

# **Baranya megyei szennyvizek virológiai vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés

***Meleg Edina***

Programvezető: Prof. Dr. Emőd Levente

Témavezető: Dr. Szűcs György

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológia és

Immunitástani Intézet

ÁNTSZ Baranya Megyei Intézete, Regionális Virológiai Laboratórium

Pécs, 2007

# TARTALOMJEGYZÉK

ELŐSZÓ	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETÉS	5
I.1. A természetes vizek szerepe a vírusok terjedésében	6
I.2. Szennyvíz	7
I.3. Szennyvíztisztítás	9
I.4. A vírusok túlélése a környezetben	11
I.5. A fekális szennyezés indikátorszervezetei	15
I.6. Víruskoncentrálni és víruskimutatási eljárások vízmintákból	18
II. A VIZSGÁLATOK ELŐZMÉNYEI	21
II.1. A magyarországi vízvirológia története	21
III. CÉLKITŰZÉSEK	32
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
IV.1. Szennyvízminták	33
IV.2. Koncentrálni, virális nukleinsav kivonása	34
IV.3. Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)	35
IV.4. Szekvencia vizsgálat és filogenetikai analízis	39
IV.5. Belső kontroll	39
V. AZ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA A CÉLKITŰZÉSEK TÜKRÉBEN	42
V.1. Vizsgálati periódus I.	42
V.2. Vizsgálati periódus II. és III.	46
V.2.1. A szennyvíztelepek részletes virológiai jellemzése	46
V.2.1.1. Egyes szennyvíztelepek vírustartalmának összevetése	49
V.2.1.2. A szennyvíztelepek össz-vírusterheltsége	50
V.2.1.3. Kimutatásra ható inhibitorok (ellentmondásos mintapárok)	51
V.2.1.4. Tisztítási hatékonyság	51
V.2.1.5. Környezeti vírusterheltség	53
V.2.2. Az egyes vírusok érzékenysége	54
V.2.3. Klinikai és környezeti minták összevetése	55
V.2.4. Vírus-mennyiség meghatározása	56
V.2.5. Szekvencia vizsgálat	57
V.2.6. Filogenetikai összehasonlító vizsgálat	58
V.2.7. Szezonalitás	61
V.2.8. Kémiai és bakteriológiai eredmények	63
V.2.9. Vizsgálatok belső kontroll alkalmazásával	64
VI. MEGBESZÉLÉS	66
VII. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA	82
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
IX. IRODALOMJEGYZÉK	87
FÜGGELÉK	96

## **ELŐSZÓ**

Dolgozatom elkészítésénél a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának doktori szabályzata 15. § (1) pontjában (a PhD-értekezés védeése) leírtakat követtem.

Értekezésem bevezetőjében igyekszem az Olvasót megismertetni a környezeti virológia alapkérdéseivel. Ezt követően ennek a szakterületnek az előzményeit, majd munkám célját kívánom bemutatni.

Az anyagok és módszerek fejezetben részletesen ismertetem a vízminták koncentráálására, a virális nukleinsav kivonására és kimutatására használt metódusokat.

Eredményeim bemutatásánál csak röviden ismertetem a már publikált eredményeket, hiszen azok a függelékben megtalálható elsőszerzős közleményekben eredeti formában is olvashatók.

A megbeszélés fejezet a kitűzött célok megvalósítását, eredményeim összefoglalását, és a nemzetközi szakirodalmi adatokkal való összevetését tartalmazza.

Dolgozatom végén – pontokba szedve – a témában elért új eredményeimet ismertetem.

A függelék fejezetben a környezeti virológia és egyéb kutatási témák terén elért eredményeim szerepelnek, amelyet a disszertáció témájával kapcsolatos saját publikációk másolatai követnek.

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AdV	adenovírus	ml	milliliter
AMV-RT	avian myeloblastosis virus-reverz transzkriptáz	mM	millimól
ÁNTSZ	Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat	mtsai.	munkatársai
BOI	biológiai oxigénigény	NaCl	nátrium-klorid
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	nm	nanométer
bp	bázispár	nt	nukleotid
BSA	szarvasmarha szérum albumin	NY	nyers vízminta
cDNS	komplementer DNS	ORF	open reading frame (nyílt leolvasó keret)
DEPC	dietil-pirokarbonát	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DMSO	dimetil szulfoxid	PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
DNS	dezoxiribonukleinsav	PCR	polimeráz láncreakció
dNTP	dezoxiribonukleotid- trifoszfát	PEG	polietilén-glikol
dsDNS	double-stranded (duplaszálú) DNS	PFU	plakk-formáló egység
dsRNS	double-stranded (duplaszálú) RNS	PTE ÁOK	Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar ribonukleinsav
DTT	dithioeritol/ dithiothreitol	RNS	reverz-transzkripció
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RT	A csoportú rotavírus
EAdV	enterális adenovírus	RV-A	B csoportú rotavírus
EDTA	etilén-diamin- tetraacetát	RV-B	C csoportú rotavírus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	RV-C	szórás
g	gramm	SD	sodium-dodecyl- sulphate / nátrium- dodecil-szulfát
GuSCN	guanidin-tiocianát	SDS	secundum (másodperc)
HAdV	humán adenovírus	sec	single-stranded (egyszálú) RNS
HAsV	humán astrovírus	ssRNS	tisztított vízminta
HRV	humán rotavírus	T	ultraibolya sugárzás
HuCV	humán calicivírus	UV	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
kDa	kilodalton	WHO	mikrogramm
km	kilométer	µg	mikroliter
KOI	kémiai oxigénigény	µl	mikromól
l	liter	µM	
LB	Luria-Bertani		
M	mól		
m <sup>3</sup>	köbméter		
mg	milligramm		
min	minutum (perc)		

## I. BEVEZETÉS

Korunkban az ivóvíz és ipari víz iránti igény az urbanizáció, az ipar és a mezőgazdaság intenzív vízfelhasználásának következtében rohamosan nő. A WHO szakértői bizottsága szerint a vízszükséglet 1900 és 1990 között hatszorosára nőtt. Ez kétszer több a népességnövekedésnél, vagyis a vízigény 30 évenként megduplázódik. A víz az emberi szervezet számára éltető elem, ezért megfelelő mennyiségének és minőségének biztosítása alapvető feladat. Ugyanakkor közvetlenül ivóvíz-kitermelésre a Földön fellelhető vizek csupán 0,3%-a alkalmas. Az összes vízkészlet 97-98%-át az óceánok, tengerek tartalmazzák, mivel ez sós víz, így emberi igények kielégítésére közvetlenül nem használható. A fennmaradó 2-3%-nyi édesvíz jelentős része a sarki jégtakarók alkotója, így direkt módon az sem hasznosítható. 2025-re – becslések szerint – 3,3 milliárd ember nem jut majd öntözővízhez, és napjainkban is 1,75 milliárdan néznek szembe komoly vízhiánnyal. Ha a jelenlegi tendencia folytatódik, a vízigény kielégítése megoldhatatlan lesz (WHO, 1997), és a jövő háborúi sem az olajért, hanem a vízbázisok birtoklásáért folynak majd.

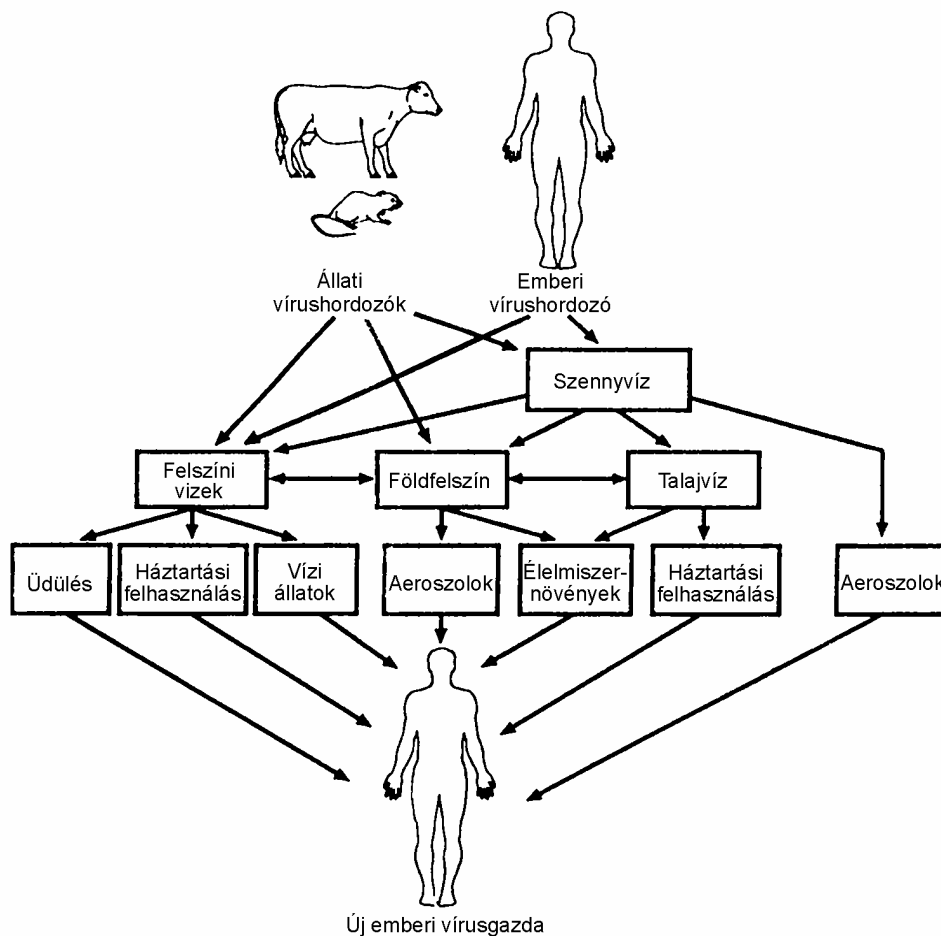
A világ vízfogyasztásának 70%-át a mezőgazdasági vízfelhasználás teszi ki, 20% az ipari vízfogyasztás, és 10%-át a háztartások használják fel. Az ivóvízkészletet azonban nemcsak a felszíni és felszín alatti vizek tarthatatlan kitermelése fenyegeti, hanem a háztartási (szennyvíz), ipari (különbféle anyagok, pl. nehézfémek) és mezőgazdasági (gyomirtók, rovarirtók) hulladékok is, amelyek kezelés nélkül ömlenek a folyókba és patakokba. Így az emberi fogyasztásra alkalmas, amúgy is szűk ivóvízkészlet különös veszélynek van kitéve. A *környezetvédelem* kérdéskörében ezért egyre fontosabb helyet foglal el a szennyvíz, valamint annak megfelelő kezelése. Napjainkban a szennyvizek *epidemiológiai* jelentősége is megnőtt. A víz és élelmiszer eredetű járványokkal kapcsolatban a környezeti virológia is egyre többet hallat magáról. Az USA-ban a víz eredetű járványok 10%-át okozza valamilyen virális ágens, de egyes tanulmányok a valódi arányt ennél jóval nagyobbra becsülik (Fout és mtsai., 2003).

A vírusok jelenlétének bizonyítása környezetünk vizeiben új fejezetet jelent mind a vízminősítési mutatók kidolgozása, mind az epidemiológiai intézkedések tekintetében.

