ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

Detection and Quantification of Enteric Pathogens in Aerosols Near Open Wastewater Canals in Cities with Poor Sanitation

https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.1c05060

การตรวจพบและวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ จากละอองลอยใกล้คลองระบายน้ำเสีย ในเมืองที่มีสุขาภิบาลที่ไม่ดี

บทคัดย่อ: ในประเทศที่มีรายได้ต่ำหลาย ๆ ประเทศ โครงสร้างพื้นฐานของการสุขาภิบาลในเมืองยังนับว่ามีไม่เพียงพอ จึงนำไปสู่การสะสมของเสียจากอุจจาระที่รั่วไหลในปริมาณมาก ตามแหล่งน้ำในพื้นที่ที่มีประชากรหนาแน่น ในแง่ของการก่อละอองลอย การกระจายของจุลินทรีย์ลำไส้และสารพันธุกรรมทางอากาศสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะเช่นนี้ แต่ยังไม่มีการอธิบายถึงคุณลักษณะที่ชัดเจน เราจึงได้ทำการตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเชื้อที่ก่อโรคในลำไส้ จากตัวอย่างละอองลอยที่เก็บมาจากบริเวณคลองระบายน้ำเสีย หรือน้ำผิวดิน (ที่ได้สัมผัสกับน้ำเสีย) และศูนย์ควบคุมในเมืองลาปาซ ประเทศโบลิเวีย เมืองกานปูร์ ประเทศอินเดีย และแอตแลนต้า สหรัฐอเมริกา ด้วยวิธี multiplex reverse-transcription qPCR (37 targets) และ ddPCR (13 targets) เราได้ตรวจพบสารพันธุกรรมที่หลากหลาย อันเกี่ยวเนื่องกับเชื้อที่ก่อโรคในลำไส้ โดยสารพันธุกรรมบางชนิดที่พบนั้น ยังไม่เคยได้รับการรายงานว่าพบในละอองลอยในเมืองมาก่อน และพบสารพันธุกรรมในปริมาณที่หนาแน่นมาก ใกล้คลองระบายน้ำเสียในเมืองลาปาซและกานปูร์ ปริมาณสารพันธุกรรมที่พบอยู่ที่ประมาณ 4.7×10^2 gc ต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งรวมสารพันธุกรรมทุกประเภท ทั้งเชื้อก่อโรคลำไส้ที่ทนต่อความร้อน ได้แก่ *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* เชื้อ enteroinvasive *E. coli*/*Shigella* spp., *Salmonella spp.*, norovirus และ *Cryptosporidium* spp. โดยพบเชื้อก่อโรคที่ประมาณร้อยละ 25, 76, และ 0 ของตัวอย่างทั้งหมดที่มาพร้อมกับเชื้อ *E. coli* ที่ถูกเพาะในเมืองลาปาซ กานปูร์ และแอตแลนต้าตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการมีชีวิตของจุลินทรีย์ลำไส้ ณ จุดที่เก็บตัวอย่าง การแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคลำไส้ทางอากาศ จึงเป็นช่องทางต่อการสำรวจเมืองต่าง ๆ ที่มีสุขาภิบาลที่ไม่ดี

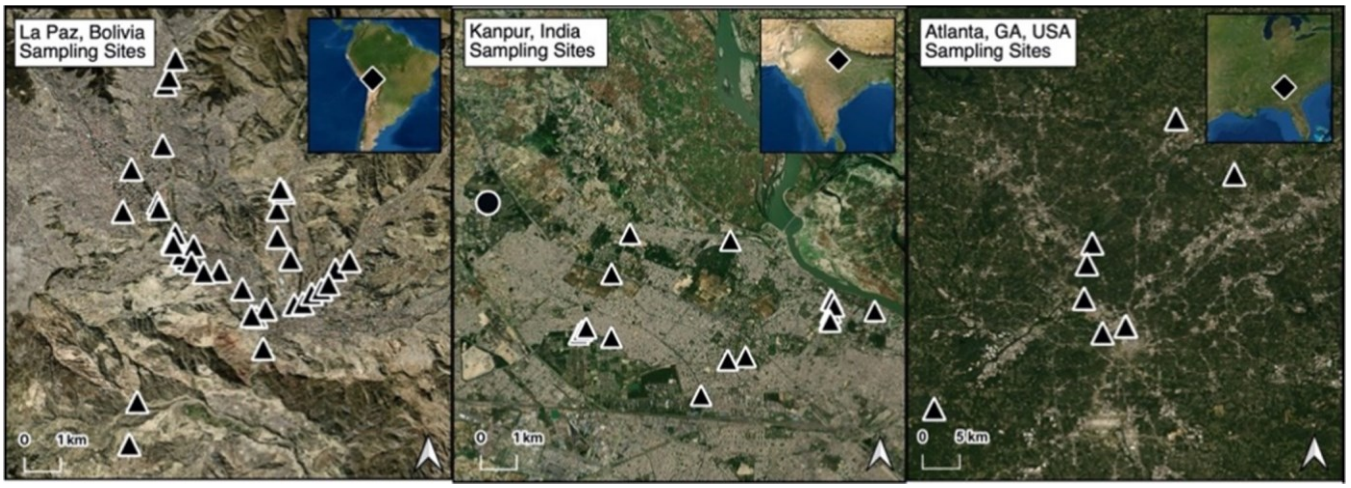
คีย์เวิร์ด: ละอองลอยชีวภาพ เชื้อก่อโรคในลำไส้ การสุขาภิบาลในเมือง, *ddPCR*, อนามัยสิ่งแวดล้อม

Downloaded via 49.228.226.20 on October 21, 2021 at 16:31:01 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

บทนำ

เมืองใหญ่หลาย ๆ แห่งในประเทศพัฒนาระดับปานกลางล่าง (LMICs) มีโครงสร้างพื้นฐานทางสุขาภิบาลไม่พอ โดยมีข้อยกเว้นเพียงเล็กน้อย [1-3] ระบบน้ำและสุขาภิบาลที่ไม่ปลอดภัย อาจส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในลำไส้ จากผู้ติดเชื้อ สู่ผู้ที่มีความเสี่ยงได้ ผ่านการสัมผัสโดยตรงหรือผ่านสิ่งแวดล้อมที่เชื่อมโยงกันโดยเส้นทางที่หลากหลาย[4,5] ในขณะที่วรรณกรรมทางวิชาการจำนวนมาก ได้อธิบายเกี่ยวกับความเสี่ยงทางจุลชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสอุจจาระปนเปื้อนทางตรงและทางอ้อมในสภาวะที่หลากหลาย แต่งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคในลำไส้ผ่านละอองชีวภาพ ในเมืองของประเทศพัฒนาระดับปานกลางล่างยังมีจำนวนน้อย ในสภาวะเหล่านี้ การกระจายของเชื้อก่อโรคในลำไส้ผ่านละอองลอย อาจเป็นไปได้ จากการบรรจบกันของปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้: โครงสร้างพื้นฐานทางสุขาภิบาลที่ไม่เพียงพอ ซึ่งส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสิ่งปฏิกูลจากอุจจาระ การเกิดโรคจากของเสียที่มีเชื้อก่อโรคลำไส้ในมนุษย์ ประชากรที่หนาแน่น และลักษณะของสภาพแวดล้อมที่อาจส่งผลต่อการเกิดละอองลอยของสิ่งปฏิกูลจากอุจจาระ การเกิดละอองลอย การแพร่กระจาย และการสะสมของจุลินทรีย์ก่อโรคในเมืองที่ขาดสุขาภิบาลที่ดี อาจนำไปสู่การสัมผัสเชื้อผ่านการหายใจหรือการบริโภคผ่านเส้นทางอื่น ๆ (เช่น อาหาร น้ำ และการสัมผัสโดยตรง)[6]

การก่อละอองลอยชีวภาพ ทำได้หลายวิธี เช่นการแตกฟอง[7-9] การระเหย การกระทบกับหยาดฝน[10,11] และอื่น ๆ[12-15] การเกิดขึ้นของละอองลอยชีวภาพ อาจเชื่อมโยงกับปัจจัยที่หลากหลาย ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อม รวมถึงสิ่งก่อสร้างต่าง ๆ และการเกิดฝน[16-19] สภาพอากาศ[20-22] น้ำผิวดินในเมือง และคุณลักษณะของน้ำ[6,23,24] กระบวนการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งรวมถึงกระบวนการเชิงกล[25,26] และโครงสร้างพื้นฐานอื่น ๆ กลไกเบื้องหลังการเกิดละอองลอยและการแพร่กระจายของจุลินทรีย์จากผิวน้ำและผลของจุลินทรีย์ต่ออายุของละอองหยด ได้มีการจำแนกอย่างชัดเจนภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม [7,8]



ภาพที่ 1. พื้นที่เก็บตัวอย่างละอองลอยในเมืองลาปาซ ประเทศโบลิเวีย เมืองกานปูร์ ประเทศอินเดีย และเมืองแอตแลนต้า สหรัฐอเมริกา สัญลักษณ์สามเหลี่ยมแสดงถึงพื้นที่เก็บตัวอย่างที่อยู่ห่างจากคลองระบายน้ำเสียน้อยกว่า 1 กม. และสัญลักษณ์วงกลมแสดงถึงพื้นที่เก็บตัวอย่างที่อยู่ห่างจากคลองระบายน้ำเสียมากกว่า 1 กม. พื้นที่ควบคุม (ห่างจากคลองระบายน้ำเสียมากกว่า 1 กม.) นอกเมืองลาปาซ ไม่ได้แสดงบนแผนที่นี้ แต่อยู่ในพื้นที่ห่างไกลนอกเมืองลาปาซ

การศึกษาในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าฟองจากผิวน้ำที่ปนเปื้อน อาจได้รับผลกระทบจากจุลินทรีย์ ทำให้เกิดละอองหยดจำนวนมากขึ้น และเปลี่ยนจากน้ำเป็นอากาศได้เร็วขึ้น[9] การศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ก่อโรคนั้นถูกปล่อยจากหยาดฝนได้ ทำให้เชื้อถูกขนส่งทางละอองลอยได้ แม้ว่าเราจะมีความเข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติทางกายภาพของการแพร่กระจายจุลินทรีย์ผ่านละอองลอยมากขึ้น แต่ความรู้เกี่ยวกับการมีชีวิตอยู่และความทนของเชื้อก่อโรคในช่องทางนี้ยังมีน้อย

เชื้อก่อโรคสำคัญ ๆ ในมนุษย์ ที่แพร่กระจายทางละอองลอย ได้แก่ ไวรัสที่ก่อโรคทางเดินหายใจเช่น SARS-CoV-2 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ ซึ่งได้รับการจำแนกอย่างชัดเจนที่สุด โดยเฉพาะในสถานพยาบาลล้อมอาคารปิด เมื่อพูดถึงการหายใจในพื้นที่ติดเชื้อ[27-31] สำหรับเชื้อก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับสุขาภิบาล ที่สัมผัสได้ผ่านการบริโภคทั่วไปแทนการหายใจ การศึกษาในพื้นที่เสี่ยงสูงนอกอาคารในสหรัฐอเมริกา ได้แสดงให้เห็นว่าละอองลอยชีวภาพที่มีเชื้อจุลินทรีย์ลำไส้เป็นส่วนประกอบ พบได้ทั่วไปในแหล่งที่มีสิ่งปฏิกูลปริมาณมาก การศึกษาจำนวนมาก ได้เน้นศึกษาเกี่ยวกับสภาพของอากาศรอบโรงงานบำบัดน้ำเสีย[32-43] และเรื่องบริบทของการประยุกต์ใช้กากตะกอนน้ำเสียในพื้นดิน[44-54] ในขณะที่การศึกษาอีกส่วนได้ศึกษาเกี่ยวกับละอองลอยชีวภาพในสถานที่ทำปุ๋ยหมัก [55,56] ตลาดขายเนื้อ[57] เขตเมืองที่ได้รับผลกระทบ[58-63] และพื้นที่ดำเนินงานเกี่ยวกับอาหารสัตว์[64-66]

