order to perform the PCR reaction, the desired primers (universal and specific) were designed by primer designer software such as Oligo-7 and by reading the articles and were converted in the Blast program and then ordered to sinaclon. Clinical samples of human adenoviruses are used as positive control. These samples were given to us as gifts by respected professors (Dr. Hosseini, Dr. Abdali, Mrs. Dr. Bamdad and Mrs. Dr.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

Meshkat).
Result: In this study, using the general adenovirus primer, 9 samples (pool 30%, swamp 14%, sea 9%, and river samples 12.5%) were positive, but the specific serotypes investigated caused respiratory and digestive diseases and were not detected.
Conclusion:
Statistically, there was no significant difference between pH and the presence of virus, but there was a significant relationship between temperature and virus prevalence. Although specific serotypes were not identified in this research, the presence of adenovirus in recreational water was confirmed. On the other hand, the presence of adenovirus in pool water, which according to society's perception contains clean water, reveals the need for more monitoring by health officials in the field of recreational water, especially pools.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

پایش مولکولی آلودگی تفریحگاه های آبی استان مازندران با برخی از سویه های *آدنوویروس*

فاطمه جمالی فرد[۱] ، **فاطمه رودباری**[۱*] ، سلمان احمدی اسب چین[۱]

۱. دپارتمان میکروب های بیماری زا ، دانشگاه مازندران، بابلسر ، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۴/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۰۶/۱۴

چکیده

آدنوویروس‌ها با بیماری‌های مختلفی مانند عفونت‌های تنفسی و عفونت‌های چشمی ارتباط دارند. انواعی از آلاینده‌های زیستی می‌توانند کیفیت آب را کاهش دهند. *آدنوویروس‌ها* با توجه به مقاومت محیطی و فراوانی آن‌ها در طول سال ، به عنوان یک الگوی مناسب جهت ارزیابی آلودگی محیط‌های آبی در نظر گرفته می‌شوند. بدین سبب در این پژوهش به بررسی *آدنوویروس‌ها* و ارتباط آن‌ها با آلودگی آب پرداخته شد. بدین منظور تعداد ۶۰ نمونه از آب‌های مناطق تفریحی جمع‌آوری شد . دما و pH نمونه‌های آب هم اندازه‌گیری و فیلتراسیون انجام شد. استخراج ژنوم مطابق دستورالعمل کیت انجام گردید. پرایمرهای تیپ‌های ۳و۷و ۴۰و۴۱ طراحی و در برنامه بلاست بررسی شد. و جهت شناسایی ویروس‌ها از روش PCR استفاده گردید.در این مطالعه با استفاده از پرایمر عمومی ، تعداد ۹ مورد از نمونه‌ها مثبت شدند اما سروتیپ‌های اختصاصی شناسایی نشدند. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین pH و حضور ویروس نبود ولی بین دماهای پایین و شیوع ویروس رابطه معناداری وجود داشت. اگرچه در این تحقیق سروتیپ‌های اختصاصی ، شناسایی نشدند اما حضور *آدنوویروس* در آب‌های مورد بررسی، تایید شد. که هدف اصلی پژوهش نیز شناسایی حضور ویروس بود از طرفی حضور *آدنوویروس* در استخرها که حاوی آب‌های پاک است لزوم نظارت بیشتر مسئولین را آشکار می‌سازد.

کلید واژه ها : آدنوویروس انسانی، آب های تفریحی، PCR، فیلتراسیون

* roudbari@umz.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

مقدمه

آب به عنوان عنصر مهم در انجام فعالیت‌های انسانی در نظر گرفته می‌شود زیرا برای آشامیدن، آبیاری محصولات کشاورزی، فعالیت‌های تفریحی و مصارف صنعتی مورد نیاز است. حفاظت از این منبع طبیعی ، در برابر هر گونه آلاینده برای جلوگیری از شیوع بیماری‌ها ضروری است(1).

مطالعات نشان می‌دهد که بیش از ۳۰ درصد کشورهای در حال توسعه به منابع آب آشامیدنی با کیفیت، دسترسی ندارند و حدود ۶۰۰ میلیون نفر از آب تصفیه نشده از جمله آب‌های زیرزمینی و سطحی استفاده می‌نمایند (2).

در سال ۲۰۱۲ تخمین زده شد ؛ ۱/۸ میلیارد نفر که تقریباً ۲۵ درصد از جمعیت کل جهان را تشکیل می‌دادند، آب آلوده حاوی ویروس‌ها، تک یاخته‌ها و باکتری‌ها را مصرف می‌کردند که منجر به انواع بیماری‌ها به ویژه گاستروانتریت شده بود. یک بیماری منتقله از طریق آب، اسهال با ۱.۷ میلیارد مورد گزارش شده در سال است که منجر به مرگ ۵۲۵۰۰۰ کودک خردسال می‌شود(3).

آدنوویریده خانواده‌ای از ویروس‌ها با ویریون‌های ایکوساهدرال[1] بدون پوشش و حاوی ژنوم‌های خطی DNA دورشته‌ای است و قطر آن‌ها ۹۰ تا ۱۱۰نانومتر است . اعضای آن انواع میزبان‌های مهره‌دار را آلوده می کنند و به شش جنس تقسیم می‌شوند. *آدنوویروس‌های* شناسایی شده، بر اساس خواص هماگلوتیناسیون[2]، سرطان‌زایی در جوندگان، همسانی DNA و سازماندهی ژنوم به گونه‌های مختلفی تقسیم شده‌اند. *آدنوویروس‌های* انسانی نیز به هفت گونه A-G و بیش از ۱۰۰ زیرگونه، از جمله تیپ‌های ۵۲-۱ و ژنوتیپ‌های ۵۳-۱۰۳ طبقه‌بندی می‌شوند(4). *آدنوویروس‌های* روده‌ای تیپ ۴۰ و ۴۱ متعلق به گونه‌ی F از علل مهم گاستروانتریت در کودکان مطرح شدند و از نظر بیماری‌زایی بعد از *روتاویروس*[3] و *شیگلا*[4] قرار دارند(5).