## I.1 A természetes vizek szerepe a vírusok terjedésében

Az enterálisan ürülő vírusok többsége nagy mennyiségben távozik a szervezetből (Rao és Melnick, 1986). Korán kiderült, hogy több mint 100 különböző enterális vírus ürül az emberi széklettel (amelynek 1 grammjában akár 1 milliárd vírus is lehet) a kommunális szennyvizekbe. Az ürítők a fertőzött személyek és a tünetmentes hordozók. A szennyvízben lévő vírusok kontaminálhatják az *ivóvizet*, a *természetes vizeket* (tavak, folyók), az *üdülési vagy szórakozási célú vízterületeket*, de az *öntözésre* használt vizeket is; a vírusok a *tengeri állatokban* (kagylófélék) akumulálódva pedig újabb fertőzések és járványok kiinduló pontjai lehetnek. Az illegálisan a talajba vezetett tisztítatlan szennyvizek kontaminálhatják a *talajvizet*, az öntözés révén pedig az ember által fogyasztott *terményeket* is szennyezhetik, így potenciális népegészségügyi kockázatot jelentenek. Felismerték, hogy a szennyvízzel öntözött zöldségféléken a vírusok hetekig életképesek maradnak. Arról is beszámoltak, hogy egyes növények a gyökérzetükön keresztül is képesek felvenni a vírusokat (Seidel, 1983). Ezért a nem kellően kezelt növények kiterjedt járványokat idézhetnek elő. Hasonló veszélyt rejt magában a szennyvízzel terhelt vizekből származó rákok, halak, kagylók fogyasztása. Jól ismert, hogy a nyersen vagy megfelelő hőkezelés nélkül fogyasztott kagylók az egyik legfontosabb terjesztői lehetnek a májgyulladást és hasmenést előidéző vírusoknak. Különös jelentőségű ez akkor, ha figyelembe vesszük, hogy a hepatitis-A vírus osztrigában akár 2 hónapot is túlélhet. A kagylók nemcsak egyszerűen kiszűrrik a vírusokat a tengervízből, hanem tápcsatornájukban fel is dúsítják azokat (Melnick és mtsai., 1978).

Nyilvánvaló tehát, hogy a vírusok folyamatos körforgásban vannak a természetben (1. ábra).



1. ábra: A vírusok átviteli lehetőségei (Hurst és mtsai., 2002 nyomán).

Vírusok az összes természetes vízi környezetben előfordulnak, és az élővilágból származó víruszerű partikulumok száma elérheti a  $10^8$  értéket a víz minden egyes milliliterében (ez magasabb a vizekben található baktériumszámnál!) (Bergh, 1989; Girones, 2006). Ezért az emberi fogyasztásra vagy felhasználásra kerülő vizek bármelyike hordozhat potenciális veszélyt jelentő vírusszennyeződést.

## I.2. Szennyvíz

Környezeti vizeink közül közegészségügyi-járványügyi és virológiai szempontból a szennyvíz a legnagyobb jelentőségű. Szennyvíznek tekinthetők mindazok a vizek, amelyeknek háztartási, ipari vagy mezőgazdasági vízhasználat során eredeti jellege megváltozik, és mint használt vizek elbocsátásra kerülnek (MSZ ISO 5667-10). A szennyvízen belül a *kommunális szennyvíz* az emberi élettevékenységből származó

anyagokkal szennyezett víz. Az ilyen szennyvíz nagy mennyiségű szervesanyag- és baktériumtartalma mellett jelentős számban tartalmazhat fertőzőképes vírusokat is, ezért virológiai szempontból a legveszélyesebbnek tekinthető. Az *ipari szennyvizek* szennyezettségének mibenléte és mértéke ugyan az ipari tevékenység függvénye, mégis ki kell emelni közülük – fontos virológiai szerepük miatt – az állattartó telepek szennyvizeit, amelyekben főként állati, de esetenként emberre is veszélyes vírusok fordulnak elő.

A települési szennyvizekben előforduló legfontosabb enterális víruscsoportokat az 1. számú táblázat mutatja be.

<b>Víruscsalád</b>	<b>Genus</b>	<b>Legfontosabb vírusok</b>	<b>Okozott betegségek</b>
Adenoviridae	Mastadenovírus	Humán adenovírus A-F	szem-, légúti- és húgyúti fertőzések, gasztroenteritisz
Polyomaviridae	Polyomavírus	JCV	progresszív multifokális leukoencefalopátia
		BKV	nefropátia
Picornaviridae	Enterovírus	Poliovírus Enterovírus A-D	járványos gyermekbénulás, szem- és légúti fertőzések, miokarditisz, hasmenés, kongenitális szívrendellenességek
	Parechovírus	Humán parechovírus	gasztroenteritisz, légúti fertőzések
	Hepatovírus	Hepatitis A vírus	hepatitisz
Caliciviridae	Norovírus	Norwalk-szerű vírusok	gasztroenteritisz
	Sapovírus	Sapporo-szerű vírusok	
Hepeviridae	Hepevírus	Hepatitis E vírus	hepatitisz
Reoviridae	Rotavírus	Rotavírus (A-C)	gasztroenteritisz
Astroviridae	Mamastrovírus	Humán astrovírus	gasztroenteritisz

1. táblázat: A kommunális szennyvízben előforduló legfontosabb enterális víruscsoportok (Girones, 2006, módosítva).

A táblázatban feltüntetett vírusok nagy számban ürülnek a humán széklettel (Rao és Melnick, 1986), vizelettel, és számos emberi betegséggel hozhatók összefüggésbe. Ilyenek a hasmenéses megbetegedések (gasztroenteritisz), a szem- (okuláris) és a légzőszervi (respiratorikus) fertőzések, a májgyulladás (hepatitisz), a szívizomgyulladás (miokarditisz), vagy az agyhártyagyulladás (aszéptikus meningitisz). Az okozott betegség súlyossága természetesen függ az adott vírus infektív dózisától, a fertőzött személy korától, genetikai háttérétől, általános egészségi, immunológiai és tápláltsági



állapotától, valamint a közegészségügy működési hatékonyságától. Ebből adódik, hogy csecsemők, kisgyermek, idős vagy legyengült immunrendszerű emberek a legfogékonyabbak ezekre a fertőzésekre, így nagy valószínűséggel náluk súlyosabb megbetegedést okoznak ezek a vírusok. Számos vírus (pl. a polyomavírusok és az adenovírusok) már a korai gyermekkorban megfertőzhetik az embert, megalapozva ezzel az egyének perzisztens fertőzését. Az adenovírus néhány típusának virionjai például, amelyek a légzőszerveket fertőzik, az infekciót követően a széklettel akár egy évig is ürülhetnek (Girones, 2006).

A fekális-orális úton terjedő, közvetlen kontaktussal, kontaminált élelmiszerrel vagy vízzel átvihető enterális vírusok meglehetősen stabilak. Mivel többségük lipid burokkal nem rendelkezik, így a környezeti tényezőkkel szemben nagyfokú ellenállóképességet mutatnak (Girones, 2006).

A fentiek alapján tehát szükségesnek látszik végiggondolni, hogy a mai víz- és szennyvízkezelési eljárások elég hatékonyak-e és megfelelő biztonságot nyújtanak-e számunkra a vírusokkal szemben. Ezért a szennyvizek, különösen a kommunális szennyvizek virológiai vizsgálatának nagy a jelentősége, hiszen információt kaphatunk a helyi populáció vírusürítéséről, valamint a szokásos szennyvíztisztító eljárások vírusredukáló, víruselimináló hatásáról és áttételesen a környezet vírusterheltségéről.

### **I.3. Szennyvíztisztítás**

Tenyésztési kísérletek alapján a kezeletlen szennyvízben becslések szerint az in vitro vírusok száma  $1,82 \times 10^2$  -  $9,2 \times 10^4$  között változhat literenként, míg a kezelt vízben a kezelés szintjének megfelelően ez a szám literenként  $1,0 \times 10^{-3}$  -  $1,0 \times 10^2$ -ra csökkenhet (Griffin és mtsai., 2003).

A világ népességének többsége a tengerpartok mentén él, és az ott termelő szennyvíz gyakran közvetlenül vagy közvetve a tengerparti vizekbe jut. Például az USA-ban, ahol a teljes lakosság 37%-a lakik a parti területeken, naponta kb.  $3,78 \times 10^{10}$  liter tisztított szennyvíz kerül a tengerbe. 2000-ben 11000 strandot kellett bezárni az erőteljes szennyvízszennyezés miatt. Ez majdnem a duplája volt az előző évek adatainak. Globális szinten nézve, az amerikai tengerpart, amely a kontinens belsejéhez képest kétszer akkora ütemben fejlődik, kb. 90%-kal több tisztítatlan szennyvizet termel és juttat a tengervízbe.

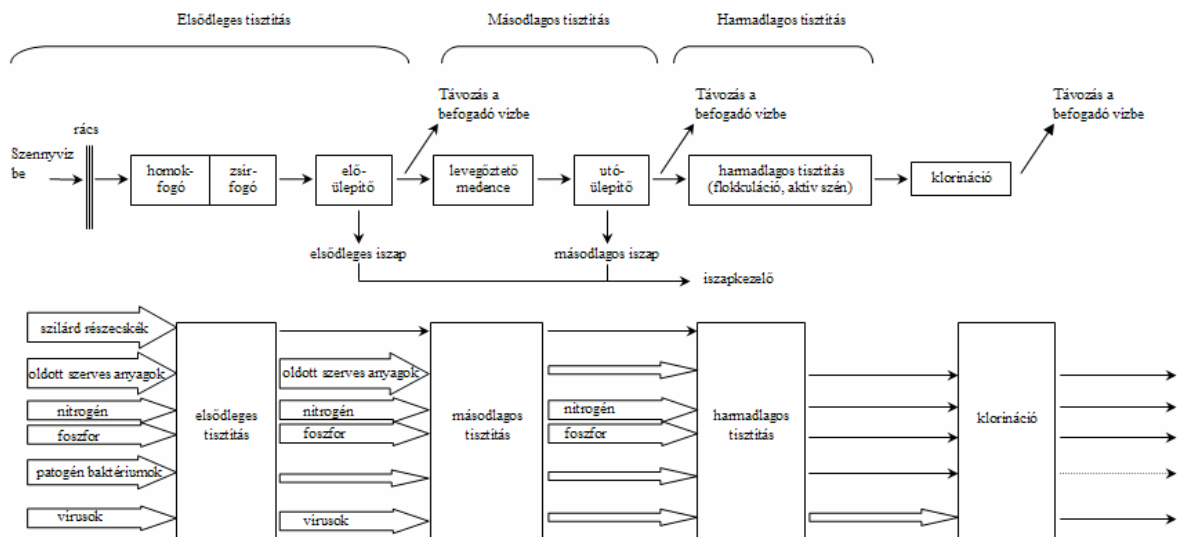
A tengerbe ömlő szennyvizek egy része csupán részlegesen tisztított és fertőtlenített. Például Los Angelesben, San Diegoban és Hawaii-on, csak a fel nem oldódó szilárd részeket távolítják el, mielőtt a szennyvizet a szabadba bocsátanák. Azoknál az összetett szennyvízcsatorna rendszereknél, amelyek befogadják és tárolják a tisztítatlan szennyvizet, nagyobb mennyiség esetén túlfolyás lép fel. Ezek mellett a szennyvízülepítő aknák és az egyedi elrendezésű rendszerek is hozzájárulnak a part menti vizek fokozott virális szennyezéséhez és rossz minőségéhez (Griffin és mtsai., 2003). Természetesen sokkal súlyosabb a vízszennyezés a fejlődő világ országainak természetes vízfolyásait és tengerparti szakaszait tekintve. Hazánkban is a budapesti kommunális szennyvizek 50%-a tisztítatlanul ömlik a Dunába. Ennek megoldására kezdték el építeni a csepeli szennyvíztisztító telepet, amelynek segítségével a tervek szerint 2010-re a főváros összes szennyvize biológiailag tisztítva kerül majd a Dunába ([http://www.kvvm.hu/dokumentum.php?content\\_id=1236&section\\_id=0](http://www.kvvm.hu/dokumentum.php?content_id=1236&section_id=0)).

A mikrobiológiai szennyezési folyamat ellenőrzésének és megállításának egyetlen lehetősége, ha új eszközöket és eljárásokat alkalmazunk e mikroorganizmusok tanulmányozására (Griffin és mtsai., 2003). A szennyvizek nem megfelelő tisztítása mind közegészségügyi, mind környezet-egészségügyi szempontból jelentős problémát jelent. Azonban a szennyvíztisztítás vírusokra kifejtett hatásáról jelenleg rendelkezésre álló ismeretek meglehetősen hiányosak és ellentmondásosak.