จากงานวิจัยที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับละอองลอยชีวภาพบริเวณพื้นที่รอบนอกของเมือง งานวิจัยหลายชิ้นได้ศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ลำไส้ในช่วงแคบ โดยรายงานว่าได้พบเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fecal indicator รวมถึงกลุ่ม coliform เมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยง[60,67,68] หรือรายงานว่าพบกลุ่มเชื้อที่เกี่ยวข้องกับน้ำเสียหรืออุจจาระจากข้อมูลการจำแนกเชื้อด้วยวิธี 16S Sequencing[69-73] โดยมีการจำแนกถึงระดับสายพันธุ์หรือสปีชีส์ในจำนวนน้อย การวัดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้โดยใช้ target เฉพาะเจาะจงยังนับว่ามีน้อยมาก ส่วนหนึ่งเพราะเชื้อก่อโรคสำคัญ ๆ ในลำไส้มักจะไม่ค่อยพบในพื้นที่นอกเหนือจากส่วนที่ติดเชื้อ และมีงานวิจัยจำนวนน้อย ที่ทำการศึกษาในพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบสูงจากการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับสุขาภิบาล ในขณะที่การวิเคราะห์ลำดับเบส เป็นวิธีที่ให้ข้อมูลสำคัญเกี่ยวกับเชื้อที่แพร่ทางอากาศ โดยการบ่งบอกถึงความชุก แต่จำนวนเชื้อโรคที่เฉพาะเจาะจงยังจำเป็นต่อการประเมินในแง่ของการสัมผัสและการกระจายของเชื้อ[74] รวมถึงการประเมินศักยภาพทางสาธารณสุข สำหรับเส้นทางการแพร่ที่น้อยคนเข้าใจ จากการรายงานของงานวิจัยก่อนหน้านี้ เกี่ยวกับละอองลอยที่พบได้ในเมือง มีงานวิจัยบางชิ้นที่เกิดขึ้นในประเทศ LMIC แม้ว่าเมืองในประเทศเหล่านี้จะมีโครงสร้างพื้นฐานทางด้านสุขาภิบาลไม่เพียงพอ และจำนวนประชากรหนาแน่นมากก็ตาม นำไปสู่การแพร่กระจายการปนเปื้อนจากอุจจาระ ผ่านการสัมผัสใกล้ชิดกับผู้คน ส่งผลให้เกิดโรคในจำนวนมาก ในปี 2017 โรคท้องร่วงทำให้ผู้คนกว่า 1.8 ล้านคนเสียชีวิตทั่วโลก[75] โดยมีประเทศ LMIC ที่รับภาระอันไม่สมส่วนจากอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิต

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการพบจุลินทรีย์ลำไส้ในละอองลอย ในการศึกษาที่มีคุณภาพตามพื้นที่ของประเทศร่ำรวย เราได้ตั้งสมมติฐานว่าเชื้อก่อโรคในลำไส้ที่ขนส่งผ่านละอองลอย อาจมีอยู่ และวิเคราะห์หาจำนวนได้ในพื้นเมืองที่ขาดสุขาภิบาล เราได้ศึกษาสมมติฐานนี้ในสองเมืองที่มีสุขาภิบาลไม่ดี และหนึ่งเมืองที่มีโครงสร้างพื้นฐานเกี่ยวกับระบบน้ำเสียที่ดี เป็นพื้นที่อ้างอิง

ระเบียบวิธีวิจัย

พื้นที่เก็บตัวอย่าง. เราได้เก็บตัวอย่างจากเมืองกาปูร์ ประเทศอินเดีย (พฤษภาคม-กรกฎาคม 2017); เมืองลาปาซ ประเทศโบลิเวีย (มีนาคม 2018, มิถุนายน 2018, มีนาคม 2019, มิถุนายนและกรกฎาคม 2019); และเมืองแอตแลนต้า รัฐจอร์เจีย ประเทศสหรัฐอเมริกา (มีนาคม 2018–มกราคม 2019). เมืองกานปูร์มีฤดูแล้งเป็นพิเศษ(ตุลาคม-มิถุนายน) และฤดูฝน (กรกฎาคม-กันยายน) เราได้ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม เพื่อเก็บตัวอย่างจากทั้งสองฤดู และเราก็ตั้งใจเก็บตัวอย่างในเมืองลาปาซ ทั้งในช่วงฤดูฝน (ธันวาคม-มีนาคม) และฤดูแล้ง (พฤษภาคม-สิงหาคม) เช่นเดียวกัน เมืองกานปูร์มีประชากรที่หนาแน่นมาก (เขตนาการ: 4.6 ล้านคน ความหนาแน่น 1500 คน/กม.^{2})[76] พร้อมทั้งขยะจำนวนมากจากอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และน้ำเสียที่ยังไม่ได้รับการบำบัดโดยคลองเปิด ที่ถูกระบายสู่แม่น้ำแกงกีส[77,78] ในเมืองลาปาซ แม่น้ำต่าง ๆ ได้รับผลกระทบจากน้ำเสียที่ถูกระบายโดยไม่ได้ผ่านการบำบัด น้ำเสียจากภาคอุตสาหกรรม และน้ำฝนไหลนอง แหล่งน้ำส่วนใหญ่ไหลไปตามช่องทางที่ถูกสร้างไว้ หรือคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด[79,80] ลำน้ำที่ใหญ่ที่สุดคือแม่น้ำ Choqueyapu ที่ได้รับผลกระทบสูงสุด โดยแม่น้ำนี้ไหลผ่านใจกลางเมืองลาปาซ (ประชากร 900,000 คน ความหนาแน่น 900 คน/กม.^{2})[81,82] และไหลรวมมาบรรจบกับแม่น้ำ Orkojahuira, Irpavi และ Achumani ในงานศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่าระบบแม่น้ำดังกล่าวและห้วงน้ำที่เกี่ยวข้อง จะไหลลงสู่แม่น้ำอเมซอน และมีการพบจุลินทรีย์ลำไส้ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในแหล่งน้ำ[79,82,83] ในฐานะพื้นที่ศึกษาอ้างอิง เมืองแอนแลนต้ามี

โครงสร้างพื้นฐานจัดการน้ำเสียใต้ดินที่วางไว้เป็นอย่างดี แม้ว่าแหล่งน้ำในเมืองแอตแลนต้าจะได้รับผลกระทบจากเชื้อก่อโรคที่มาจากอุจจาระค่อนข้างมาก จากมลพิษที่ไม่ใช่แหล่งกำเนิดและน้ำเสียไหลทะลัก.[87,88] ความหนาแน่นประชากรที่เมืองแอตแลนต้าอยู่ที่ประมาณ 1500 คน/กม.^{2} แม้ว่าตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณแหล่งน้ำที่ได้รับผลกระทบจะอยู่ในพื้นที่ชานเมือง ที่ความหนาแน่นประชากรต่ำกว่าค่าเฉลี่ย

เราแยกพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด 18 จุดในเมืองกานปูร์ 37 จุดในเมืองลาปาซ และ 8 จุดในเมืองแอตแลนต้า ที่ตรงตามเกณฑ์ต่อไปนี้: (1) ใกล้กับแหล่งละอองลอยชีวภาพ (<1 กม.) มีจุลินทรีย์ลำไส้ เป็นคลองระบายน้ำเสียแบบเปิดในประเทศอินเดียและโบลิเวีย และผิวน้ำที่ได้รับผลกระทบในแอตแลนต้า (2) เข้าถึงได้ในระดับสาธารณะและระดับพื้นดิน (3) ระหว่างการเก็บตัวอย่างนับหลายชั่วโมง จะไม่เป็นการรบกวนผู้คนในชุมชน ในเมืองกานปูร์ เราเลือกพื้นที่ควบคุมที่ห่างจากคลองระบายน้ำเสียแบบเปิดมากกว่า 1 กม. ตั้งอยู่ในสถาบันเทคโนโลยีอินเดีย วิทยาเขตกานปูร์. สถาบันดังกล่าว เป็นพื้นที่ควบคุมแบบปิด บุคคลภายนอกจะเข้าถึงได้ยาก ความหนาแน่นประชากรไม่สูง มีระบบท่อน้ำเสียใต้ดิน และมีสัตว์อาศัยจำนวนน้อยกว่ามากในเมืองลาปาซ เราใช้พื้นที่ควบคุม 2 จุด ห่างจากแหล่งน้ำเสียมากกว่า 1 กม.: (1) สถานีและหอคอยตรวจอากาศและสภาพแวดล้อม Chacaltaya สูง 5380 เมตร และห่างจากแหล่งที่อยู่อาศัย (2) Pampalarama เป็นจุดที่ไม่ได้รับผลกระทบ อยู่กใกล้แหล่งน้ำ Choqueyapu ในพื้นที่ปกป้องธรรมชาติ ในเมืองแอตแลนต้า เราเก็บตัวอย่างจาก 8 จุด ที่อยู่ข้าง ๆ แหล่งน้ำและแม่น้ำของแอตแลนต้าที่ได้รับผลกระทบ: แม่น้ำ Chattahoochee ลำธาร Proctor ลำธาร Foe Killer และลำธาร South Fork Peachtree นอกจากนี้ เราได้เก็บตัวอย่างจากหลังคาห้องปฏิบัติการของเรา และในระดับพื้นดินของสถาบันเทคโนโลยีจอร์เจีย (อยู่ใจกลางเมืองแอตแลนต้า) ห่างจากแหล่งน้ำมากกว่า 1 กม. และใช้ตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างควบคุม (ภาพที่ 1).