آدنوویروس‌ها در بسیاری از محیط‌های آبی وجود دارند و این ویروس‌ها به طور استثنایی در برابر فرآیندهای تصفیه و گندزدایی مقاوم هستند(6).

برای جلوگیری از انتشار این میکروارگانیسم‌ها، آژانس حفاظت از محیط زیست (USEPA) فهرستی از آلاینده‌های سیستم آب را منتشر کرد و *آدنوویروس* انسانی یکی از ۹ میکروب موجود در این لیست است(7) .

اندازه‌گیری باکتری‌های شاخص مدفوعی نسبتاً آسان است. با این حال، آب‌های تفریحی با چنین استانداردهای باکتریایی ممکن است همچنان حاوی پاتوژن‌های ویروسی روده‌ای باشند، در حالی که باکتری‌های شاخص مدفوعی قادر به پیش بینی حضور آن‌ها نیستند. علاوه بر این، غلظت این باکتری‌ها اغلب با غلظت ویروس همبستگی ندارد که ممکن است به دلیل افزایش مقاومت ویروس‌ها در برابر فرآیندهای تخریبی در مقایسه با باکتری‌ها باشد(8).

ویروس‌های روده‌ای انسانی آلاینده‌های همیشگی آب-های تفریحی هستند(9) . با این حال، آلودگی ویروسی در آب‌های تفریحی به ندرت مستقیماً نظارت می‌شود، زیرا سنجش‌های کشت سلولی زمان‌بر هستند. همچنین به دلیل هزینه بالای تجهیزات و معرف‌های آزمایشگاهی، تشخیص عوامل ویروسی در نمونه‌های محیطی می‌تواند دشوار باشد(10).

از آنجایی که عفونت با *آدنوویروس* ممکن است باعث ایجاد بیماری‌های جدی و حتی کشنده به خصوص در افراد دارای نقص ایمنی، کودکان و افراد مسن شود ، نظارت بر چنین ویروس‌هایی در آب‌های تفریحی به ویژه استخرها مهم

[1] icosahedral
[2] Hemagglutination
[3] *Rotavirus*
[4] Shigella

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

می‌باشد.*آدنوویروس ها* نسبت به بسیاری از ویروس های دیگر ، مقاومت بیشتری در برابر شرایط و فرایندهای تصفیه آب دارند.این ویژگی باعث می شود که حتی پس از مراحل گندزدایی و فیلتراسیون ، همچنان قابل شناسایی باشند .

.برخلاف برخی ویروس ها که فقط در فصل های خاصی شیوع دارند ، آدنوویروس ها در تمام طول سال در منابع آبی یافت می شوند این ویژگی آنها را به شاخصی پایدار و قابل اعتماد تبدیل کرده است روش هایی مثل PCR و Real-time PCR امکان شناسایی دقیق و سریع آدنوویروس ها را حتی در غلظت های پایین فراهم می کنند این موضوع برای پایش کیفیت آب بسیار مهم است . شایان ذکر است بررسی *آدنوویروس* در آب‌های تفریحی استان مازندران انجام نشده‌است. بدین سبب در این پژوهش به بررسی وجود *آدنوویروس‌ها* و ارتباط آن‌ها با آلودگی آب پرداخته شد.

در این مطالعه، از روش فیلتراسیون، با استفاده از فیلترهای غشایی برای تغلیظ ویروس‌ها از نمونه‌های آب استفاده شد. این روش به عنوان ابزاری مفید برای بازیابی ویروس‌ها از نمونه‌های محیطی می تواند استفاده شود و امکان تشخیص ویروس‌ها را با روش‌های مولکولی فراهم می‌نماید.

۲. مواد و روش‌ها

در بازه زمانی فروردین تا اردیبهشت سال ۱۴۰۲ مقدار ۶۰ عدد نمونه آب‌های تفریحی (استخر ، دریا ، رودخانه و تالاب) در سطح استان مازندران جمع‌آوری شد. (شکل ۱ محل‌های جمع‌آوری نمونه‌ها) بطری‌های نمونه برداری اتوکلاو شدند و مقدار یک میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم[1] به منظور خنثی سازی کلر به بطری‌ها اضافه شد. دمای نمونه‌های آب در محل، اندازه گیری شد و از عمق ۱۵تا ۳۰ سانتی متری نمونه آب برداشته شد . نمونه‌های آب در حجم‌های یک لیتری گرفته شدند و سپس نمونه‌ها تا زمان آزمایش در کنار کیسه‌های یخ به یخچال آزمایشگاه ویروس شناسی دانشگاه مازندران انتقال داده‌شدند. بلافاصله بعد از انتقال، pH نمونه‌ها هم اندازه‌گیری شد. در تمامی موارد، مشخصات کامل مربوط به هر نمونه شامل محل نمونه برداری، نوع نمونه، تاریخ و ساعت در دفترچه‌ای ثبت شدند.