Egyes tanulmányok szerint az elsődleges tisztítás (fizikai eljárás; a nem oldott, darabos szennyezők mechanikus eltávolítása /kő-, kavics-, homok-, zsírfogó, ülepítők segítségével/) alig vagy egyáltalán nem csökkenti a szennyvízben lévő vírusok számát. Ezzel szemben a másodlagos tisztítás (biológiai eljárás; a lebegő szerves részecskék, oldott és kolloidális szerves szennyezők eltávolítása /mikroorganizmusok segítségével/) a vírusok 90-99%-át is eltávolíthatja (Girones, 2006). Ez az arány első hallásra akár megnyugtatónak is tűnhet. Figyelembe véve azonban az olykor igen magas kiindulási vírusszámot (pl.  $10^7$ /liter), megállapíthatjuk, hogy még az akár 99%-os tisztulás után is  $10^5$  partikulummal kell számolnunk literenként, ami kérdéseket vet fel a valódi tisztítási hatékonyságot illetően. Egyesek rávilágítanak arra is, hogy a klorináció, mint a legelterjedtebb vízfertőtlenítési eljárás, könnyedén elpusztítja a legtöbb baktériumot, azonban kevésbé hatékony a vírusok és a patogén protozoonok cisztáival szemben, ezért azok gyakran mutathatók ki az elfolyó szennyvízből. A klór ráadásul nagy

mennyiségben alkalmazva drága, sőt a vízben metánnal keveredve toxikus és rákkeltő klórozott szénhidrogének keletkezését idézheti elő (Csuros és Csuros, 1999) (2. ábra).

Számos kísérleti tapasztalat alapján tehát úgy tűnik, hogy a mai szennyvízkezelési és fertőtlenítési eljárások nem elég hatékonyak a vírusok eltávolítására, ezért az elfolyó szennyvízzel vírusok távoznak az élővizekbe, ahol fertőzőképességüket hosszú ideig megőrizhetik (Pusch és mtsai., 2005). Ezért olyan kezelési technológiát szükséges kidolgozni és alkalmazni, amely hatékonyan eliminálja a szennyvízben lévő vírusokat. Sajnos azonban ennek anyagi, módszertani és technikai feltételei ma még nem adóttak. Mindez azt is jelenti, hogy a vizekben és a szennyvizekben bárhol, bármikor a vírusveszéllyel is számolnunk kell.



2. ábra. A szennyvízkezelési folyamat általános sémája, és az egyes lépések során a kémiai, fizikai anyagok és mikrobiális patogének mennyiségében bekövetkező változások (Csuros és Csuros, 1999, módosítva).

#### I.4. A vírusok túlélése a környezetben

A vírusok obligát intracelluláris paraziták, amelyek csak fogékony gazdaszervezetben képesek szaporodni. Számos humánpatogén vírus igen ellenálló a környezeti behatásokkal szemben, sőt megfelelő körülmények között akár évekig is megőrzi fertőzőképességét a gazdaszervezeten kívül.

Hangsúlyozni kell, hogy a vírusok a vízben nem képesek szaporodni, így ott számuk nem is emelkedhet. Gazdasejt nélküli állapotban kedvezőtlen környezeti (hőmérséklet, fény, pH, kiszáradás, nyomás), fizikokémiai és biológiai (enzimek, poliszacharidok) tényezőknek vannak kitéve. Ezek a környezeti tényezők a vírus

gazdaszervezeten kívüli inaktivációját nagyban elősegítik. A vírusok stabilitása és ellenállóképessége alapvetően meghatározza egyik gazdából a másikba történő sikeres átjutásukat.

A vírusok fehérjeburokból és nukleinsavból állnak, amit bizonyos vírusok esetében lipidburok vesz körül. Fizikai, kémiai, biológiai illetve a környezeti faktorok specifikus befolyást gyakorolhatnak bármelyik víruskomponensre, megváltoztatva ezáltal a vírusok „működését”, túlélését (perzisztencia). Hatásukra a vírusok elveszíthetik fertőzőképességüket, replikációs aktivitásukat vagy inaktiválódhatnak (Bitton, 1980). Az említett környezeti faktorok jelentős hatást gyakorolnak a vírusok „életben maradására”, ezért a továbbiakban érdemes röviden áttekinteni e tényezőknek a vírusokra gyakorolt hatását.

#### *1. A fizikai tényezők hatása a vírusok túlélésére*

A fizikai behatások játsszák a legjelentősebb szerepet a vírusok túlélésében, a fertőzőképesség fennmaradásában. A legfontosabb fizikai tényezők a hőmérséklet, a fény és a kiszáradás.

*1/a.* A fizikai paraméterek közül a *hőmérséklet* az, amely a vírusok gazdasejten kívüli aktivitását leginkább befolyásolja, így ennek vizsgálata a legalkalmasabb a vírus túlélésének ellenőrzésére. A termikus inaktiváció széles körben alkalmazott és közkedvelt módja a vírusok – főként élelmiszerekből történő – eliminálására. A legtöbb vírus 55-65°C-on kevesebb, mint egy óra alatt elpusztul, bár hőrezisztencia tekintetében a víruspopuláció nem minden esetben mutat azonosságot. A poliovírus néhány termorezisztens variánsa rövid ideig akár a 75°C-ot is túléli.

Elfogadott tény tehát, hogy a hőmérséklet változtatása a leginkább alkalmas tényező a vírus túlélésének ellenőrzésére tengervíz, talaj vagy szennyvíz esetében.

*1/b.* Régóta ismert, hogy a *fény*, különösen az ultraibolya sugárzás (UV) csíraölő és fertőtlenítő tulajdonsággal rendelkezik. Az UV fény általi inaktiváció helye a nukleinsav, ahol az UV sugárzás a pirimidin gyűrűkben timin-timin dimerek kialakulását vagy az uracil hidratációját idézi elő. Éveken át sok helyen klorináció helyett ezzel fertőtlenítették például a vízkészletet vagy az elfolyó szennyvizet is. Előnye, hogy nem keletkezik toxikus maradvány, míg hátránya, hogy a hagyományos fertőtlenítésnél jóval drágább, valamint csak alacsony turbiditású vizek esetében alkalmazható.

Sokkal kevesebb információ áll rendelkezésünkre a *látható fény* vírust inaktiváló hatásáról. Az biztos, hogy mesterségesen gerjesztett látható fény elpusztít néhány állati vírust. A napfény, pedig igazoltan fontos szerepet játszik az enterovírusok inaktivációjában mind a természetes vizekben, mind az épített rendszerekben (pl. oxidációs tavak).

*1/c.* A vírusok élettelen felszíneken való jelenléte is fontos tényezője a transzmisszióknak. A *kiszáradás* a vírusok ellenállóságát befolyásolja olyan élettelen tárgyakon, mint a laboratóriumi asztal, a ruházat, a por, a kerámia csempék, a műpadló, de akár a talajokban, az aeroszolokban vagy éppen a szennyvizekben is. A vírusok különböző felszíneken való adszorbeálását az elektromosan töltött felszín eredményezi; lebegő szilárd részecskékhez való kapcsolódásukat a különböző eredetű vizekben gazdaszervezeten kívüli ellenállóképességük is segíti. Szennyvizeknél a vírusszám csökkenése akkor következik be, ha a szilárd anyagok koncentrációja 65% fölé kúszik. Ilyen esetben az RNS mag összeomlása okozza a vírus pusztulását.

*1/d.* Néhány fizikai tényezőnek a vírusok túlélésére gyakorolt hatásáról még keveset tudunk, ilyen a *nyomás*, a *hangenergia* és a vírus *aggregátumok* kialakulása. Mivel a vírusok a természetes vizekben főként aggregátumok formájában vannak jelen, így érdemes ezt az állapotot jobban áttekinteni. Az aggregátumokba tömörülő vírusok sokkal ellenállóbbak a környezet destruktív hatásaival szemben, és túlélési esélyeik is megnövekednek. Kísérletek igazolták, hogy a vírusok savas kémhatásnál (pH 3-5) aggregálódnak, de lúgos pH-n nem. A  $\text{Ca}^{2+}$ - és az  $\text{Al}^{3+}$ -ionok megfelelő koncentrációban és kombinációban ugyancsak elősegítik az aggregátumok kialakulását. Az aggregáció a vírusok fertőtlenítőszerekkel szembeni viselkedését is befolyásolja. (Bitton, 1980).

## *2. A kémiai tényezők hatása a vírusok túlélésére*

A fizikai tényezőkhez képest a kémiaiaknak kisebb szerep jut természetes környezetben a vírusok inaktiválásában. Ennek ellenére nem szabad figyelmen kívül hagyni őket. A vírusok inaktivációjában számos kémiai komponens vesz részt, mint a pH, a különböző kemikáliák és oxidáló ágensek, vagy a nehézfémek.

*2/a.* A vírusok a természetes vizekben széles pH tartományban (pH 5-9) stabilak. Habár néhány vírus alacsony *kémhatású* környezetben instabil, az enterális vírusok általában mégsem érzékenyek a savas pH-ra. Ugyanakkor a magas, 11 feletti pH igen

destruktív hatású számukra. A víz- és szennyvízkezelés során is ezt a magas pH-értéket használják ki. Ez ugyanis a fehérjeburok és a nukleinsav felépítésében is változást okozhat, és így eredményesen inaktiválhatja a vírusokat.

2/b. A *kemikáliák* egyaránt megváltoztathatják a nukleinsavat és a fehérjeburkot, bizonyos vírusok esetében a lipidburkot is. Ide sorolhatjuk például

- a formaldehidet, amelyet évekig használtak a vakcinagyártásban (formaldehides kezelés hatására a vírusok – a nukleinsav irreverzibilis destrukciója miatt – elveszíthetik fertőzőképességüket, de antigén sajátosságukat megtartják, a fehérjeburok nem denaturálódik, és képes immunválaszt is kiváltani),
- a salétromossavat, ami a purin és pirimidin bázisok deaminációját eredményezi,
- az étert, amely a lipidburkot változtatja meg, s amit gyakran használnak a vírus-szuszpenziók bakteriális és gombás fertőzéseinek szelektív pusztítására is,
- a fenolt, amely képes lebontani a kapszidburkot anélkül, hogy a nukleinsav-részt megváltoztatná. Az extrahált nukleinsav is megfertőzheti a gazdaszervezetet, bár alacsonyabb hatékonysággal.

2/c. Az *oxidáló anyagok* közül a halogének (pl. klór, jód, bróm) és az ózon általánosan alkalmazhatók a vizek és szennyvizek fertőtlenítésére.

2/d. A természetes vizekben a nehézfémek virucid hatását a pH-érték változása és a vízben lévő szerves anyagok együttes hatása befolyásolja.

### 3. A biológiai tényezők hatása a vírusok túlélésére

A bióta legfőbb összetevőit a vírusokkal szembeni kölcsönhatásuk révén tudjuk tanulmányozni. Az interakciók ismerete tovább bővíti a vírusok vízben és szennyvízben tapasztalt viselkedéséről szerzett eddigi információinkat, amelyeket később a közegészségügyben is hasznosíthatunk. Ma még nem rendelkezünk meggyőző bizonyítékokkal az emlősöket fertőző vírusok és a baktériumok, algák, protozoonok vagy a metazoonok közötti gazda-parazita kapcsolatokról.

3/a. A *Bacillus subtilis*, az *Escherichia coli* és a *Pseudomonas aeruginosa* az

enzimaktivitás redukálásával a vírusok számának csökkenését idézik elő különböző eredetű vizekben és a szennyvízben. A *B. subtilis* és a *P. aeruginosa* antivirális aktivitással rendelkeznek, és a vírus kapszidot szubsztrátként használják fel saját növekedésükhöz.

3/b. A mikro- és makroszkopikus *algák* antibiotikus tulajdonságai már régóta ismeretesek. Manapság a kemikáliák erőteljes használatának köszönhetően számuk jelentősen megnőtt, ami a vízi környezet biológiai egyensúlyára is nagy hatást gyakorolt. Az algák aktivitása (fotoszintézise) közvetlenül befolyásolja a vízben lévő baktériumok és vírusok viszonylagos állandóságát; hatásukra a víz pH-értéke és oldott oxigén tartalma megnő. Az algavirágzás során a víz pH-ja 10 fölé emelkedhet, és így a vírusok sokkal könnyebben inaktiválódnak. Ezt a jelenséget használják fel a mesterséges oxidációs tavakban.

3/c. Néhány, a *Ciliata* (*Tetrahymena pyriformis*) vagy a *Sarcodina* (*Naegleria gruberi*) nemzetségbe tartozó *Protozoon* számára az enterovírusok emészthetők, amelyek a protozoonokba kerülve így inaktiválódnak.

3/d. Az *antivirális anyagok* jelenléte leginkább az óceánokban figyelhető meg. A legtöbb tengeri állat (pl. kagylók) tartalmaz antivirális anyagokat.