การเก็บตัวอย่าง สกัด และวิเคราะห์ละอองลอยชีวภาพ: เราใช้วิธีการกรองแบบปริมาตรสูงและดูดละอองลอยทางอากาศในการเก็บตัวอย่างตามพื้นที่ เราใช้เครื่อง ACD-200 BobCat Dry Filter Continuous Air Sampler (InnovaPrep, Drexel, MO, USA) กรองและเก็บตัวอย่างละอองลอย พร้อมแผ่นกรองใช้ครั้งเดียวขนาด 52 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีอัตราการกรอง 200 ลิตรต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลหลังการสกัดตัวอย่าง เราได้ใช้ชุดสกัดชนิด wet foam carbon (InnovaPrep, Drexel, MO, USA) เพื่อชะล้างสิ่งกรอง ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ทำให้เกิดของเหลวทั้งหมด 6 มล. จากการสกัดโดยชะล้าง[90]

แผ่นกรองใช้ครั้งเดียวที่ปลอดเชื้อและชุดสกัด มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่เก็บ การจัดการแผ่นกรองและการสกัด ได้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิตด้วยวิธีปลอดเชื้อ และเครื่องกรองปริมาตรสูงได้มีการเช็ดทำความสะอาดด้วยน้ำยาฟอกขาว 10% และเอทานอล 70% ก่อนและหลังเก็บตัวอย่าง เราได้ทำตัวอย่างควบคุมขึ้นมา โดยใช้น้ำยาสกัดและแผ่นกรอง โดยการชะล้างแผ่นกรองในห้องปฏิบัติการ ทำการสกัดสารชะล้างควบคุม และใช้เป็นแม่แบบสำหรับคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจหาหรือ limits of detection รวมถึงตัวอย่างควบคุมในการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล

เราได้ทำการผสมสิ่งชะล้างกับชุดสารสกัด guanidine thiocyanate (UNEX; Microbiologics, St. Cloud, MN, USA) ในอัตราส่วน 1:1 และเก็บส่วนผสมในหลอด cryovial เพื่อส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ

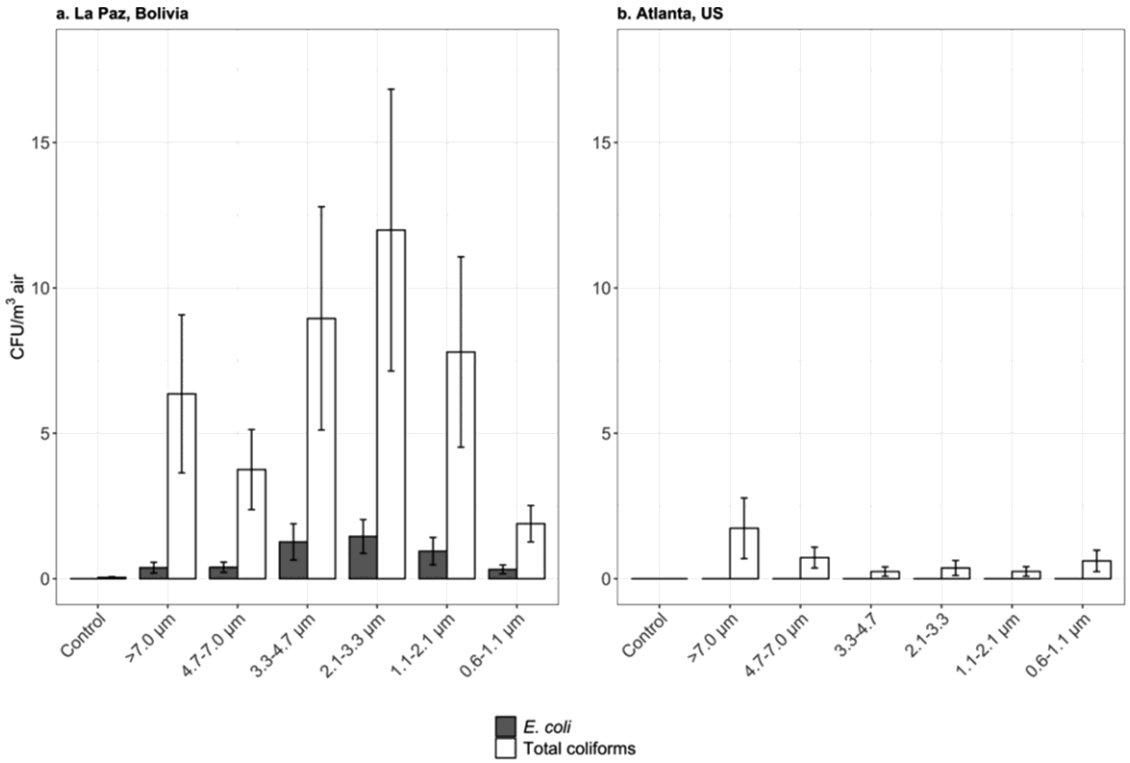
เราได้เก็บตัวอย่างในช่องแช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันทีที่ถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการ เพื่อป้องกันการละลาย โดยการกระจายตัวอย่างและสารบัฟเฟอร์ในหลาย ๆ ส่วน เพื่อเป็นการควบคุมตัวอย่างก่อนทำการสกัด เราได้ใช้วัคซีนที่มี bovine respiratory syncytial virus (BRSV) และ bovine herpes virus (BoHV) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร (Zoetis, Parsippany, NJ) มาผสมกับตัวอย่าง เราได้ทำการสกัด DNA และ RNA ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้: (1)

เติมส่วนผสม 300 ไมโครลิตรและเอทานอล 70% อีก 300 ไมโครลิตรลงใน HiBind mini column (Omega BioTek, Norcross, GA); (2) เพิ่มปริมาณ DNA ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ทำขั้นตอนที่ (1) ซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างที่ถูกชะล้างปริมาตร 450 ไมโครลิตร (3) ล้างคอลัมน์กรองด้วยเอทานอล 100% (4) ทำการชะล้างสารพันธุกรรม และนำไปเก็บที่ใน 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8) ปริมาณ 50-75 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ −80 °C จนกว่าจะนำตัวอย่างมาวิเคราะห์เพิ่มเติม[91] การทดลองก่อนหน้านี้ ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการกู้คืนเชื้อ *Cryptosporidium parvum* อยู่ที่ประมาณ 50%[92] และค่า crossing threshold (CT) ต่อชุดตรวจอื่น ๆ ในท้องตลาด เมื่อเทียบกับการใช้ real-time PCR[91] โดยรวมแล้ว เราเก็บตัวอย่างจากอากาศปริมาตรสูงทั้งหมด 75 ตัวอย่างในเมืองลาปาซ (71 ตัวอย่างจากบริเวณคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด และ 4 ตัวอย่างจากจุดควบคุมที่ห่างจากแหล่งน้ำมากกว่า 1 กม.) 53 ตัวอย่างในเมืองกานปูร์ (45 ตัวอย่างจากบริเวณคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด และ 8 ตัวอย่างจากจุดควบคุมที่ห่างจากแหล่งน้ำมากกว่า 1 กม.) และ 15 ตัวอย่างในเมืองแอตแลนต้า (10 ตัวอย่างจากบริเวณผิวน้ำที่ได้รับผลกระทบ และ 5 ตัวอย่าง (4 ตัวอย่างจากหลังคา และ 1 ตัวอย่างในระดับพื้นดิน) จากจุดควบคุมที่ห่างจากแหล่งน้ำมากกว่า 1 กม.) เราได้แบ่งช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเป็นตัวอย่างจากช่วงเช้า (ระหว่าง 7 โมงเช้าถึงเที่ยงวัน) และตัวอย่างจากช่วงกลางวัน (ระหว่างเที่ยงวันถึง 1 ทุ่ม) นอกเหนือจากข้อมูลที่ระบุใน EMMI MIQE Guidelines ในส่วนของข้อมูลสนับสนุน.[93,94] ปริมาณเฉลี่ยที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแบบปริมาตรสูงได้แก่ 47.5 ม.^{3} ในเมืองลาปาซ (ระดับความเชื่อมั่น 95% = 42.3, 52.8) 36.3 ม.^{3} ในเมืองกานปูร์ (ระดับความเชื่อมั่น 95% = 35.8, 36.7) และ 28.3 ม.^{3} ในแอตแลนต้า (ระดับความเชื่อมั่น 95% = 30.4, 26.2)

สำหรับตัวอย่างจากอากาศปริมาตรสูงทั้งหมดในกานปูร์ (n = 53) เราได้เติม BobCat eluate ปริมาณ 1 มล. ในจาน Compact Dry-EC (CD-EC) (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, USA)[95] สำหรับจานเพาะเชื้อ coliform และ *Escherichia coli* เช่นเดียวกับตัวอย่างจากอากาศปริมาตรสูงที่ลาปาซ (n = 31) และแอตแลนต้า (n = 15) เราได้ใช้วิธี Viable Andersen Cascade Impactor (ACI) 6 ขั้นตอน และทำการแบ่งตัวอย่างเป็น 6 ช่อง ด้วยอัตราการหมุนเวียนที่ 28.5 ลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเก็บละอองลอยชีวภาพขนาด 0.65 ถึง >7 ไมโครเมตร (ACI, Thermo Scientific).[96] เราใช้ AquaTest medium (Sisco Research Laboratories PVT. LTD., India) ใน ACI เพื่อหาเชื้อ *E. coli*.[97−99] ตัวอย่างเชื้อเพาะเลี้ยงทั้งหมดถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และนับจำนวน colony-forming units (CFUs) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เมื่อผ่านไป 18-24 ชั่วโมง เนื่องจากการกู้คืนเชื้อ *E. coli* จากการเพาะมีอัตราค่อนข้างต่ำในตัวอย่างปริมาตรสูงจากกานปูร์ เราจึงใช้ ACI ที่ไวกว่าเดิมในการเก็บตัวอย่างจากลาปาซและแอตแลนต้าในช่วงหลัง ปริมตรเฉลี่ยของตัวอย่างที่เก็บด้วย ACI จากเมืองลาปาซและแอตแลนต้า อยู่ที่ 1.30 ม.^{3} (ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.23, 1.37) และ 0.970 ม.^{3} (ระดับความเชื่อมั่น 95% = 0.930, 1.01) ตามลำดับ

ข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยา. ที่เมืองลาปาซ เราได้ทำการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณรังสี UV จากแสงอาทิตย์ (UVB, 280-320 นาโนเมตร) อุณหภูมิ (°C) และความชื้นสัมพัทธ์ (%) ด้วยเครื่องวัดการแผ่รังสี Yankee Environmental Systems, Turners Falls, MA, USA) ในจุดที่ห่างจากพื้นที่เก็บตัวอย่าง 2-5 กิโลเมตร ขึ้นอยู่กับตำแหน่ง ในเมืองกานปูร์ เราเก็บข้อมูลของแต่ละตัวอย่าง จากพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง เราเก็บข้อมูลเกี่ยวกับอุณหภูมิ (°C) และความชื้นสัมพัทธ์ (%) โดยใช้ทรานสมิตเตอร์ Vaisala HUMICAP Humidity and Temperature Transmitter Series HMT330 (Helsinki, Finland) และเก็บข้อมูลความเร็วและทิศทางของลมด้วยเครื่องวัดความเร็วลม (Ambient Weather, AZ, USA) เราได้ทำการวิเคราะห์ linear regression เพื่อศึกษาถึงผลทางอุตุนิยมวิทยาต่อเชื้อก่อโรคลำไส้ที่อยู่ในละอองลอย การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด ทำโดย R version 4.0.2.[100] เราได้ประเมินตัวอย่างวันละครั้ง รวมถึงกระจายข้อมูลเกี่ยวกับช่วงเวลาที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งช่วงเช้า (8 โมงเช้าถึงเที่ยง) หรือกลางวัน (เที่ยงวันเป็นต้นไป)

https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05060
Environ. Sci. Technol. XXXX, XXX, XXX−XXX