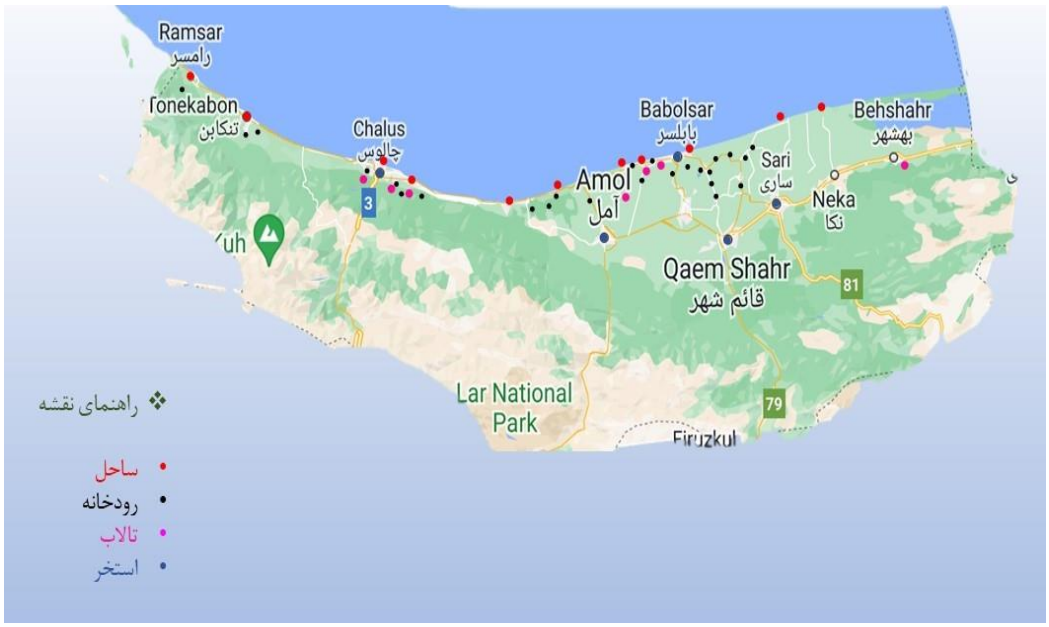
نمونه‌های آب به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا گل و لای و مواد اضافی آن‌ها ته‌نشین شود. سپس به وسیله سیستم فیلتراسیون و فیلترهای کاغذی ۰/۴۵ میکرومتر و ۰/۲۲ میکرومتر فیلتراسیون انجام شد؛ ابتدا نمونه‌های آب از فیلتر ۰/۴۵ عبور داده‌شدند تا آلودگی باکتریایی از آن‌ها جدا شود در ادامه مجددا نمونه‌های آب از فیلتر ۰/۲۲عبور داده‌شدند تا ویروس‌ها روی این فیلتر جمع‌آوری شوند سپس کاغذ فیلتر در یک پلیت قرار داده شد و با یک میلی‌لیتر محلول PBS[2] استریل کاملا شسته شد.

ژنوم ویروس از نمونه‌های آب با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی از آب و فاضلاب شرکت مهرپردازان محیط زیست ثمین واقع در مرکز رشد دانشگاه علوم پزشکی قم ، طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج گردید.

[1] Sodium thiosulfate

[2] Phosphate buffered saline

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]



شکل ۱ : نقشه استان مازندران. موقعیت جغرافیایی محدوده‌ی نمونه‌های آب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران در این مطالعه

جدول ۱: مثبت و منفی شدن نمونه ها از نظر وجود ویروس

ویروس	استخرشنا	تالاب	دریا	رودخانه	مجموع
مثبت	3	1	1	4	9
منفی	7	6	10	28	51
کل	10	7	11	32	60

جهت انجام واکنش PCR ، پرایمرهای مورد نظر (یونیورسال[1] و اختصاصی) توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک طراحی پرایمر همچون Oligo-7 و با مطالعه مقالات طراحی و در برنامه بلاست بررسی شد و سپس به شرکت سیناکلون سفارش داده‌شدند (توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است). به عنوان کنترل مثبت از نمونه های کلینیکی *آدنوویروس‌های* انسانی استفاده شد این نمونه-ها توسط اساتید محترم (دکتر حسینی، دکتر عبدلی، خانم دکتر بامداد و خانم دکتر مشکات) به صورت هدیه در اختیار ما قرار گرفت. از نمونه های کنترل مثبت تنفسی (آدنو ۵) برای آدنوهای ۳و۷ و نمونه گوارشی برای ۴۰و ۴۱ استفاده شد . وبرای کنترل منفی از آب کاملا عاری از اسید نوکلئیک استفاده شد .

واکنش با حجم نهایی ۱۵ mL، شامل Master Mix ۵/۷µL، ۵/۴ µ آب تزریقی استریل، ۵/۰µL از هر پرایمر ریورس[2] و فوروارد[3] و ۲µL DNA الگو انجام گردید.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر[4] با شرایط دمایی ۵ min واسرشت‌شدن اولیه در دمای ^{C}۹۵º، و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ^{C}۹۵º به مدت ۳۰ ثانیه

[1] universal
[2] Reverse
[3] Forward
[4] Thermocycler

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

، اتصال در دمای $57^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۲۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگارز[1] ۱٪ حاوی رنگ سیف[2] منتقل و الکتروفورز[3] گردید . از لدر DNA مدل ۱۰۰ جفت بازی و ۱۰۰۰جفت بازی استفاده شد. و در نهایت از ژل با دستگاه ترانس‌لومیناتور[4] تصویر برداری شد. توالی پرایمر ها از روی بخش محافظت شده ژن هگزون طراحی شده اند.

جدول۲: توالی آغازگرهای عمومی و اختصاصی *آدنوویروس*

پرایمر	توالی پرایمر	دمای ذوب پرایمر(°c)	اندازه محصول pcr(bp)
AD-F	TGCAACATGACMAARGACTGG	۵۹.۸۲	۱۳۲
AD-R	RCTCATRGGCTGGAAGTT	۵۵.۹۷	
AD3-F	CCGGGAAGACAATACCTAC	۵۶.۶۷	۷۰۳
AD3-R	TGCATGAGAGTTATCAGACG	۵۵.۲۵	
AD7-F	CGAAGAGGCAATGTGTAC	۵۳.۶۹	۴۹۶
AD7-R	TGGGACTGGATCTAGTGC	۵۵.۹۷	
AD40-F	AACGCTGCGGGAAGAATAC	۵۶.۶۷	۱۱۲۶
AD40-R	CGAGACTGCTTTGGAGAATC	۵۷.۳۰	
AD41-F	CGCCACCGATACGTACTTC	۵۸.۸۳	۴۹۶
AD41-R	TTGTCAGTGGCACCAACTTCAC	۶۰.۲۵	

آنالیز داده‌ها

در این مطالعه نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS,23 و آزمون Anova انجام گرفت. مرز معنی داری در$p \leq ۰.۰۵$ قرار داده شد.در دمای ۲۶ : سه تا نمونه مثبت ، دمای ۲۵ : سه نمونه مثبت ، دمای ۲۶ : یک نمونه مثبت ، دمای ۲۴ : یک نمونه مثبت ، دمای ۲۷ : یک نمونه مثبت داشتیم پس ضریب همبستگی پیرسون به صورت تقریبی۰/۷۶ – می‌باشد که نشان می‌دهد با افزایش دما تعداد نمونه‌های مثبت کاهش پیدا کرده است .