### **I.5. A fekális szennyezés indikátorszervezetei**

A vizek minőségére vonatkozó fizikai, kémiai, biológiai és mikrobiológiai normákat különféle szabványokban rögzítik. Ezek mindig a víz szándékolt felhasználására való alkalmasság igazolására vagy kizárására irányulnak. E szabványokban vírusokra vonatkozó előírásokat egyáltalán nem találunk (2. táblázat). A szennyvizek minőségéről rendelkező szabvány (MSZ 260/31-57) például kimondja, hogy a megfelelően fertőtlenített szennyvíz virulens, kórokozó baktériumokat és életképes féregpetéket nem tartalmazhat, de vírusokról nem ejt szót. A szennyvizek szabványosított bakteriológiai vizsgálatánál (MSZ 260/25-56) is csupán említést tesznek arról, hogy bár közzismert tény, hogy a szennyvizek jó terjesztői lehetnek bizonyos vírusos megbetegedéseknek (pl. hepatitisz), kiemelik, hogy a vírustenyésztést annak különleges berendezés és felszerelés igénye miatt csak víruskutató szakosodott laboratóriumok végezhetik.

	Szabvány száma	Szennyvíz szabvány címe
1.	MSZ ISO 5667-10	Általános irányelvek
2.	MSZ 318/1-85	Szennyvíziszap vizsgálata. Általános irányelvek
3.	MSZ 318/19-81	Szennyvíziszap vizsgálata. Összes foszfor
4.	NIOSH-7600	Szennyvíz Króm (VI) tartalom meghatározása
5.	MSZ 260/2-55	Hőmérséklet, szín, szag meghatározása
6.	MSZ 260/3-73	Oldott- és lebegőanyagtartalom
7.	MSZ 260/4-71	pH meghatározása
8.	MSZ 260/5-71	Lúgosság és savasság
9.	MSZ 260/6-77	Kloridion meghatározás
10.	MSZ 260/7-71	Szulfátion meghatározás
11.	MSZ 260/8-68	Kénhidrogén és szulfidion meghatározása
12.	MSZ ISO 7150-1-92	Ammónium meghatározása
13.	MSZ 260/10-85	Nitrition meghatározása
14.	MSZ 260/11-71	Nitrátion meghatározása
15.	MSZ 260/12-87	Összes és szerves nitrogén tartalom
16.	MSZ EN 25663-1998	Kjeldahl-nitrogén meghatározása
17.	MSZ 260/13-80	Összes vastartalom meghatározása
18.	MSZ 260/14-71	Arzén meghatározása
19.	MSZ 260/15-67	Oldott oxigén meghatározása
20.	MSZ 260/16-82	Kémiai oxigénigény meghatározása
21.	MSZ 260/17-82	Aktív klór meghatározása
22.	MSZ 260/18-84	Klóriginény és klórmegkötő képesség meghatározása
23.	MSZ EN 1899-1	Biokémiai oxigénigény (BOI) meghatározása
24.	MSZ 260/20-80	Összes foszfor meghatározása
25.	MSZ 1484-1	Fenolindex meghatározása
26.	MSZ 260/22-74	Zsír- és olajtartalom meghatározása
27.	MSZ 260/23-74	Spitta-Weldert rothadási próba
28.	MSZ 260/24-56	Szennyvíz biológiai vizsgálata
29.	MSZ 260/25-56	Szennyvíz bakterológiai vizsgálata
30.	MSZ 260/26-56	Szennyvíz parazitológiai vizsgálata
31.	MSZ 260/30-79	Cianid-tartalom meghatározása
32.	MSZ 260/31-57	Irányelvek a szennyvizek minősítésére
33.	MSZ 260/32-51989	Krómtartalom meghatározása
34.	MSZ 260/39-88	Fluoridion meghatározása
35.	MSZ 260/42-77	Mintavétel és tartósítás
36.	MSZ 260/46-81	Tisztított szennyvíz átlátszóságának, üledék térfogatának és az iszap aktivitásának mérése
37.	MSZ 260/47-83	Anionaktív detegensek meghatározása
38.	MSZ 260/48-85	Vízzel nem elegyedő szerves oldószerek meghatározása
39.	MSZ 260/51-88	Kalciumtartalom meghatározása
40.	MSZ 260/52-89	Kalcium- és magnéziumtartalom meghatározása
41.	MSZ 260/28-56	Szennyvíziszap fizikai-kémiai vizsgálata
42.	MSZ 260/41-73	Kátránytartalom meghatározása

2. táblázat. A szennyvízvizsgálatokra vonatkozó szabványok.

Bár számos hazai (Dániel és Dömök, 1962; Simon és Pálfi, 1970; Pálfi és mtsai., 1970) és külföldi (Pusch és mtsai., 2005; Tsai és mtsai., 1994) vizsgálat kimutatta a vírusok szennyvízben, felszíni- és ivóvízben való előfordulását, mégsem létezik általánosan elfogadott és alkalmazható módszer ezen mikroorganizmusok kimutatására. A klasszikus epidemiológiai eszközök nem elég érzékenyek a vízeredetű



vírusjárványok jelzésére, főként akkor, ha azok azonnali és jellegzetes tüneteket nem produkálnak.

Ismerünk olyan indikátorszervezeteket, amelyek a fekális szennyezés jelenlétére utalnak, és annak kimutatására szolgálnak. Ezeket az organizmusokat (totál koliformok, fekális koliformok, bifidobaktériumok, valamint bakteriofágok száma, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* szám) használják a mindennapi rutin vízminősítési eljárásoknál (3. táblázat).

	<b>Indikátorok</b>	<b>Jellemzők</b>
<b>Koliform csoport</b>	<i>Totál koliformok</i> (aerob, fakultatív anaerob, gram negatív, nem spórás, pálcá alakú baktériumok, amelyek 48 óra alatt 35°C-on laktózt fermentálnak miközben gázt termelnek) › <i>Escherichia</i> › <i>Citrobacter</i> › <i>Enterobacter</i> › <i>Klebsiella</i>	- nagy számban ürülnek az emberi széklettel (~2 x 10 <sup>9</sup> /nap/ember), - nem specifikus csoport (akár talajban, zöldségekben is megtalálhatók)
	<i>Fekális koliformok</i> (minden olyan koliform, amely 44,5°C-on laktózt fermentál) › <i>Escherichia coli</i>	- pontosan tükrözi a melegvérű állatokból származó fekális anyagok jelenlétét
<b>Anaerob baktériumok</b>	<i>Clostridiumok</i> (anaerob, gram pozitív, spórás, pálcá alakú baktériumok) › <i>Clostridium perfringens</i>	- spórái ellenállóbbak a baktériumoknál és a vírusoknál, a környezetben sokáig túlélnek, - múltbéli pollúciót jeleznek
	<i>Bifidobaktériumok</i> (anaerob, gram negatív, nem spórás baktériumok) › <i>Bifidobacterium bifidum</i> › <i>Bifidobacterium adolescentis</i> › <i>Bifidobacterium infantis</i> › <i>Bifidobacterium longum</i> › <i>Bifidobacterium breve</i>	- alkalmasak az emberi és állati fekális szennyezések megkülönböztetésére, - oxigénérzékenyek, - környezeti mintákban megfelelő módszer hiányában nehezen kimutathatók, - denzitásuk szennyvízben magasabb a koliformokénál és a fekális streptococcusokénál
<b>Fekális streptococcusok</b>	› <i>Streptococcus faecalis</i> › <i>Streptococcus faecium</i> › <i>Streptococcus avium</i> › <i>Streptococcus bovis</i> › <i>Streptococcus equinus</i> › <i>Streptococcus gallinarium</i>	- vízi környezetben nem szaporodnak, - túlélésük nagyobb a totál/fekális koliformokénál, - fekális koliform (FC): fekális streptococcus (FS) arány jelzi a szennyezés eredetét FC:FS<0,7→állati szennyezést jelez, FC:FS>4→humán szennyezést jelez, - a koliformoknál jobban korrelál a vírusok jelenlétével
<b>Bakteriális fágok</b>	› <i>f2 kolifág</i> (ssRNS fág, F <sup>+</sup> <i>Escherichia coli</i> törzseket lizálja, fizikailag és kémiaiilag a leginkább hasonlít az enterovírusokra)	- nagy számban fordulnak elő szennyvízben (500000 PFU/100ml), - koliformoknál ellenállóbbak, - vizsgálatuk könnyű, gyors és 24 órán belül eredményhez vezet

3. táblázat: A vizek fekális szennyezését jelző indikátorok (Bitton, 1980).

A vírusok a baktériumoknál átlagosan egy nagyságrenddel kisebb méretük miatt a baktériumszűrőn könnyen átjutnak, felépítésük folytán a fertőtlenítőszerrel szemben ellenállóbbak, mint a higiénés indikátorbaktériumok többsége, amelyeket a fekális szennyezések jelenlétének kimutatására használnak. Néhány ma használatos indikátor sokkal érzékenyebb vagy épp rezisztensebb (pl. baktérium spóra) a környezeti stresszel és a fertőtlenítéssel szemben, mint a vírusok. Így a hagyományos vízminősítési eljárásokkal kapott negatív eredmény a biztonság hibás érzetét keltheti, és a vírus fenyegetettség alábecsléséhez vezethet, hiszen ha a víz baktérium-mentes, attól még tartalmazhat vírusokat (Bitton, 1980). Éppen ezért merült fel az a gondolat, hogy az „ideális” indikátor maga a vírus lenne, vagy egy olyan eszményi indikátor, amely a következő sajátságokkal rendelkezik:

- nagyobb számban van jelen, mint a vírus,
- legalább olyan rezisztens a fertőtlenítőszerrel szemben, mint a vírus,
- könnyen és gyorsan kimutatható, de nem fertőző (Bitton, 1980).

#### **I.6. Víruskoncentrálnálási és víruskimutatási eljárások vízmintákból**

A vízből történő vírusizolálási eljárások az utóbbi évtizedekben kezdtek teret hódítani, de a higiénés gyakorlatban napjainkban még nem válhattak rutin vizsgálatokká. E terület az elmúlt években hazánkban is egyre inkább előtérbe került. A jelenlegi módszertani lehetőségek mellett a baktériumok vírusai, a bakteriofágok vizsgálata végezhető el viszonylag egyszerűen a vízbakteriológiai laboratóriumok felszerelésével. A bakteriofágok fizikai és kémiai tulajdonságai közel állnak ugyan a vírusokéhoz, de megfelelő körülmények között – a gazda-baktériumok jelenléte miatt – képesek a vizekben szaporodni, ezért alapvetően eltérnek az emberi és állati vírusoktól. Nem véletlen tehát, hogy felmerül egy érzékeny és megbízható víruskimutatási módszer kidolgozásának igénye, amelynek segítségével valós képet kaphatunk ezekről a vizekben olykor viszonylag alacsony számban előforduló „valódi” vírusokról.

Amíg a virális ágensek kimutatásához ivóvíz vagy fürdővíz esetén nagy kiindulási vízmennyiségre van szükség (több tíz, vagy akár több száz liter), addig szennyvíznél – a magasabb vírus-koncentrációnak köszönhetően – kisebb volumen (1-2 liter) is elegendő. Sok esetben mégis az emberi felhasználásra szánt vizekben előforduló víruspartikulumok száma nagyon alacsony, ami ugyan elég lehet a betegség

előidézéséhez, de nem elegendő a laboratóriumi kimutatásukhoz. Ezért a vízmintákat a víruskimutatáshoz előzetesen koncentrálni kell. A víruskoncentrálásra kidolgozott módszerek többsége a vírusok fehérjeburkának vizes közegben mutatott fizikai-kémiai viselkedésén alapul. A vírusok vizes közegben nagy tömegű fehérjemolekula tulajdonságait hordozzák; jól oldódó sók hatására kicsapódnak, nagy molekulatömegük miatt ( $>10^6$  dalton) ultracentrifugálással ülepezíthetők, valamint polaritással rendelkeznek, ezért képesek adszorbensekhez kötődni. E tulajdonságok alapján öt alapvető tisztítási, koncentrálni technika alakult ki: 1. a két-fázisú szeparálás, 2. a kicsapás, 3. az ultraszűrés, 4. az ultracentrifugálás, valamint 5. az adszorpciós-elúciós eljárás (Andrási, 1983). Az öt alapvető technika mindegyike több finomításon esett át az elmúlt években, így napjainkig számos koncentrálni módszert fejlesztettek már ki, bár közülük csupán néhány igazán praktikus és könnyen alkalmazható.