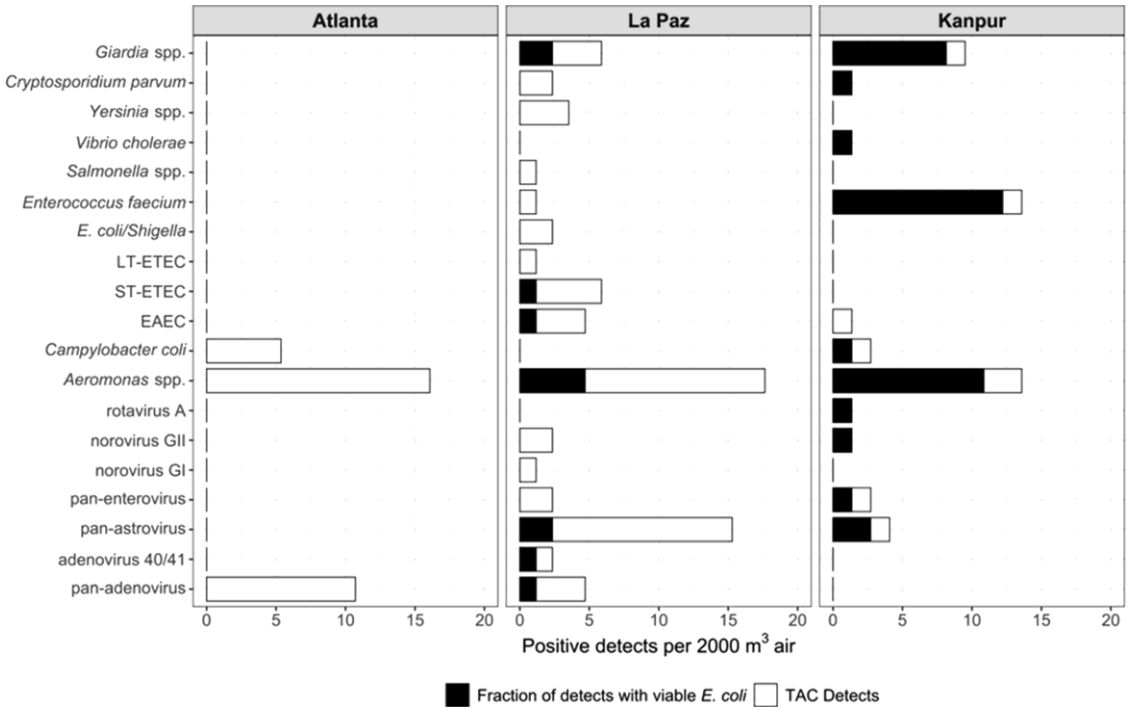
ภาพที่ 2. การกระจายตัวของขนาดกลุ่มเชื้อ *E. coli* จากการเพาะเลี้ยง และเชื้อ coliform รวมในเมืองลาปาซและแอตแลนต้า ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยแสดงให้เห็นถึงระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับความหนาแน่นของเชื้อแต่ละช่วงขนาด เราไม่ได้เก็บตัวอย่าง Andersen Cascade Impactor (ACI) ในเมืองกานปูร์ จึงไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับขนาดของเชื้อ *E. coli* ที่พบจากการเพาะในพื้นที่นี้

การตรวจหาเชื้อก่อโรคทางลำไส้: Multiplex qPCR. ในขั้นตอนแรกของการตรวจหาจุลินทรีย์ลำไส้ เราได้วิเคราะห์ตัวอย่างปริมาตรสูงจากเมืองกานปูร์จำนวน 40 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากลาปาซอีก 23 ตัวอย่าง จากคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด และอีก 13 ตัวอย่างปริมาตรสูงจากแอตแลนต้า (โดย 7 ตัวอย่างมาจากบริเวณที่ห่างจากผิวน้ำที่ได้รับผลกระทบในระยะน้อยกว่า 1 กม.) โดยใช้วิธี multiplex qPCR-based TaqMan Array Card (TAC) รวบรวมโดย Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). การแบ่งเซตของตัวอย่าง ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ทำการวิเคราะห์และน้ำยาที่มีปริมาณจำกัด ยีนเป้าหมายที่ได้นำมาใช้ได้แก่เชื้อไวรัสต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับภาวะสุขาภิบาล (pan-adenovirus, pan-astrovirus, pan-enterovirus, norovirus GI/II, rotavirus A–C, และ sapovirus I/II/IV/V), แบคทีเรีย (*Aeromonas* spp., *Campylobacter coli*, *Clostridium difficile*, ยีน *E. coli* ชนิดรุนแรงอีก 9 ชนิด (ตารางที่ S1), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* spp.), โปรโตซัว (*C. parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*) และหนอนพยาธิ (*Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*) รวมถึงตัวอย่างควบคุมอีกจำนวนหนึ่ง แม้ว่ายีนเป้าหมายส่วนมากจากเชื้อก่อโรค เชื้อบางตัวอาจไม่มีผลหรือความเกี่ยวข้องต่อสุขภาพยังไม่ชัดเจน[101] โดยเฉพาะในพื้นที่ที่เชื้อก่อโรคในลำไส้ที่ไม่แสดงอาการสามารถพบได้ทั่วไป[102]

การตรวจปริมาณเชื้อด้วยอณูชีววิทยา: ddPCR. ในการประมาณการณ์ความหนาแน่น เราได้หาปริมาณยีนเป้าหมายของเชื้อก่อโรคในลำไส้ 12 ชนิด ในตัวอย่างปริมาตรสูงจากละอองลอย ด้วยวิธี Droplet Digital PCR (ddPCR; QX200 Droplet Digital PCR System, Bio- Rad, Hercules, CA) ยีนเป้าหมายเหล่านี้ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับไวรัสที่เราเลือก (adenovirus A–F, pan-enterovirus, norovirus GI, and norovirus GII), แบคทีเรีย (*Campylobacter jejuni*, *E. coli* (EIEC) ลุกล้ำลำไส้/*Shigella*/spp., heat-stable enterotoxigenic *E. coli* (ST-ETEC) ที่ทนต่อความร้อนและเป็นพิษต่อลำไส้ และยีนเป้าหมายของ *Salmonella* spp. อีกสองชนิด), และโปรโตซัว (*Cryptosporidium* spp. และ *G. duodenalis assemblage B*) ยีนเป้าหมายเป็นตัวแทนของเชื้อเซตย่อยจาก TAC ที่ได้รับเลือกจากความเกี่ยวข้องทางสาธารณสุข ในบริบทของการก่อโรคในลำไส้ในระดับโลก[102] แม้ว่าเราจำเป็นต้องรวมเชื้อก่อโรคท้องร่วงที่มีความสำคัญในเชื้อกลุ่มย่อย เราก็ยังต้องรวมเชื้อที่มีส่วนในการเจ็บป่วยและการตาย ที่เป็นผลพวงจากโรคท้องร่วงเฉียบพลัน[105] ซึ่งเป็นหัวข้อที่ได้รับการศึกษาในงานวิจัยขนาดใหญ่เกี่ยวกับสาเหตุของโรคท้องร่วง[102,106–109] เราได้วิเคราะห์ขีดจำกัดในการตรวจหาในการทดลองแต่ละครั้ง ด้วยวิธี probit analysis ซึ่งออกแบบโดย Stokdyk et al.[110]

นอกจากการแบ่งเมืองและฤดูกาล (สำหรับเมืองลาปาซและกานปูร์) เราได้ทำการกระจายข้อมูลตามระยะทาง จากแหล่งที่มาใกล้เคียง เราได้เก็บพิกัด GPS ของพื้นที่เก็บตัวอย่างแต่ละจุด และประมาณการณ์ระยะทางตรงจากคลองระบายน้ำเสียแบบเปิดหรือผิวน้ำที่ได้รับผลกระทบที่ใกล้ที่สุด เราได้ใช้เกณฑ์ของ *priori* ที่ระยะห่าง 0–10 ม. และมากกว่า 10 ม. จากคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด (หรือผิวน้ำที่ได้รับผลกระทบในแอตแลนต้า) และทำการประเมินการตรวจพบยีนเป้าหมายต่อการทดลองแต่ละครั้ง สำหรับแต่ละระยะทาง เราใช้วิธี Wilcoxon rank sum test เพื่อประเมินว่าการตรวจพบในระดับโมเลกุลลดลงในระยะทางจากคลองระบายน้ำแบบเปิดที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ รวมถึงปัจจัยเกี่ยวกับเวลาและฤดูกาลเราใช้วิธี multiple linear regression เพื่อวิเคราะห์ผลกระทบของปัจจัยทางอุตุนิยมวิทยาต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมาย การวิเคราะห์ทั้งหมดนี้

https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05060



ภาพที่ 3. การพบเชื้อด้วยวิธี qPCR ต่ออากาศ 2000 ม^3 และสัดส่วนการพบเชื้อเมื่อเทียบกับเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ในตัวอย่างเดียวกัน

จัดทำโดย R version 4.0.2[100] และมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$)

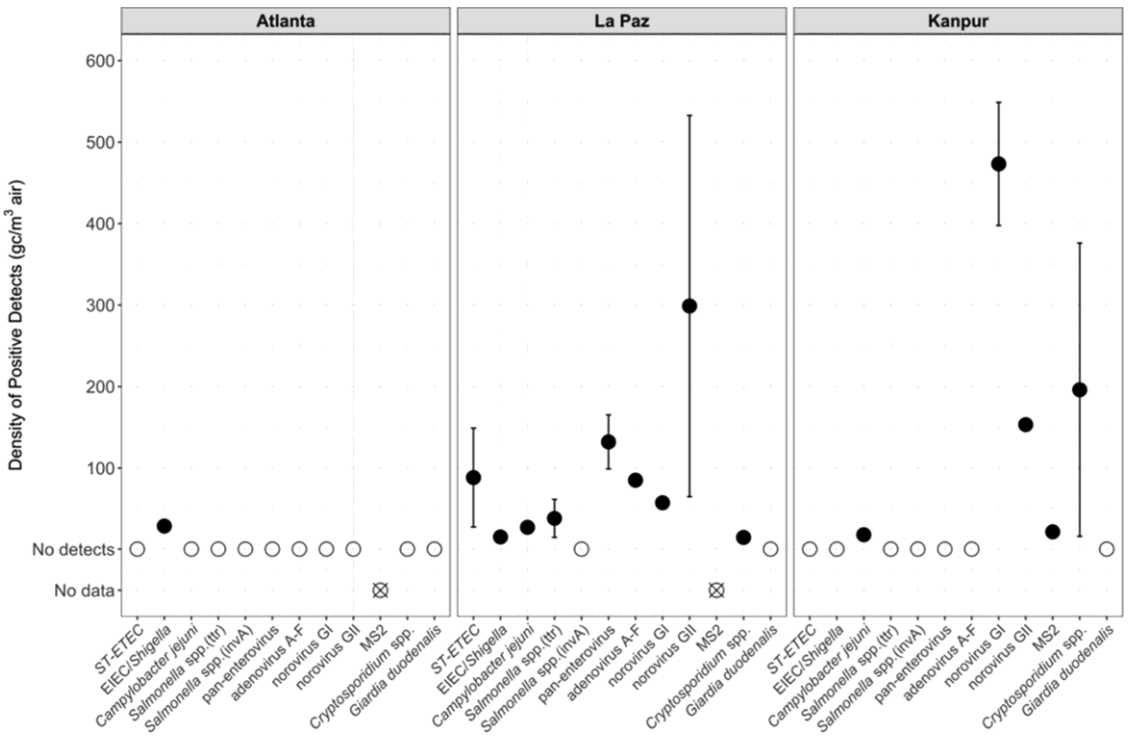
ผลการวิจัย

แบคทีเรียอุจจาระเพาะเลี้ยงในละอองลอย. เนื่องจากเราไม่สามารถวัดการอยู่รอดของเชื้อก่อโรคในทุก ๆ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง เราจึงใช้แบคทีเรียอุจจาระที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ เป็นตัวแทนทำการวัดศักยภาพการอยู่รอดของจุลินทรีย์ลำไส้ จากตัวอย่างที่เก็บจากอากาศในเมืองกานปูร์ ในบริเวณใกล้เคียงกับคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด (<1 กม.) และทำการวิเคราะห์โดยการเพาะเลี้ยง มีตัวอย่างจำนวน 61% ที่พบเชื้อ *E. coli* ในปริมาณเฉลี่ยและระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ 1.5 ± 1.3 CFU/m^3 ในทุกตัวอย่างที่มีการพบเชื้อ สำหรับทั้งหมด 45 ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ ความหนาแน่นเฉลี่ยของเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ 0.92 ± 0.41 CFU/m^3 ตัวอย่างควบคุมทั้งหมด ($n = 7$) มาจากแหล่งที่อยู่ห่างจากแหล่งที่ปนเปื้อนโดยอุจจาระ >1 กม. โดยตัวอย่างเหล่านี้มีผลลบต่อเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ ในเมืองลาปาซ พื้นที่ติดกับแม่น้ำ Choqueyapu และแหล่งน้ำใกล้เคียง จากการวิเคราะห์ 28 ตัวอย่างที่เก็บมาจากอากาศบริเวณใกล้เคียงกับของเสียที่ไม่ได้เก็บในที่มิดชิด (<1 km) เพื่อวิเคราะห์หาเชื้อ coliform ที่มีชีวิต ตัวอย่าง 52% มีการพบเชื้อ *E. coli* โดยมีความหนาแน่นเฉลี่ยและระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ 11 ± 3.8 CFU/m^3 . ใน 28 ตัวอย่าง รวมถึงตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ ความหนาแน่นเฉลี่ยของเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ 5.3 ± 2.1 CFU/m^3 เราไม่พบเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ที่ห่างจากของเสียเกิน 1 กม. (n = 4) การกระจายขนาดของเชื้อโดย ACI แสดงให้เห็นว่า 27% ของเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้มีขนาด 2.1 μm, ซึ่งเป็นจุดตัดของอนุภาคละอองลอย[112] ไม่มีตัวอย่างในแอตแลนต้าที่พบเชื้อ *E. coli* แม้ว่าเราจะพบเชื้อ coliform (ภาพที่ 2).