۳. یافته ها

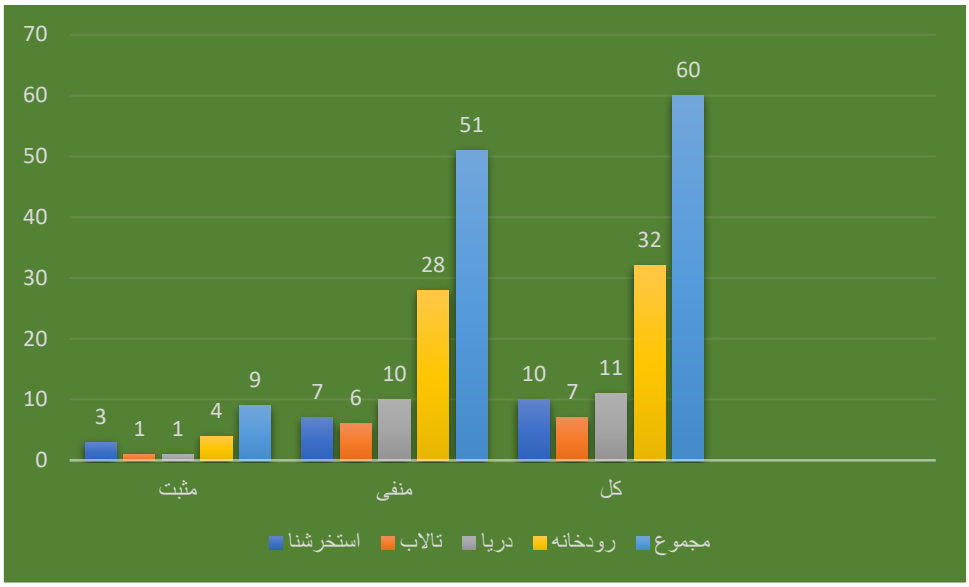
نتایج حاصل از الکتروفورز در ژل یک‌درصد بررسی شد .طبق نتایج به دست آمده از ۶۰ نمونه، ۹ نمونه از نظر حضور ویروس *آدنو* مثبت بودند. ولی سروتیپ‌های اختصاصی*۳، ۷*، ۴۰ و ۴۱ در بین نمونه‌ها مشاهده نشد.که میتواند به دلیل غلظت پایین این سروتیپ های اختصاصی باشد چون در نمونه های آبی غلظت ویروس بسیار پایین است .سروتیپ های اختصاصی ۳و۷ بیشتر با عفونت های تنفسی و سروتیپ های ۴۰و ۴۱ با عفونت های گوارشی مرتبط هستند اگر منبع

[1] Agarose gel
[2] Safe stain
[3] Electrophoresis
[4] Trans lluminator

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

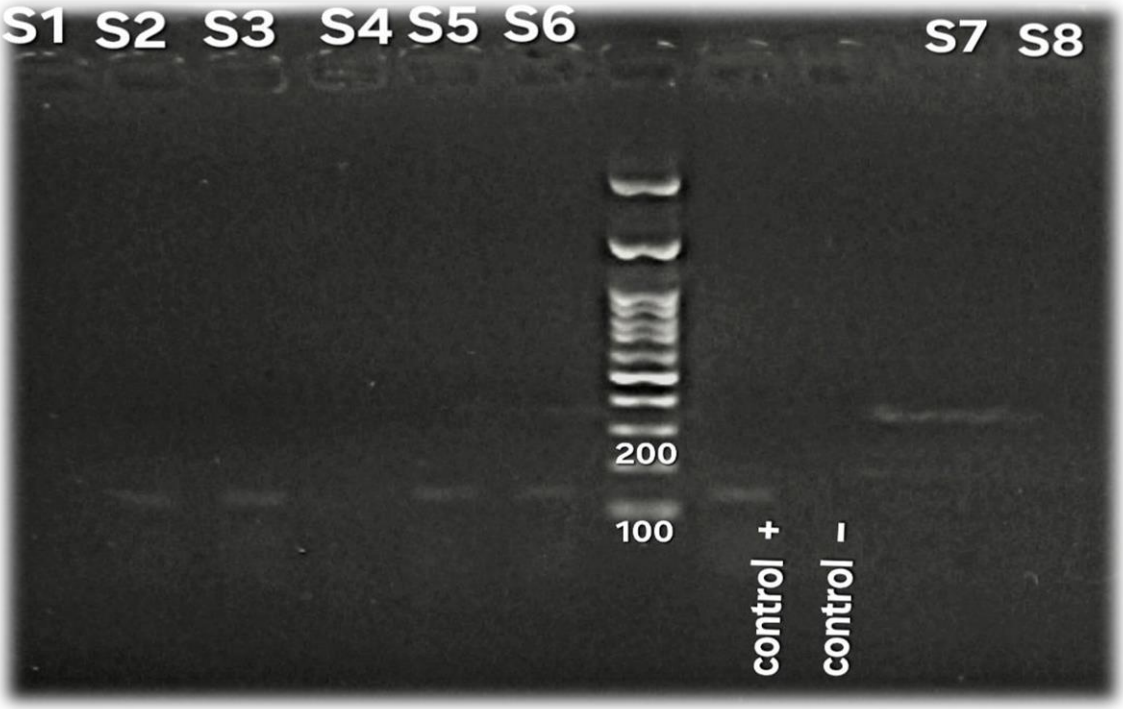
آلودگی آب از نوع تنفسی نبوده باشد احتمال حضور این سروتیپ ها کمتر است .اگر آلودگی از فاضلاب انسانی نبوده باشد مثلا از حیوانات یا منابع غیر انسانی ، ممکن است این سروتیپ ها اصلا وارد آب نشده باشند .و همچنین سروتیپ های مختلف آدنو پایداری متفاوتی در محیط های آبی دارند.