1. A két-fázisú szeparálási eljárás alapelve, hogy két szerves polimer (pl. SDS és PEG) vízben történő oldást követően két elkülönült fázist fog alkotni. A vízben jelen lévő kolloidális részecskék és a makromolekulák végül a két fázis egyikében lesznek jelen.

2. Napjainkban az *ultrafiltrációt*, mint víruskoncentrálni módszert, elsősorban a szennyvizetből való vírus kimutatására használják. A szűrés során a vizet nagy nyomással egy membránon vezetik keresztül, amin – az ultraszűrő kis pórusmérete miatt – a vírusok és a makromolekulák visszamaradnak.

3. Annak ellenére, hogy az *ultracentrifugálás* nem tartozik az időigényes műveletek közé, mint koncentrálni eljárás mégsem terjedt el általánosan. Ennek egyik oka, hogy az ultracentrifugálás a vírusok koncentrálniására csak 50000 rpm felett eredményes, így a technikai felszerelés meglehetősen drága, másrészt a módszer nagy volumenű vízvizsgálatra nem alkalmazható.

4. A leginkább használatos műveletek közé sorolhatók az *adszorpciós-elúciós eljárások*. Közülük a legegyszerűbb *gézpárna módszer* esetében egy gézpólyát helyeznek a vízmintába. A vírusok rendszerint a vízben lévő szilárd anyagokhoz kapcsolódnak, és velük együtt adszorbálódnak a párna agyagához, amről megfelelő kémhatás mellett eluálhatók.

Napjainkban egyre szélesebb körben alkalmazzák a *membránszűrőket* környezeti mintákból történő víruskimutatásra. Ezek a filterek két csoportra oszthatók: pozitív és

negatív töltésű szűrőkre. Mindkét típus viszonylag nagy mennyiségű ivó-, illetve felszíni vízből kis térfogatba képes a vírusokat koncentrálni. Manapság inkább a pozitív töltésű szűrők (pl.: „Zeta-plus” filterek) használatát részesítik előnyben, mert ezek – a negatív töltésű szűrőkkel ellentétben – nem igénylik a vizek előkezelését, így a vizsgálat jelentősen meggyorsítható (Andrási, 1983).

5. A *kicsapási eljárás* talán a legegyszerűbb módszer. Ilyenkor a vírusokat jól oldódó sók (pl.: ammóniumszulfát, nátrium-klorid–polietilén-glikol) növekvő töménységénél csapják ki (Andrási, 1983; Minor, 1985).

Fontos megjegyezni, hogy a víruskoncentrálásra felhasznált anyagok, eszközök rendkívül drágák, ezért jelenleg csak szűk körben állnak a laboratóriumok és intézetek rendelkezésére.

A koncentrálás után a vírus kimutatását is meg kell oldani. Számos víruskimutatási módszert ismerünk, a szövetkultúrák alkalmazásától egészen a nukleinsav kimutatásán alapuló technikákig (Eaton és mtsai., 1995; Tsai és mtsai., 1994). Manapság a környezeti mintákból való víruskimutatáshoz a (reverz transzkripció-)polimeráz láncreakció (/RT-/PCR) a leginkább használt módszer (Tsai és mtsai., 1994). Újabban került a figyelem középpontjába a valós idejű (real-time) PCR rendszerek alkalmazása. Utóbbiak a hagyományos láncreakciónál érzékenyebbek, gyorsabban kivitelezhetők, valamint a víruskópiaszám meghatározására is alkalmasak, lehetővé téve így a víztisztítási hatékonyság mérését is.

## **II. A VIZSGÁLATOK ELŐZMÉNYEI**

A vízből történő víruskimutatásról szóló első beszámolók az 1930-as évek végén, az 1940-es évek elején láttak napvilágot, és a székletben, valamint a szennyvízben előforduló enterovírusokra (elsősorban a poliovírusokra) fókuszáltak (Dalldorf és Sickles, 1948; Paul és Trask, 1941). A vírusok szennyvízből történő kimutatása az USA-ban kezdődött, azóta a világ számos laboratóriumában folynak ilyen irányú vizsgálatok. Az emberi megbetegedésekben szerepet játszó vírusok jelentős részét, köztük az enterovírusokat, a hepatitis A és E vírusokat (Pusch és mtsai., 2005; Smith, 2001), a calicivírusokat (Pusch és mtsai., 2005), a rotavírusokat (Pusch és mtsai., 2005), az enterális adenovírusokat (Pusch és mtsai., 2005), és a polyomavírusokat (Bofill-Mas és mtsai., 2000) főleg az elmúlt évtizedben a világ több részén sikerült különböző eredetű vizekből kimutatni. Ezek közül ma – a májgyulladást előidéző vírusok mellett – a hasmenést okozó vírusok: a humán calicivírusok (HuCV), a humán rotavírusok (HRV), az enterális adenovírusok (EAdV) és a humán astrovírusok (HAstV) kimutatására látjuk a legtöbb törekvést.

### **II.1. A magyarországi vízvirológia története**

A külföldön végzett tanulmányok eredményeihez képest lényegesen kevesebb hazai adat áll rendelkezésünkre a vízben lévő vírusok jelenlétéről (Dániel és Dömök, 1962; Pálfi és mtsai., 1970; Simon és Pálfi, 1970).

A magyarországi vízvirológiai vizsgálatok enterovírusok szennyvízből történt kimutatásával az 1960-as években kezdődtek (Dániel és Dömök, 1962; Simon és Pálfi, 1970; Pálfi és mtsai., 1970), de később mind a technikai, mind a személyi feltételek hiánya miatt abbamaradtak. Az első vizsgálatokat Dömök és munkatársai végezték az Országos Közegészségügyi Intézetben (Dániel és Dömök, 1962). Kísérleteikben a víruskoncentrációhoz adszorpciós-elúciós eljárásokat használtak. Eredményeik arra engedtek következtetni, hogy tömegoltás után a poliovírus törzsek olyan koncentrációban vannak jelen a szennyvízben, hogy azok a minta 0,1 ml-éből kimutathatók. Majd 1961 első felében újabb tömegoltásra került sor attenuált poliovírus törzsekkel, így rendszeres kísérleteket végeztek annak megállapítására, hogy ezek a törzsek mennyi idő múlva jelennek meg az oltás után a főváros szennyvizében, illetve abból különböző időpontokban milyen gyakorisággal mutathatók ki. A következő

vizsgálatsorozatot a gyermekbénulás elleni trivalens oltások időszakában végezték. Ekkor országszerte a 3 hónapos-10 éves életkorú gyerekek részesültek oltásban. A vizsgálatok során több vírusizolálási módszert próbáltak ki (tamponos, illetve merített vízminta; kezeletlen, kétféle gyantával kezelt minták), hogy azok hatásfokát megállapítsák. Kísérleteikből kiderült, hogy a poliovírus az oltást követő 2. naptól kezdve kimutatható a szennyvízből, és a tamponos mintavétel adta a legmegbízhatóbb felvilágosítást a szennyvizek enterovírus-tartalmáról (Dániel és Dömök, 1962).

1968-ban több vírusizolálási kísérletet is végeztek különböző helyeken az eltérő víruskoncentrálnálási módszerek és a szokásos szennyvíztisztító eljárások hatásfokának megállapítására. Eredményeik igazolták, hogy a kalcium-hidrogénfoszfát adszorbens alkalmazása megfelelőnek látszik a szennyvízminták vírustartalmának vizsgálatára (Simon és Pálfi, 1970), illetve poliovírussal történő vakcinálást követően a vakcinatörzs még 2-3 hónapig kimutatható a szennyvízből. A szennyvíztisztító eljárások vírusredukáló hatásának összehasonlításából kiderült, hogy az elfolyó vízben az enterovírusok kimutathatók voltak, és csupán az élesztett iszapos eljárás során volt észlelhető bizonyos fokú vírusredukció (Pálfi és mtsai., 1970). Ezeket a kísérleteket újabbak nem követték, így azóta – sajnos – a környezeti virológia „néma terület” volt hazánkban.

Az ÁNTSZ Baranya Megyei Intézetének Regionális Virologiai Laboratóriuma a gasztroenterális vírusok referencia laboratóriumaként már évek óta foglalkozik a legfontosabbnak tartott gasztroenteritist okozó vírusok (HRV, EAdV, HAstV, HuCV) laboratóriumi diagnosztikájával, és kellő tapasztalattal rendelkezik ezeknek a vírusoknak a molekuláris epidemiológiai kutatásában is. Vizsgálataim megkezdéséig azonban e vírusok kimutatására – az okozott tünetek és epidemiológiai adatok elemzésével együtt – csak klinikai mintákból került sor.

Mivel az enterálisan ürülő vírusok rendkívül ellenállóak a különböző fizikai és kémiai behatásokkal szemben, ezért feltételezhető volt, hogy azok a szennyvízből is kimutathatók. Hazánkban még nem végeztek ilyen vizsgálatokat, pedig a kommunális szennyvizet is kezelő szennyvíztelepek jó lehetőséget adnak a közösségben cirkuláló enterális vírusok észlelésére.

A vizsgált vírusok jellemzőit a 4/1-5. táblázatokban mutatom be.

4/1.

	Astrovírusok/HAsV	Rotavírusok/RV-A	Rotavírusok/RV-B	Rotavírusok/RV-C	Calicivírusok/HuCV	Adenovírusok/EAdV
<b>Felfedezés, nevezéktan</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Madeley és Cosgrove, 1975. Anglia, csecsemőket érintő gasztróenteritisz járványból</li> <li>·gyűjtött székletmintákban,</li> <li>·astro nevet elektronmikroszkópban látható felszíni csillagszerű struktúrájukról kapták (astro=csillag),</li> <li>·<i>Astroviridae</i> család</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Bishop és mtsai., 1973. első humán esetek beteg gyermekből származó bélszövet mintából,</li> <li>·küllös kerékre emlékeztető elektronmikroszkópos kép alapján rotavírus elnevezés (rota=kerék),</li> <li>·<i>Reoviridae</i> család,</li> <li><i>Rotavirus</i> genus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·1970-es évek vége, 1980-as évek eleje</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>·Kapikian és mtsai., 1969. Norwalk város (Ohio állam), iskolai gasztróenteritisz járványból származó székletminták immun-elektronmikroszkópos vizsgálatával,</li> <li>·<i>Caliciviridae</i> család,</li> <li>humán genusok: Norovirus és Sapovirus, állati genusok: Vesivirus, Lagovirus,</li> <li>·genetikai változékonyságuk miatt „kvázispeciesek”</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·1953. műtéti úton eltávolított emberi garatmandulából készült szövettényészeteken spontán kialakuló sejt degenerációkat figyeltek meg, járványos légúti megbetegedésben szenvedő sorkatonák torok váladékából is izoláltak hasonló sejtkárosító hatású ágenseket,</li> <li>·adenovírus: vírus első izolálási helyére, az adenoid szövetre utaló név,</li> <li>·<i>Adenoviridae</i> család 4 nemzetség:</li> <li>Mastadenovirus (emlős), Aviadenovirus (madár), Atadenovirus, Siadenovirus</li> </ul>
<b>Morfológia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·28-30 nm átmérő, gömb alak, burok nélküli, felszínén 5/6-ágú csillagszerű struktúra,</li> <li>·újabb megfigyelések: 41 nm átmérő, kubikális szimmetria,</li> <li>felszíni tüskéket mutat, csak magas pH érték mellett veszi fel az első észlelésekor látott csillagszerű szerkezetet (3. ábra)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·70-74 nm átmérő, ikozaéderez szimmetria (nem a klasszikus ikozaéder – morfológiailag ez is gömb alakú),</li> <li>küllös kerékre emlékeztető szerkezete tengelyét a mag, küllőit a belső köpenyfehérjék képezik,</li> <li>a külső köpenyfehérjék kerékabroncsszerűen rendeződnek,</li> <li>külső kapszid fő összetevője: G típust (Glikoprotein antigén) meghatározó glikoproteid (VP7), e réteg síkjából 60 darab tűskeszerű képlet nyúlik ki, amelyek a P típust (Proteáz érzékeny antigén) meghatározó VP4 polipeptid dimerjei,</li> <li>belső köpeny: csoport-determináns VP6 molekulák alkotják,</li> <li>belső rétegen belül: VP2 molekulákból a kapszid magja („core”), amely magába zárja a 11 szegmentből álló genomot, a vírus RNS-függő RNS polimerázát (VP1) és guanilil-transzferázát (VP3) (5., 6. ábra)</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>·27-35 nm, burok nélküli, (7. ábra)</li> <li>·norovírusok: kicsi, kerek, struktúrált szerkezet, jellegtelen felszín,</li> <li>·sapovírusok: kehelyre, kupára (=calix) emlékeztető, vagy Dávid csillagra is hasonlító felszíni bemélyedések</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·70-90 nm átmérő, ikozahedrális szimmetria, 252 kapszomer építi fel,</li> <li><i>hexonok</i>: oldalakat felépítő egységek, további 6 alegységgel alkotnak nem kovalens kapcsolatot,</li> <li><i>penton</i>: a 12 csúcsban található, melyet 5 db <i>hexon</i> vesz körül. Részei: <i>penton alap</i> (rögzíti a pentont a kapszidban), <i>fiber</i> (alapba beágyazott nyúlvány-szerű képlet) (9. ábra)</li> </ul>
<b>Genomszerkezet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·pozitív egyszálú RNS, 3' végén poly-A farok, 6800 nukleotid hosszúságú,</li> <li>·3 fehérjekódoló szakasz (ORF: open reading frame): ORF1a, ORF1b, ORF2 (4. ábra)</li> <li>ORF1a (2700 nt) és ORF1b (1550 nt): a vírus szaporodásához nélkülözhetetlen nem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·dsRNS, 18500 bp hosszú, 11 szegmentből áll</li> <li>·a 11 génszegment 6 strukturális gént (VP1-VP4, VP6, VP7) és 6 nem-strukturális gént (NSP1-NSP6) kódol,</li> <li>·szero- és genotípus-specifitást a felszíni antigének (VP4 /P típus/ és VP7 /G típus/) hordozzák,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·dsRNS, 18000 bp hosszú, 11 szegmentből áll</li> <li>·génjei többé-kevésbé megfeleltethetők a RV-A örökítőanyaga által kódolt géneknek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·dsRNS, 17900 bp hosszú, 11 szegmentből áll</li> <li>·génjei többé-kevésbé megfeleltethetők a RV-A örökítőanyaga által kódolt géneknek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·pozitív ssRNS, 7300-7700 bázis hosszúságú,</li> <li>·norovírusok 3, sapovírusok 2 ORF, 5' végén ORF1: nem szerkezeti fehérjéket (helikáz, cisztein-proteáz, RNS-függő RNS polimeráz) kódol, ORF2: 56-60 kDa nagyságú kapszid fehérjét kódol,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·lineáris, ds DNS, 35000 bp hosszúságú, (10. ábra)</li> <li>·genom végén fordítottan ismétlődő szekvencia, egymással komplementerek, ezzel az egyszálú DNS cirkularizálódhat</li> </ul>