การตรวจจุลินทรีย์ลำไส้ในละอองลอย. เราได้วิเคราะห์ตัวอย่างปริมาตรสูงทั้งหมด 40 ตัวอย่างจากเมืองกานปูร์ 23 ตัวอย่างจากเมืองลาปาซ และ 13 ตัวอย่างจากแอตแลนต้า เพื่อวิเคราะห์หาโมเลกุลเป้าหมาย 42 ชนิด รวมถึงเป้าหมายจำเพาะของเกณฑ์ข้างต้น มีรายชื่อไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัวสำคัญระดับโลก เราทำการเก็บตัวอย่างในจำนวนที่หลากหลาย เพื่อเปรียบเทียบระหว่างจุดเก็บตัวอย่าง และเราได้ประเมินการพบเชื้อในบริบทของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บจากแต่ละจุด โดยใช้มาตรฐานที่ 2000 ม^3 เพื่อเปรียบเทียบได้โดยตรง ในเมืองลาปาซ เราตรวจพบขีนที่เกี่ยวข้องกับ astrovirus และ *Aeromonas* spp. จากหนึ่งในสามตัวอย่างควบคุม ในเมืองกานปูร์ เราตรวจพบเชื้อดังต่อไปนี้ จากโมเลกุลเป้าหมายในตัวอย่างควบคุม ($n = 8$): adenovirus, rotavirus ที่บ่งบอกชนิดไม่ได้, *Aeromonas* spp., EIEC/ *Shigella* spp., และ *Yersinia* spp. ส่วนที่จุดเก็บตัวอย่างควบคุมเมืองแอตแลนต้า($n=6$) เราตรวจพบ *Aeromonas* spp. ในหนึ่งตัวอย่าง

เราได้พบเชื้อตามเกณฑ์ที่วางไว้ โดยอิงจากขีนเป้าหมายของเชื้อก่อโรคในลำไส้ที่พบได้ในตัวอย่างที่ห่างจากอุจจาระรั่วไหลน้อยกว่า 1 กม. ในเมืองกานปูร์และลาปาซ ในเมืองกานปูร์ 53% ของตัวอย่างทั้งหมด ($n = 13$) มีการพบเชื้อ เมื่อเทียบกับขีนเป้าหมายอย่างหน่อยหนึ่งตัว ตัวอย่างอีก 28% ($n = 10$) มีการพบเชื้อ เทียบกับขีนเป้าหมายสองตัว และอีก 3% ($n = 4$) มีการพบเชื้อ เมื่อเทียบกับขีนเป้าหมาย 5 ตัว จากตัวอย่างที่พบเชื้อทั้งหมด เราพบขีนที่เกี่ยวข้องกับโปรโตซัวสองชนิด (*C. parvum* and *G. duodenalis*), ไวรัสสี่ชนิด (pan-astrovirus, pan-enterovirus, norovirus GII, and rotavirus), และแบคทีเรียห้าชนิด (*Aeromonas* spp., *C. coli*, pathogenic enter- oaggregative *E. coli* (EAEC), *E. faecium*, และ *V. cholerae*). ในเมืองลาปาซ 76% ของตัวอย่างทั้งหมดที่อยู่ห่างจากพื้นที่รั่วไหลของอุจจาระ ($n = 16$) มีการพบเชื้อเมื่อเทียบกับขีนเป้าหมายหนึ่งชนิด 62% ($n = 13$) มีการพบเชื้อเมื่อเทียบกับขีนเป้าหมายอย่างน้อยสองชนิด และอีก 19% ($n = 4$) มีการพบเชื้อเมื่อเทียบกับขีนเป้าหมายห้าชนิด การพบเชื้อเหล่านี้ มาจากขีนเป้าหมายของไวรัสห้าชนิด (adenovirus 40/41, pan-adenovirus, pan-astrovirus, pan-enterovirus, และ norovirus GII), และขีนเป้าหมายแบคทีเรียเก้าชนิด (*Aeromonas* spp., EAEC, ST-ETEC, heat-labile (LT)-ETEC, EIEC/*Shigella* spp., *E. faecium*, *Salmonella* spp., และ *Yersinia* spp.). ในเมืองแอตแลนต้า มีการพบเชื้อเทียบกับขีนเป้าหมายหนึ่งชนิด ใน 6 จาก 13 ตัวอย่าง (46%). ขีนเป้าหมายที่พบมีไวรัสหนึ่งชนิด (pan-adenovirus) และแบคทีเรียสองชนิด (*Aeromonas* spp. และ *C. coli*). มีสองตัวอย่างจากแอตแลนต้า ที่เก็บจากบริเวณข้างแม่น้ำ Chattahoochee และลำธาร Proctor ที่มีการพบสารพันธุกรรมของ adenovirus พร้อมกับสารพันธุกรรมของ *C. coli* ในปริมาณที่มากกว่าขีดจำกัดการตรวจพบ 95% สำหรับเชื้อทั้งสองชนิด โดยแม่น้ำ Chattahoochee มักจะพบเชื้อจากอุจจาระในระดับที่เหนือกว่าคำแนะนำของ EPA โดยพบที่ระดับมากกว่า 235 CFU ต่อ 100 มล.[86,113,114] ในการเปรียบเทียบผลที่ได้จากเมืองต่าง ๆ เราได้ปรับปริมาตรตัวอย่างเป็น 2000 ม^3 และได้คำนวณ

https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05060

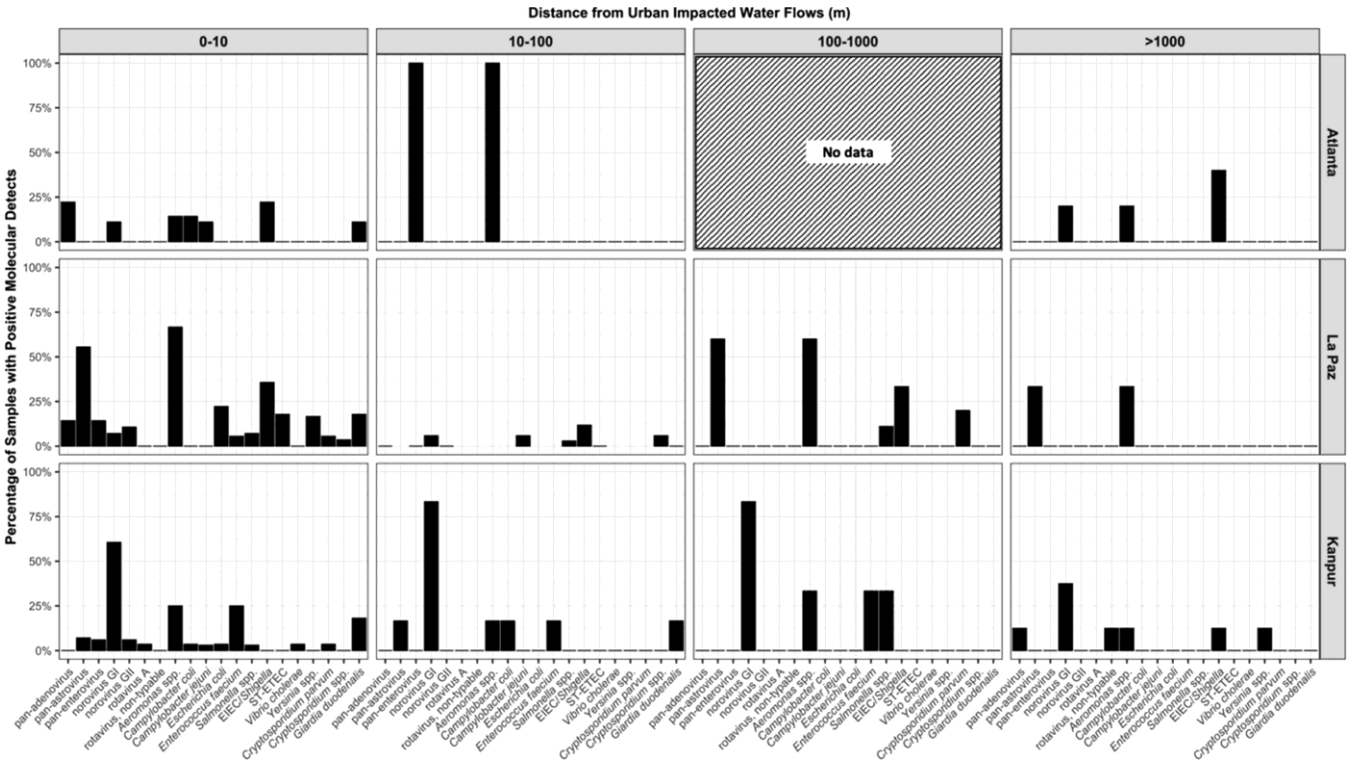


ภาพที่ 4. ความหนาแน่นเฉลี่ยของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ลำไส้ พร้อมความกระเจิงโดยเฉลี่ยเมื่อวิเคราะห์การพบเชื้อต่อจำนวนยีนต่ออากาศ 1 ม³ ค่าความหนานแน่นวิเคราะห์โดยใช้ขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ 95%

จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ จากค่าที่ถูกวัดนอกจากนี้ เราเน้นตัวอย่างส่วนที่พบเชื้อ ที่มีการพบเชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิต ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 3). ตัวอย่างประมาณ 25, 76, และ 0% จากเมืองลาปาซ กานปูร์ และแอตแลนต้า มีการพบเชื้อก่อโรค พร้อมกับ *E. coli* จากการเพาะเลี้ยงตามลำดับ เราพบความหลากหลายสูงสุดของเชื้อก่อโรคในตัวอย่างจากเมืองลาปาซ ซึ่งมียีนเฉพาะของโปรโตซัวลำไส้ 2 ชนิด แบคทีเรีย 10 ชนิด และไวรัสอีก 6 ชนิด เมื่อเทียบกับยีนเป้าหมายที่เราใช้ก่อนหน้านี้ ในเมืองลาปาซ เราพบยีนหลายชนิด ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคชนิด *E. coli* ได้แก่ EIEC/*Shigella*, LT และ ST-ETEC และยีนเป้าหมายสองชนิดของ EAEC ในเมืองกานปูร์ เราพบยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรโตซัว 2 ชนิด แบคทีเรีย 5 ชนิด และไวรัส 4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับยีนเป้าหมาย ในเมืองแอตแลนต้า เราพบยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรีย 2 ชนิดและไวรัส 1 ชนิด และไม่พบเชื้อ *E. coli* ที่เพาะได้ร่วมกับตัวอย่างดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์ด้วย linear regression เราพบว่าจำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อด้วยวิธี qPCR และการพบเชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิตในเมืองลาปาซนั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อกัน ($p = 0.02$)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของจุลินทรีย์ลำไส้ในละอองลอย. เราได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาตรสูงจากจุดเก็บตัวอย่างสามจุด เพื่อที่จะทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณหายีนเป้าหมายสำคัญที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคในลำไส้ เราตรวจสอบข้อมูลดิบ โดยใช้ขีดจำกัดการตรวจหาที่ 95% เป็นเกณฑ์การพบเชื้อ ที่แอตแลนต้า เราวิเคราะห์หา *Shigella* spp./ EIEC ในเชิงปริมาณ (พบเชื้อใน 3 ตัวอย่าง) In La Paz, we quantified ที่เมืองลาปาซ เราวิเคราะห์หา ST-ETEC ในเชิงปริมาณ (พบเชื้อใน 2 ตัวอย่าง) *Shigella* spp./EIEC (พบเชื้อใน 16 ตัวอย่าง) *C. jejuni* (พบเชื้อในตัวอย่าง) ยีน *Salmonella* spp. ttr (พบใน 3 ตัวอย่าง), pan-enterovirus (พบใน 3 ตัวอย่าง) adenovirus A–F (พบใน 1 ตัวอย่าง) norovirus GI (พบใน 3 ตัวอย่าง) norovirus GII (พบใน 3 ตัวอย่าง) และ *Cryptosporidium* spp. (พบใน 3 ตัวอย่าง). ในเมืองกานปูร์ เราทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบ *C. jejuni* (ใน 1 ตัวอย่าง จาก 53) norovirus GI (พบใน 33 ตัวอย่าง) norovirus GII (พบใน 1 ตัวอย่าง) MS2 (พบใน 1 ตัวอย่าง) และ *Cryptosporidium* spp. (พบใน 3 ตัวอย่าง) Among the detections above the 95% LOD threshold, target densities ranged from จากการพบเชื้อทั้งหมดที่เกินกว่าเกณฑ์ 95% ความหนาแหน่นของยีนเป้าหมายนั้นมีตั้งแต่ 1.5×10^1 gc ต่อ ม³ ถึง 4.7×10^2 gc ต่อ ม³ (ภาพที่ 4)

เราสังเกตเห็นความแตกต่างในการพบยีนเป้าหมายของเชื้อในลำไส้ (จากการวิเคราะห์หายีนในเชิงปริมาณ) ที่มีความแปรผันตามปัจจัยทางอุตุนิยมวิทยา แม้ว่าการแปรผล จะถูกจำกัดโดยขนาดตัวอย่าง ในเมืองลาปาซ อุณหภูมิเป็นปัจจัยเดียวที่เราวัด ที่มีผลกระทบต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บในช่วงเช้าอย่างเดียว การวิเคราะห์ด้วย linear regression แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางอุตุนิยมวิทยาเพียงอย่างเดียวที่ส่งผลกระทบต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมาย เมื่อทำการประเมินความสัมพันธ์ตรงระหว่างอุณหภูมิและยีนเป้าหมายแต่ละตัว เราพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของ pan-adenovirus, ST-ETEC, EIEC/*Shigella* spp., norovirus GI, และ norovirus GII density ลดลง ($p = 0.004$, $p = 0.01$, $p = 0.02$, $p = 0.03$, and $p = 0.01$ ตามลำดับ) เราไม่พบผลกระทบที่มีนัยสำคัญจากปัจจัยใด ต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมายในช่วงสายของวัน เมื่อเราทำการวิเคราะห์เพียงค่าเฉลี่ยโดยไม่จำแนกตามช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง เราไม่พบผลกระทบที่มีนัยสำคัญของปัจจัยใด ต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมายเชื้อก่อโรค เมื่อทำการจัดกลุ่มโดยแยกฤดูกาลในเมืองลาปาซ (ฤดูฝนหรือฤดูแล้ง) เราพบว่าความหนาแน่นโดยเฉลี่ยของเชื้อ *E. coli* เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูฝน ($p = 0.05$) ในช่วงฤดูฝน อุณหภูมิเฉลี่ย ความชื้นสัมพัทธ์ และค่ารังสี UV นั้นสูงกว่าฤดูกาลอื่น ในเมืองกานปูร์ เราพบว่าความหนาแน่นของ norovirus GI และ GII สูงกว่าปกติในช่วงฤดูแล้ง ก่อนมรสุม ($p = 0.00003$ and $p = 0.05$ ตามลำดับ) เมื่อจำแนกตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เก็บ โดยไม่รวมฤดูกาล เราพบความหนาแน่นของ norovirus GI ที่สูงกว่าในช่วงเช้า เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เก็บในช่วงกลางวัน ($p = 0.03$) เมื่อประเมินผลกระทบของปัจจัยทางอุตุนิยมวิทยาต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมาย โดยใช้วิธี multivariable linear model นั้น เราพบว่าความชื้นสัมพัทธ์เป็นปัจจัยเดียวที่ส่งผลกระทบต่อความหนาแน่นของยีนเป้าหมาย เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดโดย Vaisala เพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของ norovirus GI และ GII มีค่าลดลง (p=0.04และ p=0.03 ตามลำดับ)



ภาพที่ 5. อัตราส่วนการพบเชื้อ (โดย qPCR หรือ ddPCR) ในชุดตัวอย่างจากแต่ละจุด เมื่อเทียบกับระยะห่างทางตรงจากแหล่งน้ำที่ได้รับผลกระทบ ซึ่งมีการคำนวณความหนาแน่นตามเกณฑ์ขีดจำกัดการตรวจพบที่ 95%

เราทำการแยกข้อมูลตามระยะห่างจากคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด (สำหรับเมืองกานปูร์และลาปาซ) หรือแหล่งน้ำในเมืองที่ได้รับผลกระทบ (แอตแลนต้า) (ภาพที่ 5) ยีนเป้าหมายที่ตรวจพบมีจำนวนลดลง เมื่อระยะห่างจากคลองระบายน้ำเสียเพิ่มขึ้นในเมืองลาปาซและกานปูร์ เราพบความหนาแน่นที่ลดลง สำหรับยีนเป้าหมายตัวหนึ่งในเมืองลาปาซ (EIEC/ *Shigella* spp.) และกานปูร์ (norovirus GI) โดยรวมแล้ว เราพบการลดลงที่ชัดเจน (p = 0.005) ในแง่ของการพบยีนเป้าหมายของเชื้อก่อโรค (รวมถึงการพบเชื้อที่เกินขีดจำกัดในการตรวจจาก ddPCR และ qPCR) ระหว่างตัวอย่างที่เก็บในระยะห่างจากคลองระบายน้ำเสียไม่เกิน 10 เมตร และมากกว่า 10 เมตร ในเมืองลาปาซและกานปูร์ และแหล่งน้ำที่ได้รับผลกระทบในเมืองแอตแลนต้า นอกจากนี้ เราเห็นถึงอัตราการพบเชื้อก่อโรคประเภทแบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัวที่ลดลง (p = 0.006, p = 0.02, and p = 0.009 ตามลำดับ) ระหว่างตัวอย่างที่เก็บจากจุดที่ห่างจากแหล่งน้ำน้อยกว่าและมากกว่า 10 เมตร เราไม่พบความแตกต่างของอัตราการพบเชื้อตามฤดูกาล (ฤดูฝน/แล้ง) ในเมืองลาปาซและกานปูร์

การอภิปรายผล

ท่อระบายน้ำเปิดที่ระบายน้ำเสียจากพื้นที่ในประเทศ ตามสถาบัน พื้นที่เชิงพาณิชย์ และพื้นที่อุตสาหกรรม เป็นสิ่งที่พบได้มากในประเทศกำลังพัฒนา ท่อระบายน้ำเหล่านี้อาจมีบทบาทสำคัญในการระบายน้ำเพื่อควบคุมน้ำท่วม ท่อระบายน้ำเสียอาจเปิดสู่สภาพแวดล้อม เนื่องจากของเสียต่าง ๆ อาจทำให้ท่ออุดตันได้ ในเมืองที่ขาดการบริหารจัดการกับของเสีย คลองระบายน้ำเสียแบบเปิดจึงเป็นทางออกที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดของเสียที่สะสมจากการอาศัยของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม คลองระบายน้ำเสียแบบเปิดนี้ อาจส่งผลกระทบต่อชุมชนทางปลายน้ำ และผู้คนที่อยู่ใกล้กับแหล่งน้ำเปิดในเมือง ผลการวิจัยของเราแสดงให้เห็นว่า เมืองตามประเทศกำลังพัฒนา มีโครงสร้างพื้นฐานทางสุขาภิบาลไม่ดี และมีของเสียจากอุจจาระไหลรั่วมาสะสมตามท่อระบายน้ำเปิด จึงพบยีนจำเพาะของจุลินทรีย์ลำไส้ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค ในตัวอย่างละอองลอย โดยเชื้อเหล่านี้อาจแตกตัวมาจากสภาพแวดล้อมในเมือง โดยรวมแล้ว อัตราการพบเชื้อจากอุจจาระในตัวอย่างละอองลอยจากจุดที่ทำการศึกษานั้น สูงกว่าที่เราคาดการณ์ไว้ เมืองลาปาซและกานปูร์มีความหลากหลายและความหนาแน่นของจุลินทรีย์ลำไส้สูง เมื่อเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงในแอตแลนต้า รวมถึงพบได้มากที่บริเวณใกล้คลองระบายน้ำแบบเปิด และผิวน้ำที่ได้รับผลกระทบ เมื่อเทียบกับพื้นที่ที่อยู่ห่างจากแหล่งของเชื้อ การพบเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ควบคู่กัน ในตัวอย่างจำนวนมากจากเมืองลาปาซและกานปูร์บ่งอกว่า แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดที่พบในตัวอย่าง อาจมีชีวิตอยู่ในช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่าง เราไม่พบเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ ในตัวอย่างละอองลอยที่ได้มาจากแอตแลนต้า ความเสี่ยงต่อสุขภาพที่เกี่ยวข้องกับการพบจุลินทรีย์ลำไส้ในละอองลอยจากพื้นที่เหล่านี้ ยังไม่เป็นที่ทราบกัน แต่เป็นประเด็นสำคัญที่ควรศึกษาต่อ