نمونه‌های مثبت با پرایمر عمومی در محدوده ۱۳۲ جفت بازی دیده شدند و در موارد منفی هیچ باندی مشاهده نشد. برای تشخیص دقیق اندازه باندها از لدر 100bp استفاده گردید.در نمودار ۲ تعداد موارد مثبت و منفی نمونه‌ها مشخص شده است.



نمودار ۲ : تعداد موارد مثبت و منفی نمونه ها

نتایج الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های آب‌های تفریحی با پرایمر عمومی در شکل ۳ نشان داده شده‌است.



[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از نمونه‌های آب‌های تفریحی با پرایمر عمومی *آدنوویروس* . لدر ۱۰۰جفت بازی پس از کنترل مثبت، کنترل منفی بعد از کنترل مثبت قرار دارد. نمونه‌های S2,S3S5,S6 مثبت می‌باشند.

طبق نتیجه‌ای که از آزمون Anova بدست آمد؛ مشخص شد که وجود ویروس *آدنو* با pH نمونه‌های جمع‌آوری شده، ارتباط معنی داری ندارد(۰/۹) p-value.

pH

Tukey HSD[a,b]

place	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D=darya	10	7.2500
roodkhaneh	28	7.3582
estakhr	7	7.3586
talab	6	7.3833
Sig.		.900

شکل ٤ : بررسی ارتباط بین pH و حضور ویروس

طبق نتیجه‌ای که از آزمون Anova بدست آمد؛ مشخص شد که وجود ویروس *آدنو* با دمای نمونه‌ها ارتباط معنی داری دارد (۰/۰۵) p-value. و هرچه دما پایین تر باشد حضور ویروس بیشتر است.

temperature

Tukey HSD[a,b]

place	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
roodkhaneh	28	25.11	
D=darya	10	25.80	
talab	6	26.00	26.00
estakhr	7		27.29
Sig.		.284	.058

شکل ٥: بررسی ارتباط بین دما و حضور ویروس

٤. بحث

کیفیت و ویژگی میکروبی آب یکی از مهمترین عوامل موثر بر سلامت انسان است. سالانه حدود ۲۵۰ میلیون مورد بیماری‌های انسانی توسط پاتوژن‌های منتقله از آب ایجاد می‌شود که از این تعداد ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر جان خود را از دست می دهند. رشدجمعیت و شهرنشینی فشار زیادی بر کمیت و کیفیت منابع آبی کره زمین وارد می‌کند. حدود ۹۰ درصد مرگ و میر انسان‌ها به دلیل بیماری‌های اسهالی رخ می‌دهد که به آب آلوده و فقدان بهداشت ناکافی نسبت داده شده‌اند. آب‌های سطحی می‌توانند از طریق فاضلاب حاوی ویروس‌ها آلوده شوند. افراد مبتلا به گاستروانتریت یا هپاتیت[1] از 10^5 تا 10^{11} ذرات ویروسی را در هر گرم مدفوع دفع می‌کنند و تماس یا بلع آب آلوده به مدفوع ممکن است به نوبه خود منجر به عفونت‌های انسانی شود. تحت تأثیر فاضلاب ممکن است در آب‌های سطحی ، بیش از ۱۰۰ گونه ویروسی یافت شود. نظارت بر حضور ویروس‌ها به دلیل سطح نسبتاً پایین ذرات ویروسی موجود در آب‌های محیطی، می‌تواند چالش برانگیز باشد. با این حال، این محدودیت را می‌توان با استفاده از روش‌های تغلیظ نمونه آب، استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی و تکنیک‌های حساس‌تر تشخیص ویروسی، برطرف کرد. با توجه به ویژگی‌های *آدنوویروس‌ها* از قبیل مقاومت محیطی و فراوانی نسبی در طول سال، توانایی ایجاد اثرات سایتوپاتیک[2] در کشت سلولی ، شباهت ظاهری به ویروس‌های بیماری‌زای انسانی مثل *روتاویروس* و *نوروویروس*[3] و خطر کمتر، برای محققان به عنوان یک الگوی مناسب جهت ارزیابی آلودگی ویروسی محیط‌های آبی در نظر گرفته می‌شوند. به دلیل افزایش آگاهی از این پاتوژن در محیط، تعداد گزارش‌ها در مورد وقوع *آدنوویروس* در آب‌های تفریحی (رودخانه و دریا، استخر) در سال‌های اخیر افزایش یافته است. شایان ذکر است بررسی *آدنوویروس* در آب‌های تفریحی استان مازندران انجام نشده‌است لذا این پژوهش جهت پایش حضور *آدنوویروس* در نمونه آب‌های تفریحی استان مازندران در بازه زمانی فروردین تا اردیبهشت ۱۴۰۲انجام شد و در مجموع ۶۰ نمونه جمع‌آوری شد و با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت . همان طور که بیان شد تعداد ۹