4/2.

<b>Genomszerkezet (folyt.)</b>	strukturális fehérjéket kódolja (RNS-függő RNS polimeráz, szerin proteáz), ORF 2 (2400 nt): strukturális fehérjéket kódol, amelyek a víruskapszidot építik fel	·jelenleg 16 G és 28 P típust ismerünk, emberi székletmintákból 10 G és 11 P típust azonosítottak, ·mindkét felszíni antigén ellen specifikus ellenanyag válasz jön létre, ezért a rotavírus törzsek kettős jelölést kapnak (pl. P[8],G9), ·génszegmentek könnyen reasszortálódnak			amely a kapszidot 90 kapszomerből építi fel dimerek formájában, ORF3: kis szerkezeti fehérje (22,5 kDa) kifejeződéséért felelős, jelentős rekombinációs hajlam (8. ábra)	
	<b>Astrovírusok/HAsTV</b>	<b>Rotavírusok/RV-A</b>	<b>Rotavírusok/RV-B</b>	<b>Rotavírusok/RV-C</b>	<b>Calicivírusok/HuCV</b>	<b>Adenovírusok/EAdV</b>
<b>Átvitel</b>	·fekális-orális út, közvetlen ember-ember kontaktus, átvivő közeg lehet: szennyezett élelmiszer (pl. osztriga), kontaminált víz	·fekális-orális út, szennyezett tárgyakkal, illetve vízzel és élelmiszerrel (pl. osztriga és egyéb kagylófélék) való átvitel, ·zoonózis			·fekális-orális út, szennyezett tárgyakkal, illetve vízzel és élelmiszerrel (pl. osztriga és egyéb kagylófélék), ·hányás során szóródó aeroszollal is	·direkt kontaktus, fekális-orális út, ·levegőben terjedő apró részecskékkel, néha vízzel
<b>Patogenezis</b>	·emberben még nem teljesen tisztázott, ·a vékonybél epithel sejtjeiben szaporodnak, villus atrófiát okoznak	·vékonybélbolyhok apikális részén lévő bélműsejteket fertőzik, a fertőzött sejteket elpusztítják, ·a patogenezisben több strukturális (VP3, VP4, VP7) és több nem-strukturális gén (NSP1-NSP4) is részt vesz, ·NSP4: virális enterotoxin, folyadék kiáramlást idéz elő a sejtekből	·vékonybélben sokszorozódnak, ·fertőzött bélműsejtekből szinciciumot képeznek, ·nem tisztázott	·vékonybélben sokszorozódnak, ·nem tisztázott	·vékonybélbolyhok sejtjeinek morfológiai és funkcionális károsodását okozzák, ·a vírusreplikáció helye nem ismert	·vírusreplikáció helye: humán légzőtraktus és gasztrointesztinális epithelsejtek
<b>Epidemiológia</b>	·világszerte elterjedt, ·természetes gazdák, pl. ember, bárány, borjú, kismacska, kutya, malac, egér, kacska, csirke, pulyka, ·8 különböző humán szerotípus (1-8), ·3 kockázati csoport ~csecsemők, és fiatal gyermekek, ·~idősek, ·~immunszuppresszált betegek, ·a sporadikus virális hasmenések 4-20%-át okozzák,	·világszerte elterjedt, ·természetes fertőzői: főemlősöknek, lónak, sertésnek, kutyának, macskának, nyúlnek, egérnek, marhának, pulykának, ·gyermekkori gasztroenteritiszek leggyakoribb kórokozói, 130 millió megbetegedés, 2-3 millió kórházi felvétel, 700 ezer halálest/év, ·leginkább az 5 év alatti korosztályt fertőzi, ·Magyarországon évente kb. 5000, öt évnél fiatalabb	·Kína, Dél-Ázsia (India, Banglades), ·inkább állatokat fertőz (természetes gazdái: ember, sertés, marha, juh, patkány)	·világszerte elterjedt, ·mind állatokat, mind embereket megbetegítenek (természetes gazdák: ember, sertés, vadászmenyét, kutya, marha), ·epidemiológiai jelentőségük kérdéses, többnyire sporadikus esetek, kisebb járványok, ·fertőzések csúcspontja: kora tavasszal (március, április)	·világszerte elterjedt, · <i>sapovírusok</i> : ritkán és elsősorban csecsemők, gyermekek és idősek körében fertőznek, epidemiológiájuk kevésbé ismert, gyermekkori gasztroenteritiszek 0,9-6,6%-át okozzák, · <i>norovírusok</i> : szórványos, heveny gasztroenterális megbetegedések, kiemelkedő szerep a járványos gasztroenteritiszekben, szórványos bélfertőzések 20%-át, nem bakteriális	·világszerte elterjedt, ·gerincesek valamennyi főbb osztályának képviselőjében sikerült kimutatni, ·140 szerotípus, emberi típusok száma 51, főleg légúti, szemészeti, emésztőrendszeri fertőzéseket, ritkán májgyulladás, húgyúti, szívizom, központi idegrendszeri megbetegedéseket okoznak, ·40, 41-es szerotípus: gasztrointesztinális



4/3.

<p><b>Epidemiológia (folyt.)</b></p>	<p>·fertőzések csúcspontja: mérsékelt övben téli hónapokban</p>	<p>gyermek kerül kórházba rotavírus okozta megbetegedés miatt,          ·fertőzések csúcspontja: mérsékelt övben az év hidegebb hónapjaiban, Magyarországon februári-márciusi esethalmozódás,          ·közösségen belül gyorsan terjed, nagy mennyiségben (<math>10^9</math>-<math>10^{11}</math> partikulum/ml) ürül, alacsony fertőzési küszöb (~10-100 partikulaum már betegséget okoz),          ·1990-es évek közepe: elindul a nemzeti rotavírus törzsfelügyelő (surveillance) program</p>			<p>gastroenteritisz járványok 70-90%-át is okozhatják,          ·járványok leggyakrabban időlegesen zárt vagy félig zárt emberi közösségekben fordulnak elő,          ·fertőzések csúcspontja: mérsékelt égövben legtöbbször tél-tavas (winter vomiting disease),          ·20-100 partikulum már betegséget okoz,          ·természetes gazdái: ember, sertés, marha</p>	<p>megbetegedések, gyermekek körében a 2. leggyakoribb fertőző ágens a rotavírus után,          ·fertőzések csúcspontja: téli és tavaszi időszak (légtúti fertőzések), nyár (kötőhártyagyulladások) (gastroenterális megbetegedések),          ·székletből kimutatható szerotípusok: 1, 3, 5, 7, 31, 40, 41</p>
	<p><b>Astrovírusok/HAsV</b></p>	<p><b>Rotavírusok/RV-A</b></p>	<p><b>Rotavírusok/RV-B</b></p>	<p><b>Rotavírusok/RV-C</b></p>	<p><b>Calicivírusok/HuCV</b></p>	<p><b>Adenovírusok/EAdV</b></p>
<p><b>Tenyésztés</b></p>	<p>·lehetséges, de nehezen szaporítható szövetkultúrákban,          ·laboratóriumi körülmények között a vírus szaporodásához a tripszin nélkülözhetetlen de szerepe nem ismert,          ·a mikroszkópos morfológiai kép alapján nem lehet egyértelműen következtetni a vírus szaporodására, ennek oka a magas tripszin tartalmú közeg, amely a sejteken a vírus citopatogén hatásához hasonló elváltozást okoz</p>	<p>·lehetséges, de a törzsek gyakran nehezen adaptálódnak <i>in vitro</i> fenntartott szövetkultúrákhoz, a szövetkultúra tápfolyadékhoz az adaptáció és a vírushozam növelése érdekében külsőleg adott proteázok (elsősorban tripszin) szükségesség</p>			<p>·tenyésztéssel és állattalással <i>in vitro</i> nem szaporítható</p>	<p>·lehetséges, elterjedt (de az enterális típusok nehezen tenyészthetők)</p>
<p><b>Immunitás</b></p>	<p>·gyermekkori fertőzéssel hosszútávú – feltehetően szerotípus-specifikus – védettség,          ·ellenanyag szintje valószínűleg az élet előrehaladtával csökken</p>	<p>·anyai antitestek az élet első 6 hónapjában bizonyos védelmet biztosítanak, első fertőzés nyomán kialakul a szerzett immunitás, amely az egymást követő fertőzések során erősödik,          ·de nincs élethosszig tartó védettség</p>			<p>·rövid ideig tart, gyakori az újrafertőződés</p>	<p>·a betegség során keletkezett ellenanyag védelmet nyújt újabb azonos típusú fertőzés ellen,          ·a védelem nem teljes, előfordulhat újrafertőződés</p>

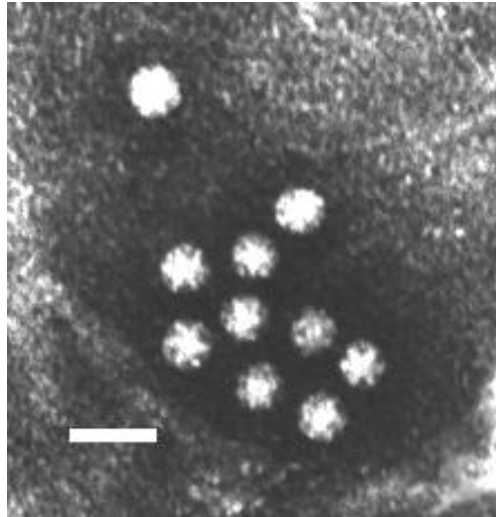
4/4.