งานวิจัยของเราเป็นการรวบรวมยีนเป้าหมายของเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญต่อวงการสาธารณสุขในระดับโลก เชื้อหลายชนิดไม่เคยตรวจพบในละอองลอยจากอากาศภายนอกในพื้นที่เมือง ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ จากปริมาณของเสียและประชากรที่หนาแน่น ในเมืองลาปาซ เราได้หาปริมาณของเชื้อ ST-ETEC ในละอองลอย 2 ตัวอย่าง ที่ความหนาแน่น 28 และ 150 gc/m^3 โดยเชื้อ ETEC ส่งผลให้มีผู้เสียชีวิตกว่า 50,000 รายทั่วโลกในปี 2016[115] แต่ยังไม่เคยหาปริมาณเชื้อจากละอองลอยในเมืองที่มีเชื้อนี้เป็นเชื้อเฉพาะถิ่น นอกจากนี้ เรายังรายงานผลเชิงปริมาณของเชื้อ EIEC/*Shigella* (ยีน *ipaH*, n = 16) จากแหล่งที่คล้ายกันเป็นครั้งแรก โดยพบความหนาแน่นตั้งแต่ 1.8 ถึง 53 gc/m^3 เราพบและหาปริมาณแบคทีเรียลำไส้ชนิดอื่น ๆ ที่ยังไม่เคยพบในละอองลอยจากตัวเมือง เช่น *C. coli* และ *Salmonella* spp. แม้ว่าเชื้อสองชนิดนี้อาจเคยมีการวิเคราะห์หาปริมาณตามอากาศในบริเวณที่มีการให้อาหารสัตว์[116,117]

เราพบเชื้อ *Aeromonas spp.* ที่เกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรมในเมืองแอตแลนต้า ลาปาซ และกานปูร์ พร้อมกับการพบเชื้อใน 8, 9, และ 7 ตัวอย่างต่อ 2000 m^3 ในพื้นที่เก็บตัวอย่างของแต่ละเมืองตามลำดับ เชื้อ *Aeromonas* spp. ถูกพบได้อย่างสม่ำเสมอในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย

https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05060

แม้ว่าเชื้อแอโรโมแนสบางชนิด จะเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ ในปี 2016 เชื้อ *Aeromonas* spp. ก่อให้เกิดการเสียชีวิตจากโรคท้องร่วงเพียง 1% และมีเพียง 19 จาก 36 ชนิดย่อย ที่เป็นเชื้อก่อโรค[115,119]

จากการพบไวรัสในเมืองกานปูร์และลาปาซ norovirus GI และ GII มีความเกี่ยวข้องต่อสุขภาพที่สุด เราพบ norovirus GI และ GII ที่ความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุด จากขีนเป้าหมายในตัวอย่างละอองลอยทั้งหมดจากกานปูร์ (320 และ 150 gc/ม^3 ตามลำดับ) ในเมืองลาปาซ เราพบ norovirus GII ที่ความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุด เมื่อเทียบกับขีนเป้าหมาย (13 gc/ม^3) และ norovirus GI ที่ความหนาแน่นเฉลี่ย 2.4 gc/ม^3 Norovirus มีความต้านทานต่อการหมดฤทธิ์ในสภาพแวดล้อม และอาจอยู่รอดตามพื้นผิวได้มากถึง 2 สัปดาห์ สามารถอยู่รอดได้ในละอองลอยและส่งผลให้มีภาวะติดเชื้อได้ในความหนาแน่นต่ำ ระหว่าง 18 และ 10^3 อนุภาคไวรัส

ไวรัสดังกล่าว เป็นไวรัสก่อโรคในลำไส้ชนิดหนึ่งที่มีความชุกสูงสุดทั่วโลก โดยมีผู้ป่วยกว่า 33,000 ราย และผู้เสียชีวิต 20,000 รายต่อปี[115,128,129] Norovirus แพร่ผ่านละอองลอยได้ และการสัมผัสทางอ้อมผ่านการบริโภค ยังเป็นปัจจัยที่ยังไม่ได้รับการวิเคราะห์มากพอ

เราพบงานวิจัยเพียงหนึ่งชิ้นที่รายงานถึงการพบโปรโตซัวลำไส้ในตัวอย่างอากาศ จากพื้นที่ชนบทของเม็กซิโก โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ การศึกษาดังกล่าวรายงานว่าพบเชื้อ *Cryptosporidium* ใน 8 จาก 12 ตัวอย่าง และพบ *Giardia* ใน 10 จาก 12 ตัวอย่าง โดยอาจพบในละอองลอยที่มาจากดิน[130] เมื่อเทียบกันแล้ว เราพบเชื้อ *G. duodenalis* โดย qPCR ในตัวอย่าง 22% จากเมืองลาปาซ และตัวอย่าง 18% จากเมืองกานปูร์ โดยมีการพบเชื้อ 3 และ 5 ครั้งต่อ 2000 ม^3 ในแต่ละจุดตามลำดับ มีการพบเชื้อ *Cryptosporidium*^{air} ในตัวอย่าง 9 และ 3% ในเมืองลาปาซและกานปูร์ตามลำดับ โดยพบเชื้อ 1 ครั้งต่อ 2000 ม^3 ทั้งสองเมือง เราได้หาปริมาณเชื้อ *Cryptosporidium* spp. ในตัวอย่างละอองลอยด้วยวิธี ddPCR ในเมืองลาปาซ (n = 3) และในประเทศอินเดีย (n = 2) ที่ความหนาแน่นเฉลี่ยตั้งแต่ 9.3 ถึง 560 gc/ม^3 ในครั้งที่สอง ได้มีการรายงานว่าพบเชื้อ *Cryptosporidium*^{air} ในละอองลอยและจากการวิเคราะห์ปริมาณในครั้งแรก เชื้อ *Cryptosporidium* ถือเป็นสาเหตุอันดับต้น ๆ ของโรคท้องร่วงระดับปานกลางจนถึงรุนแรง[102,131]

การศึกษาก่อนหน้านี้จำนวนหนึ่ง ได้บ่งชี้ของเสียจากอุจจาระที่อยู่ในละอองลอยและความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากแพร่กระจายของเชื้อทางละอองลอยในพื้นที่คล้ายกัน การศึกษาที่เราได้ทำที่ลาปาซและกานปูร์ก่อนหน้านี้ รายงานว่ามีการพบเชื้อ *Enterobacteriaceae* และ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ จากอากาศในเมือง ที่คาดว่ามีแหล่งที่มาจากคลองระบายน้ำเสียแบบเปิด[132−134] การศึกษาที่มาลาวีชิ้นหนึ่ง ได้ทำการหาจุลินทรีย์ลำไส้ (enterotoxigenic *E. coli*) ในอากาศในช่วงก่อน ระหว่าง และหลังดูดส้วม เพื่อยืนยันว่าจำนวนจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ลดลงในละอองลอย ช่วงที่มีการดูดส้วม[67] จากละอองลอยทั้งหมด 22 ตัวอย่างที่เก็บจากอากาศนอกอาคารในเมืองมุมไบ พบแบคทีเรียที่เพาะได้ 28 สายพันธุ์ รวมถึงเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส ได้แก่: *Staphylococcus* spp., *Serratia plymuthica*, *Serratia haemolyticus*, และ *Enterobacter aerogenes*.[60] ได้มีการพบแบคทีเรียในละอองลอย รวมถึงเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส โดยใช้ 16S rDNA sequencing ตามโรงทำปุ๋ยหมักในอินเดีย[56] *Staphylococcus aureus* และเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสชนิดอื่น งานวิจัยขนาดใหญ่จากเมืองปักกิ่ง ประเทศจีน ได้พบเชื้อจากวงศ์เดียวกัน นอกเหนือจากเชื้อ *Pseudomonas* 16 สายพันธุ์ (มีเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสบางชนิด) รวมถึงเชื้อที่เกี่ยวข้องกับอุจจาระอย่างเช่นเชื้อวงศ์ *Enterococcus, Escherichia, Vibrio*, และ *Yersinia*.[59]

การพบเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ในหลาย ๆ ตัวอย่างจากเมืองลาปาซและกานปูร์ บ่งบอกว่าแบคทีเรียก่อโรคสำคัญ ๆ เหล่านี้ (รวมถึง *E. coli* ก่อโรค) ไวรัส และโปรโตซัวได้ถูกพบในตัวอย่าง และเชื้อหลาย ๆ ชนิดนั้นมีชีวิตอยู่ในช่วงที่เก็บตัวอย่าง[136] เชื้อ *E. coli* ที่มักจะใช้เพื่อบ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระ บ่งบอกว่าอาจไม่ได้แสดงถึงการพบอุจจาระในตัวอย่างละอองลอยโดยตรง [137] เชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้อาจเป็นสัญญาณของสิ่งปนเปื้อนในละอองลอย เนื่องจากอาจไม่พบแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในสถานะละอองลอย และแบคทีเรียอาจหมดฤทธิ์หากสภาพแวดล้อมไม่อยู่ในจุดสมดุล[102] เชื้อก่อโรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวกับสุขาภิบาล เช่นเชื้อที่พบได้บ่อยในสิ่งแวดล้อม (*Cryptosporidium* oocysts) อาจอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในพื้นที่เดียวกัน[139] บ่งบอกว่าเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้อาจบ่งบอกถึงความอยู่รอดของเชื้อก่อโรคในลำไส้ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะโปรโตซัว

นอกจากนี้ เราพบว่า เราได้ใช้เชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ เพื่อบ่งบอกถึงการมีชีวิตของเชื้อเท่านั้น ไม่ใช่ความเสี่ยงต่อการสัมผัส: ไม่มีตัวเลขมาตรฐานสำหรับเชื้อ *E. coli* หรือเชื้อจากอุจจาระในละอองลอย ที่บ่งบอกถึงเกณฑ์ความเสี่ยงต่อการสัมผัสเชื้อในบริบทดังกล่าว นอกจากนี้ ความแตกต่างของวิธีการตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ตามสถานที่ต่าง ๆ เพื่อป้องกันการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงปริมาณโดยตรง และบอกถึงความเสี่ยงในแง่ของปริมาณเชื้อ *E. coli* ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับการอยู่รอดของเชื้อก่อโรคในละอองลอย อย่างไรก็ตาม การศึกษาเหล่านี้เป็นสิ่งที่ท้าทาย เนื่องจากวิธีการตรวจหาเชื้อก่อโรคลำไส้ในละอองลอยที่ความหนาแน่นต่ำจำเป็นต้องใช้อัตราการไหลสูง ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการรักษาเชื้อให้รอดชีวิต[140−142] ความหนาแน่นตามขนาดของเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ บ่งบอกถึงการมีแบคทีเรียลำไส้อยู่ในละอองลอย ตั้งแต่ 0.6 ถึง 7 μm เชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงได้ในขนาดต่ำกว่า 2.1 μm[112] บ่งบอกถึงการกระจายของละอองลอยในอากาศนับชั่วโมง ณ ความเร็วอากาศ 0.5 เมตร/ชั่วโมง สำหรับอนุภาคที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 μm[143] บ่งบอกถึงการแพร่กระจายทางอากาศที่สูง ในบริเวณใกล้คลองระบายน้ำเสียแบบเปิดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ขึ้น บ่งบอกว่าแบคทีเรียอุจจาระอาจสะสมตามพื้นผิวได้รวดเร็วขึ้น ความหนาแน่นตามขนาดของเชื้อแบคทีเรียอุจจาระ อาจบ่งบอกหรือไม่บ่งบอกถึงความเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ลำไส้อื่น ๆ รวมถึงไวรัสและโปรโตซัวก่อโรค แต่อาจมีประโยชน์ในแง่ของการศึกษาการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ลำไส้ แม้ว่ายังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อจำแนกความเสี่ยงในการสัมผัสตามขนาดของละอองลอย และแม้ว่าเชื้อก่อโรคในลำไส้บางชนิดจะก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจได้ เส้นทางการแพร่ละอองลอยในบริบทนี้ เกี่ยวข้องกับการสะสมของเชื้อก่อโรคตามพื้นผิว และการแพร่กระจายผ่านเส้นทางที่เป็นที่เข้าใจ ตามที่แสดงใน F-diagram[5]