[1] Hepatitis
[2] Cytopathic
[3] Norovirus

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

نمونه (۱۵٪) برای *آدنوویروس* مثبت شدند. ولی سروتیپ-های اختصاصی مورد بررسی شناسایی نشدند. همچنین برای پردازش داده‌ها از روش‌های آماری ناپارامتریک[1] استاندارد استفاده شد و ارتباطی بین pH آب‌های مورد بررسی و وجود ویروس مشاهده نشد ولی بین دما و شیوع ویروس ارتباط معنا داری وجود داشت. چندین بررسی سیستماتیک و متاآنالیز در مورد حضور *آدنوویروس* در آب انجام شده‌است. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی نشان داد که غلظت *آدنوویروس* در نمونه‌های مثبت به طور گسترده‌ای در انواع مختلف منابع آبی متفاوت است است. سینکلر[2] و همکارانش گزارش کردند که ۴۸ درصد شیوع *آدنوویروس* در استخرها، ۴۰ درصد در دریاچه‌ها یا برکه‌ها و ۱۲ درصد باقی‌مانده در فواره‌ها، چشمه‌های آب گرم و رودخانه‌ها رخ می‌دهد. مناطق مورد نظر این مطالعه با پژوهش حاضر مطابقت دارد(11) مطالعه انجام شده توسط روسینول[3] و همکاران در سال ۲۰۱۴شیوع *آدنوویروس* را ۷۳٪ در (رودخانه گلافکوس) و ۶۰٪ در رودخانه Umealven، در فصل زمستان گزارش کردند(12). شیوع *آدنوویروس* در زمستان بیشتر از تابستان است زیرا گسترش *آدنوویروس* با دما همبستگی معکوس دارد(13). علاوه بر این، *آدنوویروس‌ها* در سطوح رطوبت بالا پایدار هستند و نرخ بقای بالا یعنی (۸۰٪) را نشان می‌دهند. در مقابل، میزان بقای *آدنوویروس‌ها* در سطوح رطوبت پایین تنها ۵۰ درصد است(14). در مطالعه لیپ[4] و همکاران درسال۲۰۰۱، نیز بیان شد دمای پایین بقای ویروس‌های روده‌ای را برای مدت طولانی در محیط آب افزایش می-دهد(15). در مطالعه حاضر نیز، بروز *آدنوویروس* بیشتر در ماه‌های بهار و سرد شناسایی شد.البته امکان نمونه برداری در تمام فصول سال وجوداردولی به دلیل محدویت زمانی در این فصل نمونه برداری انجام شد . در مطالعه حاضر شیوع *آدنوویروس* در نمونه رودخانه بیشتر از نمونه‌های آب دریا بود. این یافته با نتایج مطالعه وین جونز[5] و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت، که گزارش داد شیوع *آدنوویروس* در آب شیرین (۴۱٪.۱) بیشتر از آب دریا (۲۷٪.۴) بوده است(16). گرومن[6] و همکاران نشان دادند که تقریباً ۱۲٪ از آب رودخانه و۲۴-۹٪ از آب‌های ساحلی در سیدنی، استرالیا آلوده به *آدنوویروس* است که نتایج آن‌ها با آنچه که در این تحقیق بدست آمده قرابت دارد(17). مسئله مهم در بازیابی ویروس ها از آب ، تغلیظ آن‌ها در حجم زیادی از آب است . مطالعات زیادی برای معرفی روش های تغلیظ در آب انجام شده است .که از این روش ها می‌توان به روش های جذب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG)[7]، شناورسازی آلی، اولترافیلتراسیون[8] و اولتراسانتریفیوژ[9] اشاره کرد. در مطالعه گیراردی[10] و همکاران در سال ۲۰۱۸، تنوع *آدنوویروس* در یکی از شاخه‌های رودخانه کای برزیل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها به دو صورت غلیظ و غلیظ نشده مقایسه شدند. *آدنوویروس* در ۲۴ نمونه از ۵۵ نمونه غلیظ (۴۳٪.۶) شناسایی شد. ۲۳٪.۶ (۱۳/۵۵) از نمونه‌های غلیظ نشده مثبت بودند و نتیجه گرفتند که مرحله غلظت انجام شده به شناسایی *آدنو* در نمونه‌های بیشتری کمک کرد(18).

روش‌های فیلتراسیون موجود جهت تغلیظ نمونه های آب برای مطالعاتی که به تعداد زیادی نمونه نیاز دارند، بسیار پرهزینه هستند. یا برای کاربردهای میدانی معمولی قابل حمل نیستند. لامبرتینی[11] و همکاران در سال ۲۰۰۸ عملکرد فیلترهای پشم شیشه را در تغلیظ *آدنوویروس* ، *نوروویروس* و *انتروویروس*[12] ارزیابی کردند. میانگین راندمان بازیابی برای *آدنوویروس* تیپ ۴۱، ۲۱ درصد بود. آنها به این نتیجه

[1] Non-parametric
[2] Sinclair
[3] Rusinol
[4] Lip
[5] Wayne jones
[6] Grumman
[7] Polyethylene glycol
[8] Ultra-filtration
[9] Ultra-centrifuge
[10] Girardi
[11] Lambertini
[12] Enterovirus

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

رسیدند که فیلتراسیون پشم شیشه برای نمونه های با حجم بالا (۱۰۰۰ لیتر) مناسب است و هزینه پایین آن باعث می شود که برای مطالعاتی که به نمونه های زیادی نیاز دارند مفید باشد(19).

در پژوهش حاضر برای تشخیص وجود *آدنوویروس‌ها* یک لیتر از هر نمونه آب در ظروف استریل جمع‌آوری شد . برای استخراج اسید نوکلئیک، نمونه‌ها به روش فیلتراسیون دوگانه با استفاده از فیلترهای غشایی نیتروسلولزی ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرومتر تیمار شدند و استخراج ژنوم با استفاده از کیت اختصاصی استخراج اسیدنوکلئیک از آب و فاضلاب ، مطابق پروتکل سازنده انجام شد. راندمان بازیابی ویروس یا استفاده از فیلتراسیون غشایی به شدت به اندازه ویروس ، نوع غشا ، فشار فیلتراسیون و شرایط نمونه بستگی دارد ویروس ها معمولا در بازه ای از ۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر قرار دارند بنابراین فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فقط می تواند ویروس های بزرگتر یا ویروس هایی که به ذرات دیگر چسبیده اند را حذف کند فیلتر۰/۲۲ میکرومتر موثرتر است و میتواند بسیاری از ویروس ها را به دام بیندازد ولی ویروس های خیلی کوچک مثل پیکورناویروس ها ممکن است عبور کنند .بر اساس منابع آزمایشگاهی فیلتر۰/۲۲ میکرومتر می تواند راندمانی بین ۵۰٪ تا ۹۰٪ بسته به نوع ویروس و شرایط نمونه برداری داشته باشد.