	<b>Astrovírusok/HAsTV</b>	<b>Rotavírusok/RV-A</b>	<b>Rotavírusok/RV-B</b>	<b>Rotavírusok/RV-C</b>	<b>Calicivírusok/HuCV</b>	<b>Adenovírusok/EAdV</b>
<b>Laboratóriumi diagnózis</b>	székletminták direkt elektronmikroszkópos vizsgálata, ELISA (kereskedelmi forgalomban kapható), RT-PCR	elektronmikroszkópos vizsgálatok, latex agglutináció, ELISA immunkromatográfiás módszerek, PAGE, RT-PCR szükséges a mindennapi vírus diagnosztikai gyakorlatban	RT-PCR		elektronmikroszkóp, RT-PCR, Southern blot, ELISA	szövetenyészetben történő izolálás, PCR, restrikciós hasítás, komplement fixáció, immunfluoreszcencia, haemagglutináció gátlás, neutralizációs tesztek, ELISA, latex agglutináció
<b>Megelőzés</b>	·általános higiéniai procedúrák (kézmosás, tiszta ivóvíz) betartása	·általános higiéniai procedúrák (kézmosás, tiszta ivóvíz) betartása, vakcina (2006-2007-től világszerte, többek között Magyarországon is elérhető)			·általános higiéniai procedúrák (kézmosás, tiszta ivóvíz) betartása, ·vakcina fejlesztési kísérletek folynak (szájon át adható vírus-szerű partikulákkal a gyomor-béltraktus mucosális immunitását célozzák meg)	·higiéniai körülmények javítása fontos a fertőzés továbbterjedésének megakadályozásában, ·zárt szobák ventilátorainak rendszeres fertőtlenítése, fertőzött helyiségek sterilizálása, ·általános higiéniai procedúrák (kézmosás, tiszta ivóvíz) betartása
<b>Terápia</b>	·dehidráció orális úton/ intravénás folyadékpótlással helyreáll	·víz- és elektrolit pótlás, orális rehidrációs folyadék, ·esetleg kórházi megfigyelés, kezelés, a folyadék intravénás pótlása			·speciális antivirális terápia nincs, ·nagyobb folyadék és sóvesztés esetén kórházi ellátás	·nukleozid analóg hatóanyagú szerek (pl. cidofovir), nitrogénoxid, ·enterális típus: nincs specifikus terápia
<b>Első kimutatás környezeti mintákból (PCR-rel)</b>	1994. tengervíz, Myint és mtsai., 1997. környezeti vizek, Marx és mtsai.	1993. szennyvíz, Mehnert és Stewien, 1997. folyóvíz, Gilgen és mtsai., 1999. talajvíz, Abbaszadegan és mtsai., 1995. ivóvíz, Jothikumar és mtsai.	nem vizsgálták		1997. szórakozási célú víz (kenusok), Gray és mtsai., 1997. ivóvíz, Kukkula és mtsai., 1997. folyó, Gilgen és mtsai., 1999. szennyvíz, Lodder és mtsai., 2000. ásványvíz, Beuret és mtsai.	1994. folyó, szennyvíz, Puig és mtsai.
<b>Ellenállóképesség</b>	·meglehetősen ellánálló, ·fertőzőképes marad: 60°C 5-10 perc, -70, -85 °C 6-10 év, ellenálló különböző detergensok, lipídoldószeres, kloroform hatásával szemben, stabilitását meglehetősen savas (pH 3,0) környezetben is megőrzi	·meglehetősen ellánálló, ·fertőzőképes marad: szobahőmérsékleten 2 hét, 4°C 22 nap, -20°C 32 nap, liofilizáció, pH 3-11, ·fertőzőképességét elveszíti: pH 2, pH 12, 15 perc UV kezelés, 5 perc 8%-os formaldehides kezelés, 30 perc 70%-os alkoholos kezelés, lizol (2%), fenol (2%), hidrogén-peroxid (1%): 1 órás kezelés (Meng és mtsai., 1987)			·meglehetősen ellánálló, ·in vitro: stabilitását savas (pH 4-5) környezetben is megőrzi, érzékenyek magas Mg <sup>2+</sup> koncentráció mellett a magas hőmérsékletre, a tripszines kezelésre, megfigyeltek fertőzőképesség növekedést is tripszines kezelés hatására, számos törzsük ellenáll enyhe detergensok, éter és kloroform hatásának	·meglehetősen ellenálló, ·fagyasztott állapotban évekig fertőzőképes marad, jól tűri a kiszáradást, ellenálló enyhe savakkal, lúgokkal, alkohollal, detergensokkal szemben, hőhatással szembeni érzékenysége közepes

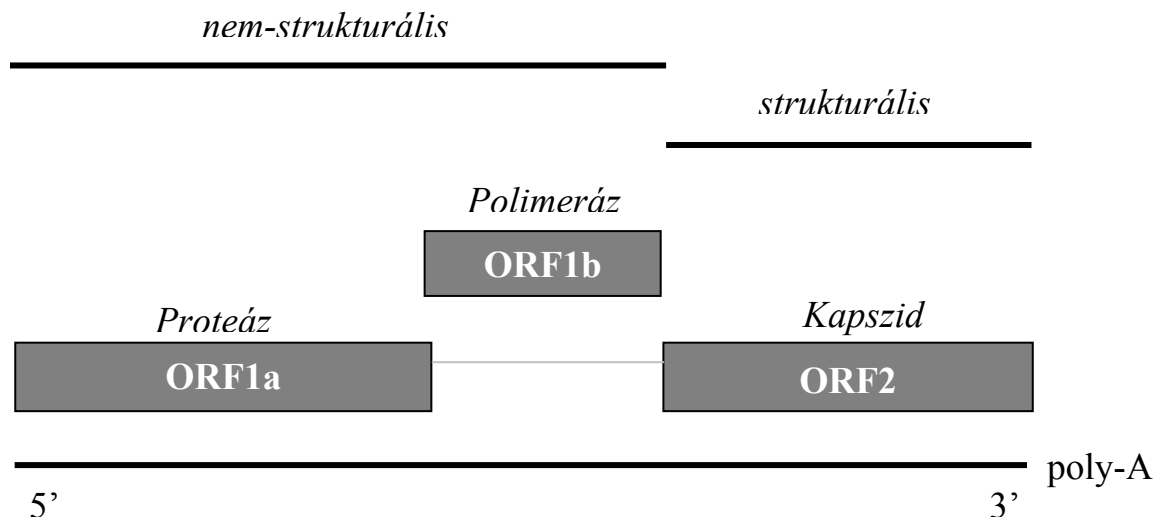
4/5.

	Astrovírusok/HAsTV	Rotavírusok/RV-A	Rotavírusok/RV-B	Rotavírusok/RV-C	Calicivírusok/HuCV	Adenovírusok/EAdV
<b>Klinikum</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·inkubáció: 1-4 nap, de gyakran tünetmentes fertőzés,</li> <li>·<u>hasmenés</u> (72-100%, 2-3 [21] napig, székletürítés: 1-10 alkalom/nap),</li> <li>·<u>hányás</u> (20-62%; 1-4 napig, 1-2 alkalom/nap),</li> <li>·<u>láz</u> (7-25%, 37-41°C),</li> <li>·<u>hasi fájdalom</u> (50%),</li> <li>·<u>dehidráció</u> (0-5%),</li> <li>·<u>fejfájás</u>,</li> <li>·<u>émelygés</u>,</li> <li>·<u>hányinger</u>,</li> <li>·<u>immunszuppresszálnál súlyosabb lefolyás</u>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·inkubáció: 1-2 nap,</li> <li>·<u>hasmenés</u> (vizes, 93%, 3-8 nap, székletürítés: 1-30 alkalom/nap),</li> <li>·<u>hányás</u> (69%, 1-3 nap, 1-20 alkalom/nap),</li> <li>·<u>láz</u>, (67%, 37- 41°C),</li> <li>·<u>hasi fájdalom</u> (19%),</li> <li>·<u>légtúti és idegrendszeri tünetek</u>,</li> <li>·<u>dehidráció</u> (3-19%) → súlyos esetben: <u>halál</u>,</li> <li>·<u>laktóz intolerancia</u>,</li> <li>·<u>immunszuppresszálnál súlyosabb lefolyás</u>, vírusürítés hetekig, hónapokig, antigének a vesében, májban is kimutathatók,</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>·inkubáció: 1-2 nap,</li> <li>·<u>hasmenés</u> (nem véres, nv.* 87%, átlag 4-nap (akár 28 napig is)/sv.** 95%, átlag 5 nap, akár 21 napig is),</li> <li>·<u>hányás</u> (nv. 74%, 1-7 nap/<u>sv. 60%, 2- akár 21 nap</u>),</li> <li>·<u>emelkedett testhőmérséklet</u> (nv. 32%/sv. 43%),</li> <li>·<u>hasi fájdalom</u> (nv. 51%/sv. 45%),</li> <li>·<u>fejfájás</u>,</li> <li>·<u>émelygés</u>,</li> <li>·<u>hányinger</u> (nv. 49%/sv. 38%),</li> <li>·<u>gyermeknekél</u>: hányás (akár hasmenés nélkül),</li> <li>·<u> felnőtteknél</u>: hasmenés (akár hányás nélkül),</li> <li>·<u>lefolyási idő</u>: 1-3 nap</li> <li>·a tünetek súlyossága és időtartama nagyban függ a fertőzött egyén életkorától!</li> <li>* <b>nv.=norovírus</b></li> <li>** <b>sv.=sapovírus</b></li> </ul>	<p>ENTERÁLIS TÍPUSOK:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·inkubáció: 7-8 nap, de gyakran tünetmentes,</li> <li>·rotavírus-fertőzéshez hasonló lefolyás, de enyhébb és hosszabb,</li> <li>·<u>hasmenés</u> (erőteljes, vizes, 5-12 nap),</li> <li>·<u>hányás</u>,</li> <li>·<u>láz</u>,</li> <li>·gyakran <u>laktóz intolerancia</u>,</li> <li>·<u>intusszuszcepció</u>,</li> <li>·<u>immunszuppresszálnál súlyosabb lefolyás</u></li> </ul>

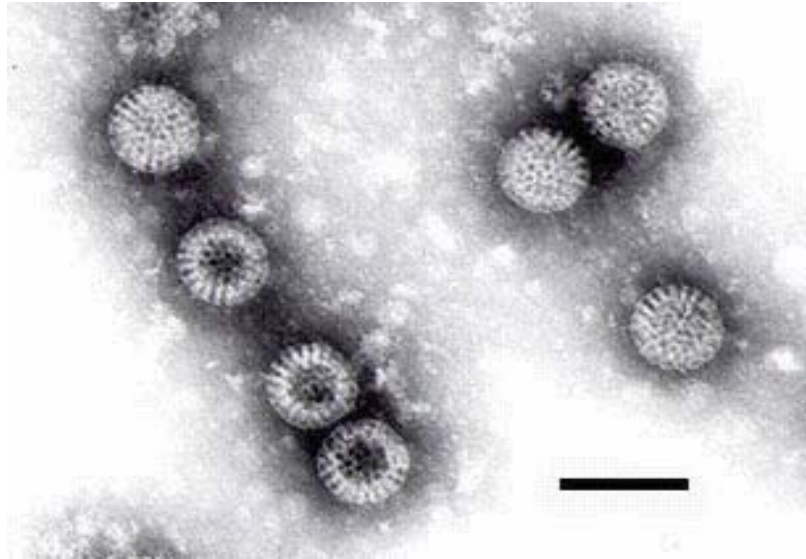
4/1-4/5. táblázat. A vizsgált vírusok jellemzőinek összefoglaló táblázatai.