มีหลักฐานทางระบาดวิทยา ที่บ่งบอกว่า ยิ่งอยู่ใกล้กับแหล่งน้ำในเมืองที่มีของเสียจากอุจจาระมากเท่าไหร่ ก็อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในลำไส้ Contreras และคณะ[147] ได้ทำการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างของบ้านกับคลองที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระที่ใช้ปลูกพืช และการเกิดโรคท้องร่วงในเด็กตามอำเภอต่าง ๆ ใน Mezquital Valley ประเทศเม็กซิโก เมื่อเทียบกับเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ที่อยู่ห่างจากคลองไม่เกิน 10 เมตร เด็กที่อยู่ห่างจากคลอง 100 เมตร มีโอกาสเป็นโรคท้องร่วงน้อยลงถึง 45% และเด็กที่อยู่ห่างจากคลอง 1000 เมตร มีโอกาสเป็นโรคท้องร่วงน้อยลง 70% ทางคณะวิจัยได้ประมาณการณ์ว่า 24% ของเคสท้องร่วงในการศึกษา และ 50% ของเคสทั้งหมด มาจากที่ห่างจากคลองไม่เกิน 100 เมตร ผู้เขียนได้คาดการณ์ว่าเชื้อก่อโรคในละอองลอยมาจากคลองเป็นหลัก ผลการวิจัยของเรายืนยันว่าพบเชื้อก่อโรคลำไส้จากละอองลอยในระยะห่างดังกล่าว และเราได้รายงานการลดลงของการพบสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระยะห่างจากแหล่งน้ำเพิ่มขึ้น แม้ว่าความหนาแน่นของสารพันธุกรรมต่อปริมาตรที่เราพบในละอองลอยนั้นต่ำกว่าที่เราอาจ

พบตามแหล่งน้ำเสีย ก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจากละอองลอยในบริเวณเหล่านี้ได้ จากข้อมูลว่ามีการพบแบคทีเรียจากอุจจาระในบริเวณใกล้เคียงกับศูนย์กลางของประชากร ขั้นตอนสำคัญต่อไปคือการผนวกผลการศึกษาเชิงระบาดวิทยา ที่ศึกษาเกี่ยวกับความเสี่ยงในเส้นทางการแพร่กระจายนี้ รวมถึงการศึกษาเชิงกล และการประเมินความเสี่ยงของจุลินทรีย์ในเชิงปริมาณ การศึกษาเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการประมาณการณ์ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและการมีชีวิตของจุลินทรีย์ทางละอองลองในทางตรงและทางอ้อม ที่เกิดขึ้นหลังจากการสะสมผ่านเส้นทางอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกระจายทางอุจจาระและทางปาก รวมถึงการประเมินความเสี่ยงโดยรวม ที่สำรวจผลของเส้นทางการสัมผัสที่หลากหลาย การประมาณการณ์ปริมาณเชื้อก่อโรคจำเพาะ เป็นขั้นตอนแรกที่จำเป็นต่อการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อทำความเขาใจเกี่ยวกับการประยุกต์จุลินทรีย์ในอากาศ รวมถึงการร่างเส้นทางการแพร่กระจายและประเมินความเสี่ยง

การศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดสำคัญบางประการ ที่ควรนำกลับมาพิจารณา ประเด็นแรกคือ เราไม่สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อก่อโรคในลำไส้ยังมีชีวิตอยู่ จากการตรวจหาเชื้อในระดับโมเลกุล แม้ว่าเราจะพบแบคทีเรียจากอุจจาระด้วยก็ตาม แม้การมีชีวิตของเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่าง อาจบ่งบอกถึงการมีชีวิตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่พบได้ในละอองลอยในทางอ้อม และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอาจเป็นตัวแทนของเชื้อดั้งเดิมที่ไม่ค่อยมีชีวิตรอดในละอองลอย[138,148] เราไม่ได้วัดการมีชีวิตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยตรง วิธีที่เราใช้สำหรับตัวอย่างปริมาตรสูง นำมาซึ่งแรงดันสูงและสภาวะแห้ง ซึ่งอาจลดอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์บนแผ่นกรอง[149] and และอาจทำให้วิเคราะห์ปริมาณเชื้อ coliform และ *E. coli* จากการเพาะเลี้ยงในเมืองกานปูร์ได้ต่ำกว่าที่ควร ในทางกลับกัน ACI ที่ใช้ในโบลีเวียและแอตแลนต้า เหมาะสำหรับการอยู่รอดและเติบโตของ coliform เนื่องจากละอองลอยชีวภาพได้รับผลกระทบจากอัตราการไหลที่ต่ำกว่า ไปสู่วุ้นอาการ์ที่มีสารอาหารและสัมผัสกึ่งแข็ง การเก็บตัอย่างละอองลอยปริมาตรสูง มักจะมาพร้อมกับสภาวะที่จำกัดการกู้คืนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต[150] วิธีการที่รักษาชีวิตของจุลินทรีย์ เช่น การบุกรุก และการระหายไอน้ำ มักจะทำได้เมื่ออัตราการไหลต่ำ (8–13 ลิตร/นาที) จึงจำเป็นต้องใช้ช่วงเวลาค่อนข้างนาน ในการจับตัวอย่างในความหนาแน่นต่ำ เราตระหนักว่าสารพันธุกรรมจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคในละอองลอย อาจส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือหมดฤทธิ์ หรืออาจอยู่ในสถานะสารพันธุกรรมนอกเซลล์ในสิ่งแวดล้อม ประเด็นที่สองคือข้อมูลของเราบ่งบอกว่าแหล่งน้ำที่เต็มไปด้วยอุจจาระอาจเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะสุขาภิบาลในละอองลอย ในตัวอย่างอากาศบริเวณใกล้เคียง และเราเห็นแนวโน้มความหนาแน่นที่ลดลง เมื่อระยะห่างจากแหล่งน้ำที่มีอุจจาระเพิ่มขึ้น เราไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าจุลินทรีย์ลำไส้ในละอองลอยมาจากแหล่งเหล่านี้ เมืองที่มีโครงสร้างสุขาภิบาลไม่ดี มักจะมีแหล่งปนเปื้อนหลายแห่ง รวมถึงคลองระบายน้ำเสียแบบเปิดและท่อระบายน้ำ และส้วมเปิด[67,151] ที่ผลิตอาหารสัตว์[56] หรือของเสียที่ไม่ได้บำบัด[152,153] ซาก สัตว์และของเสียจากสัตว์อาจพบได้ทั่วไปและแพร่กระจายทางละอองลอยได้ เรายังต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการติดตามละอองลอยชีวภาพ รวมถึงวิธีการวิเคราะห์สารพันธุกรรม ประเด็นที่สามคือ ผลในระดับโมเลกุลของเราอาจเป็นตัวแทนของความหนาแน่นขีนเป้าหมายแบบดั้งเดิมในตัวอย่างอากาศจากพื้นที่เก็บตัวอย่าง โดยอ้างอิงจากการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างปริมาตรสูง ที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกู้คืนอนุภาคขนาด 1 μm โดยมีตัวอย่างตั้งแต่ 73% ที่อยู่ในสภาวะคล้ายกับการศึกษาของเรา[150] ไปจนถึง 101% ที่อยู่ภายใต้สภาวะควบคุมภายในห้องปฏิบัติการ[154] สุดท้ายแล้ว การศึกษาชิ้นนี้มีขนาดตัวอย่างที่จำกัด จากแหล่งหลากหลายที่มีอุจจาระที่เราได้ทำการเก็บตัวอย่าง จึงส่งผลต่อการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อประเมินปัจจัยเสี่ยงต่อการพบเชื้อก่อโรคตามแหล่งต่าง ๆ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคจำเพาะ ภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุม เพื่อที่จะอธิบายเกี่ยวกับกลไกของละอองลาย การแพร่กระจาย การสะสม การมีชีวิต และการอยู่รอดของเชื้อในละอองลอย รวมถึงความเสี่ยงต่อการสัมผัสโดยมนุษย์

เราได้เน้นศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายทางละอองลอย ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ที่มาจากอุจจาระในสิ่งแวดล้อมภายนอก ที่ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัดถึงความเกี่ยวข้องกับการสัมผัสของมนุษย์ การติดเชื้อ และการแพร่โรค การแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคลำไส้ทางอุจจาระและทางปาก มักจะสรุปใน F-diagram ซึ่งจะอธิบายเกี่ยวกับเส้นทางหลักที่เป็นแหล่งทางตรงและทางอ้อมสำหรับการแพร่เชื้อก่อโรคในลำไส้: น้ำ ดิน มือ พื้นผิว อาหาร และแมลงวัน[5,155,156] เป็นไปได้ว่าละอองลอยควรถูกรวมเป็นส่วนหนึ่ง เพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติม ละอองลอยอาจทำให้เชื้อก่อโรคลำไส้แพร่กระจายได้ผ่านเส้นทางต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดการกระจายของการปนเปื้อนโดยอุจจาระและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการสัมผัส การหายใจเข้า หรือการบริโภค ทั้งในทางตรงและทางอ้อม เมื่อเชื้อได้สะสมตามพื้นผิว อาหาร น้ำ หรือเส้นทางอื่น ๆ [6,147] ในหลาย ๆ บริบท มีเส้นทางการสัมผัสที่เกี่ยวข้องมากมาย[157] และละอองลอยอาจเป็นปัจจัยที่ยังไม่ได้มีการอธิบายเกี่ยวกับความเกี่ยวข้องในด้านความเสี่ยง แต่ไม่ควรถูกละเลยจากการพิจารณา ยังไม่เคยมีการประมาณการณ์ในระดับโลก ระดับชาติ หรือระดับท้องถิ่น เกี่ยวกับผลกระทบของการเจ็บป่วยและการตาย ที่มาจากการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคลำไส้ทางอากาศในสิ่งแวดล้อมภายนอก ส่วนหนึ่งเพราะปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่เข้าใจ และไม่ได้รับการศึกษา ไม่ว่าจะเป็นในด้านระบาดวิทยาหรือการประเมินความเสี่ยง งานวิจัยของเราเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่อธิบายเกี่ยวกับการแพร่กระจายในเชิงปริมาณตามพื้นที่ที่พบเชื้อก่อโรคลำไส้ได้ทั่วไป จึงเป็นตัวแทนของความเสี่ยงในการสัมผัสเชื้อ เราหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะกระตุ้นให้เกิดงานวิจัยทางระบาดวิทยาและโรคติดเชื้อเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการนี้ และประมาณการณ์เกี่ยวกับโรคและการตาย การอธิบายเกี่ยวกับการกระจายของเชื้อก่อโรคในลำไส้ จำเป็นต่อการออกแบบกลยุทธ์ เพื่อควบคุมการสัมผัสเชื้อ ในพื้นที่ที่อัตราการเติบโตของประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีสุขาภิบาลไม่ดี การแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในลำไส้ผ่านละอองลอยในบริเวณใกล้กับแหล่งน้ำที่มีอุจจาระ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม การวัดการมีชีวิตของเชื้อก่อโรค และการอยู่รอดในละอองลอย การอธิบายเรื่องสัมผัส การประเมินความเสี่ยงในเชิงปริมาณ และการศึกษาทางระบาดวิทยา จะเป็นประโยชน์ต่อขั้นตอนต่อ ๆ ไป ในการอธิบายความเกี่ยวข้องทางสาธารณสุขต่อปรากฏการณ์นี้