فیلتر۴۵ /۰ میکرومتر معمولا راندمانی زیر ۵۰٪ داره و برای بازیابی ویروس های آزاد مناسب نیست . مگر اینکه ویروس ها به ذرات بزرگتر چسبیده باشند . این روش نیز به دلیل هزینه کم می‌تواند به عنوان ابزاری مفید برای بازیابی ویروس‌ها از نمونه‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد. ولی در مقایسه با روش های جذب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG) ، شناورسازی آلی، اولترافیلتراسیون و اولتراسانتریفیوژ راندمان کمتری دارد .

در مطالعه جاکوب[1] و همکاران در سال ۲۰۱۵ حضور *پروتوزوآها*[2] ، *اشریشیا کلی*[3] و *آدنوویروس* در سه رودخانه بزرگ در فرانسه بررسی شدند، بیشترین غلظت *آدنوویروس-ها* در دو رودخانه و در فصل بهار یافت شد. در واقع، حداکثر دفع میزبان در تابستان اتفاق می‌افتد که همزمان با فعالیت‌های تفریحی و تماس انسان با آب است اما بقا و عفونت‌پذیری آن‌ها در طول زمستان که دما کمتر است، حداکثر است. این مشاهدات می‌تواند توضیح دهد که حداکثر وقوع *آدنوویروس‌ها* در فصلی با دمای معتدل مانند فصل بهار یافت می‌شود. جمع‌آوری نمونه‌های این پژوهش نیز در فصل بهار انجام شد(20). در مطالعه حاضر ، در دو مرحله، ابتدا با پرایمر یونیورسال و سپس با پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپ، *آدنوویروس های* ۳ ، ۷ ، ۴۰و۴۱ ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که سروتیپ های اختصاصی *آدنوویروس* در نمونه‌ها وجود ندارند ، ولی با پرایمرهای یونیورسال ۹ مورد *آدنوویروس* شناسایی شد . در مطالعه دوستی[4] و همکاران در سال ۱۳۹۸، نیز در دو مرحله، با استفاده از پرایمر یونیورسال *آدنوویروس* و سپس با پرایمرهای اختصاصی *آدنوویروس-های* ۴۰ و ۴۱ ارزیابی شدند که این سروتیپ‌های اختصاصی شناسایی نشدند ولی با پرایمرهای یونیورسال نتایج مثبت مبنی بر حضور *آدنوویروس* به دست آمد. از ۶۰ نمونه آب فاضلاب بررسی شده *آدنوویروس‌ها* در ۱۶ نمونه (۲۶٪) با روش مولکولی تشخیص داده شدند(۲۱).که این مسئله می-تواند نشان‌دهنده غالب بودن سروتیپ های دیگر آدنوویروس در آبهای محیطی ایران باشد.این مطالعه با پژوهش حاضر مشابه می باشد.

ابراهیم[5] و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۱۰۲نمونه فاضلاب بیمارستانی را مورد بررسی قرار دادند و از واکنش PCR

[1] Jacob
[2] Protozoa
[3] Escherichia coli
[4] Doosti
[5] Ibrahim

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

تودرتو[1] برای ارزیابی *آدنوویروس‌ها* استفاده کردند. ژنوتیپ نمونه‌های *آدنو* مثبت با تعیین توالی محصولات PCR به دست آمد. *آدنوویروس‌ها* در ۶۴٪ (۶۵/۱۰۲) از نمونه‌های فاضلاب مثبت تشخیص داده شد و از بین سروتیپ‌های گونه‌های F *آدنوویروس* تنها وجود تیپ ۴۱ مثبت شد در مطالعه حاضر هیچ کدام از این سروتیپ ها مشاهده نشدند که می‌تواند به علت شرایط متفاوت نمونه ها و روش مورد بررسی باشد(7).

۵. نتیجه گیری

با توجه به مشکلات ناشی از کمبود آب، بررسی عوامل آلودگی آب ضروری به نظر می رسد از این‌رو مطالعه حاضر از روش PCR معمولی برای شناسایی ویروس‌ها در آب‌های تفریحی استفاده نمود .

در مطالعه حاضر ، در دو مرحله، ابتدا با پرایمر یونیورسال، حضور *آدنوویروس* و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپ، تیپ های۳، ۷ ، ۴۰ و ۴۱ ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ژنوتایپ‌های مورد بررسی در نمونه‌ها وجود ندارند ، ولی با پرایمرهای یونیورسال ۹ مورد *آدنوویروس* شناسایی شد . این یافته نشان می‌دهد که قطعا ژنوتایپ‌های دیگری از *آدنوویروس* در این نمونه‌ها وجود دارد. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین pH و حضور ویروس نبود ولی بین دما و شیوع ویروس رابطه معناداری وجود داشت و تعداد موارد مثبت در نمونه رودخانه با pH متوسط ۷.۳۲ و دمای متوسط ۲۴.۵ بیشتر بود.

از آن‌جایی که عفونت با *آدنوویروس* ممکن است باعث ایجاد بیماری‌های جدی به خصوص در افراد دارای نقص ایمنی، کودکان و افراد مسن شود ، نظارت بر چنین ویروس-هایی در آب‌های تفریحی بویژه استخرها مهم می‌باشد چرا که با توجه به نتایج این تحقیق ۳۰ درصد استخرها علی رغم تصور جامعه از آب‌های پاک آن، آلوده به ویروس بودند و این مسئله زنگ خطری برای مسئولین بهداشت است. اگرچه به طور گسترده نمی‌توان روی تالاب‌ها و رودخانه‌ها نظارت داشت اما با برنامه‌های راهبردی و نظارت بیشتر می‌توان از آلودگی آب‌های استخرها جلوگیری نمود.از جمله این اقدامات اندازه‌گیری کلر باقیمانده میباشد کلر باید در سطح مناسب (معمولا بین ۱ تا ۳ ppm) حفظ شود . pH مناسب (بین ۷/۲ تا ۷/۸) باعث افزایش اثربخشی کلر در گندزایی می‌شود . گندزایی با پرتوفرابنفش در کنار کلر ، میتواند اثربخشی بیشتری در حذف ویروسها داشته باشد سیستم های تصفیه باید به طور پیوسته آب را پالایش کنند تا از تجمع آلودگی جلوگیری شود .حضور مامورین بهداشت برای بررسی روزانه وضعیت محیطی و آب استخر ضروری است .با وجود تلاش در طراحی دقیق و اجرای این مطالعه ، برخی محدودیت ها قابل توجه اند . نخست ، نمونه برداری از تعدادی منابع آبی انجام شده و ممکن است نتایج به طور کامل قابل تعمیم به سایر مجموعه های آبی با شرایط متفاوت نباشد . همچنین استفاده از روش های مولکولی مانند PCR اگرچه حساسیت بالایی دارد ، اما به تنهایی کافی نیست و باید روش های توالی یابی نسل جدید ، روش های کشت سلولی ، Real Time PCR برای بررسی دقیق تر انجام شوند . همچنین برای بررسی حضور سروتیپ های دیگر نمونه‌های مثبت با پرایمر یونیورسال توالی یابی شوند.از سوی دیگر ، بررسی تنها یک بازه زمانی محدود ، امکان تحلیل فصلی یا بررسی تغییرات بلند مدت را فراهم نکرده است. نبود داده های بالینی از شناگران نیز مانع ارزیابی مستقیم ارتباط بین آلودگی آب و بروز علائم بیماری شده است . بنابراین با توجه به این محدودیت ها نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد .

سپاسگزاری:

این مطالعه در دانشگاه مازندران انجام شد. از جناب آقای دکتر عجم و جناب آقای دکتر عبدلی بابت تهیه نمونه و

[1] Nested PCR

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

تسهیل پروژه کمال تشکر را داریم. همچنین از جناب آقای
دکتر نظیفی برای انجام تحلیل‌های آماری تشکر می‌کنیم.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

منابع

1. Célia da Silva Lanna M, Viancelli A, Michelon W, Castro Carvalho SV, de Almeida dos Reis D, Fernandez de Salles LA, et al. Household-based biodigesters promote reduction of enteric virus and bacteria in vulnerable and poverty rural area. Environ Pollut. 2019;252:8–13.
2. Adelodun B, Ajibade FO, Ibrahim RG, Bakare HO, Choi KS. Snowballing transmission of COVID-19 (SARS-CoV-2) through wastewater: Any sustainable preventive measures to curtail the scourge in low-income countries? Sci Total Environ [Internet]. 2020;742:140680. Available from: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140680
3. Pooi CK, Ng HY. Review of low-cost point-of-use water treatment systems for developing communities. npj Clean Water [Internet]. 2018;1(1). Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41545-018-0011-0
4. Al-Heeti OM, Cathro HP, Ison MG. Adenovirus Infection and Transplantation. Transplantation. 2022;106(5):920–7.
5. do Nascimento LG, Fialho AM, de Andrade J da SR, de Assis RMS, Fumian TM. Human enteric adenovirus F40/41 as a major cause of acute gastroenteritis in children in Brazil, 2018 to 2020. Sci Rep [Internet]. 2022;12(1):1–12. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-022-15413-1
6. Kundu A, McBride G, Wuertz S. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. Water Res [Internet]. 2013;47(16):6309–25. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.002
7. Ibrahim C, Hassen A, Pothier P, Mejri S, Hammami S. Molecular detection and genotypic characterization of enteric adenoviruses in a hospital wastewater. Environ Sci Pollut Res. 2018;25(11):10977–87.
8. Wyer MD, Wyn-Jones AP, Kay D, Au-Yeung HK, Girones R, Lopez-Pila J, et al. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. Water Res [Internet]. 2012/05/29. 2012;46(13):4130–41. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22633054
9. Brouwer AF, Masters NB, Eisenberg JNS. Quantitative microbial risk assessment and infectious disease transmission modeling of waterborne enteric pathogens. Curr Environ Heal reports. 2018;5:293–304.
10. Farkas K, Mannion F, Hillary LS, Malham SK, Walker DI. Emerging technologies for the rapid detection of enteric viruses in the aquatic environment. Curr Opin Environ Sci Heal [Internet]. 2020;16:1–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.007
11. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. J Appl Microbiol. 2009;107(6):1769–80.
12. Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Hundesa A, Vieira C, Kern A, Eriksson I, et al. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. Water Res. 2014;59:119–29.
13. Du Prel JB, Puppe W, Gröndahl B, Knuf M, Weigl JAI, Schaaff F, et al. Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? Clin Infect Dis. 2009;49(6):861–8.
14. Davis GW, Griesemer RA, Shadduck JA, Farrell RL. Effect of relative humidity on dynamic aerosols of adenovirus 12. Appl Microbiol. 1971;21(4):676–9.
15. Lipp EK, Kurz R, Vincent R, Rodriguez-Palacios C, Farrah SR, Rose JB. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. Estuaries. 2001;24(2):266–76.
16. Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, et al. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. Water Res. 2011;45(3):1025–38.
17. Grohmann GS, Ashbolt NJ, Genova MS, Logan G, Cox P, Kueh CSW. Detection of viruses in coastal and river water systems in Sydney, Australia. Water Sci Technol. 1993;27(3–4):457–61.
18. Girardi V, Demoliner M, Gularte JS, Spilki FR. 'Don't put your head under water': enteric viruses in Brazilian recreational waters. New Microbes New Infect [Internet]. 2019;29:100519. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100519
19. Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

drinking water by use of glass wool filters. Appl Environ Microbiol. 2008;74(10):2990–6.

20. Jacob P, Henry A, Meheut G, Charni-Ben-Tabassi N, Ingr V, Helmi K. Health risk assessment related to waterborne pathogens from the river to the tap. Int J Environ Res Public Health. 2015;12(3):2967–83.

21. P Atabakhsh 1, M Kargar1,* AD. Molecular monitoring effectiveness of human adenovirus removal in Isfahan water treatment plant. Iran J Heal Env. 2019;12(2):235–46.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]