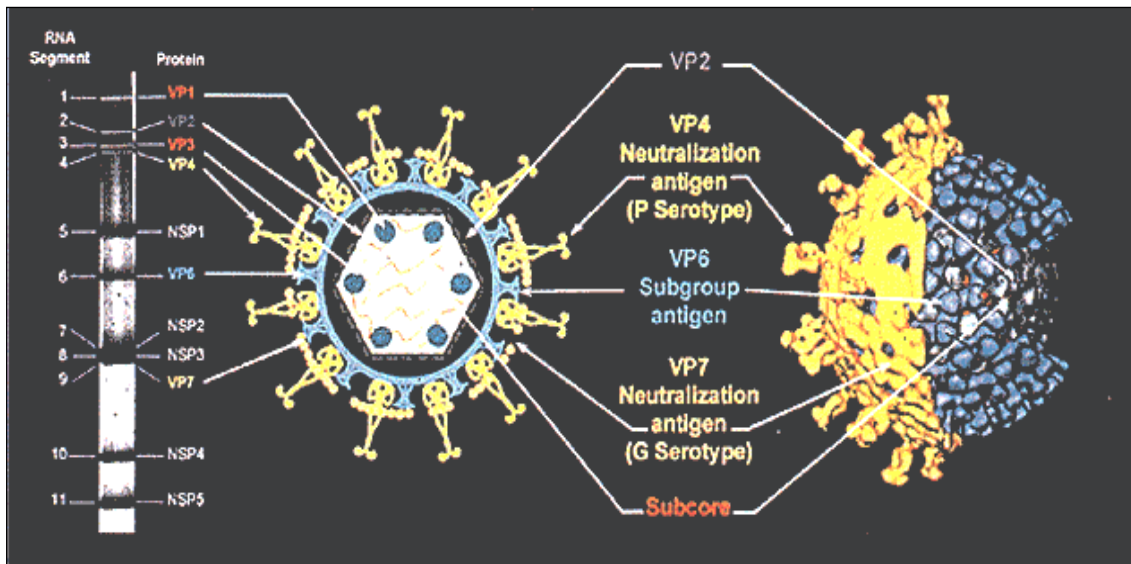
3. ábra: A humán astrovírusok elektronmikroszkópos képe.  
 Forrás: [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNAastro.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAastro.html)



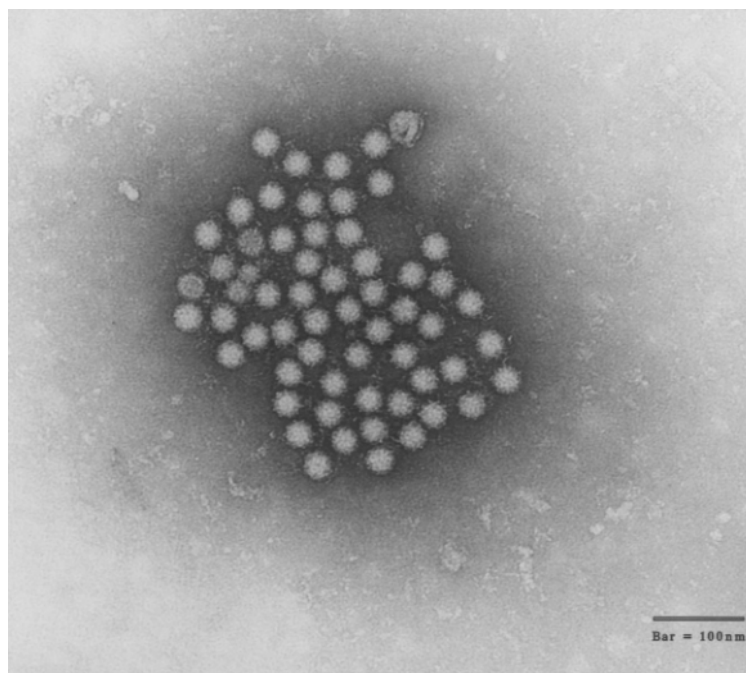
4. ábra: A humán astrovírus-genom szerkezete.



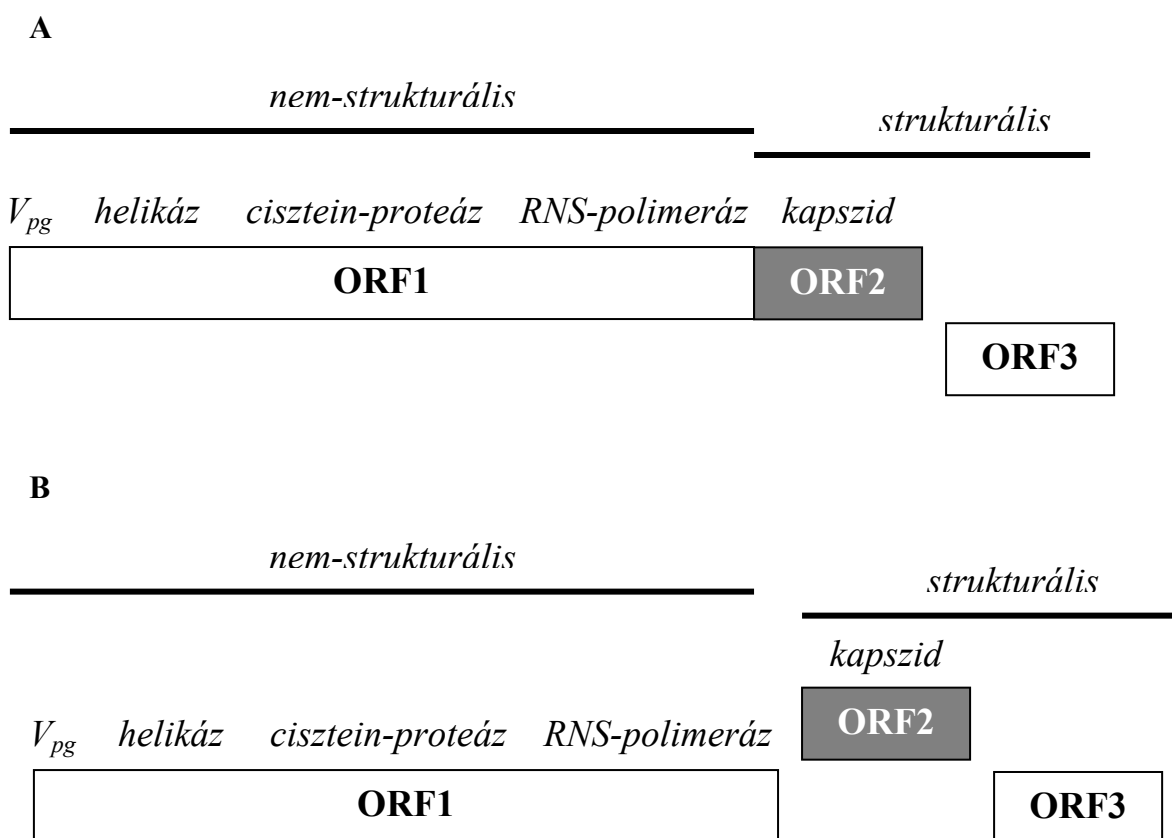
5. ábra: A rotavírusok kerékre emlékeztető szerkezete (Williams F.P., U.S.EPA).  
 Forrás: [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNAreo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAreo.html)



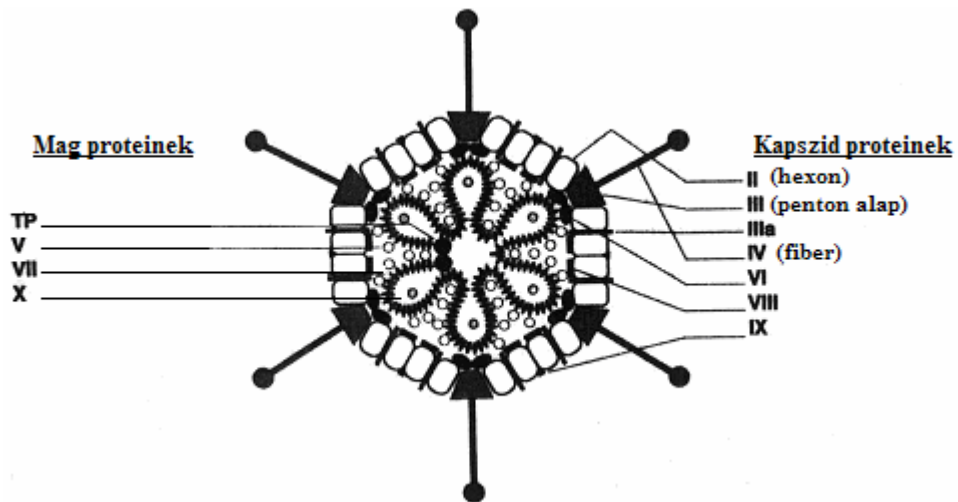
6. ábra. A rotavírus genom 11 szegmentje, az általuk kódolt fehérjék, a strukturális fehérjék elhelyezkedése a kapszidban, a kapszid 3D szerkezete. Forrás: [www.nlv.ch/Rotavirus/Rotafactsheet.htm](http://www.nlv.ch/Rotavirus/Rotafactsheet.htm)



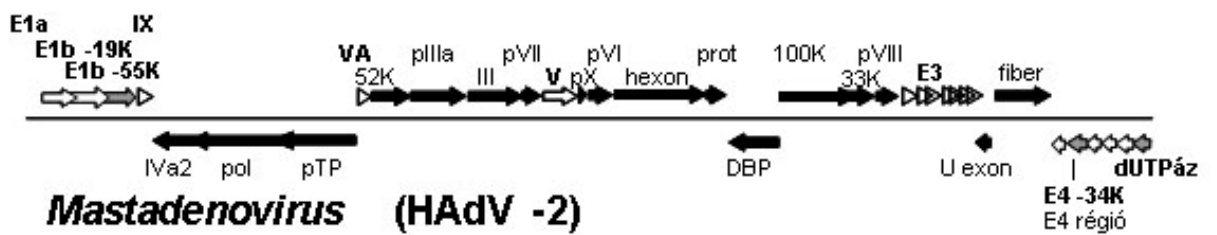
7. ábra. A humán calicivírusok elektronmikroszkópos képe. Forrás: [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNacalici.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNacalici.html)



8. ábra. A calicivírusok genom-szerkezete, „A”- Sapovírusok, „B”- Norovírusok.



9. ábra. Az adenovírus felépítése (Stewart és Burnett, 1995 alapján).



10. ábra Az adenovírus genom szerkezete (Berencsi, 2005).

### III. CÉLKITŰZÉSEK

Céлом volt:

- gyors, hatékony, megbízható koncentrálnási és direkt molekuláris kimutatási módszer adaptálása, amely a szennyvízből történő víruskimutatást lehetővé teszi,
- az alkalmazott módszer hatékonyságának igazolása a humán astrovírus, mint modell-vírus szennyvízből történő kimutatásával,
- az ÁNTSZ Baranya Megyei Intézetébe érkező szennyvízminták rutin vízbakteriológiai és vízkémiai vizsgálatainak sorába a molekuláris virológiai vizsgálatok bekapcsolása,
- a régió szennyvizeiben cirkuláló enterálisan ürülő, közegészségügyi szempontból jelentőséggel bíró vírusok (HAstV, HRV, HuCV, humán adenovírus /HADV/) kimutatása, és a talált törzsek genotípus meghatározása,
- szennyvíztisztítási hatékonyság megállapítása a vizsgált vírusok eliminálásának képessége szempontjából,
- annak tisztázása, hogy vajon a kórházban ápolt gyermekek körében megfigyelt gastroenteritiszes esetek jól mutatják-e az említett vírusok valódi szerepét a populációban, vagy csupán a fertőzések bizonyos hányadát észlelik az orvosok,
- a fekális koliformok és az általam kimutatott vírusok, mint fekális szennyező ágensek között fennálló korreláció lehetőségének tisztázása,
- információszolgáltatás az egészségügyi és a környezetanalitikával foglalkozó szakemberek számára a hazai szennyvizek virológiai szempontból is történő vizsgálatának fontosságáról.



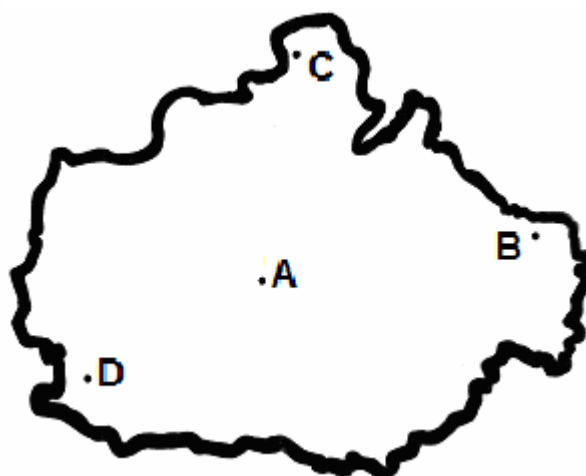
## IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### IV.1. Szennyvízminták

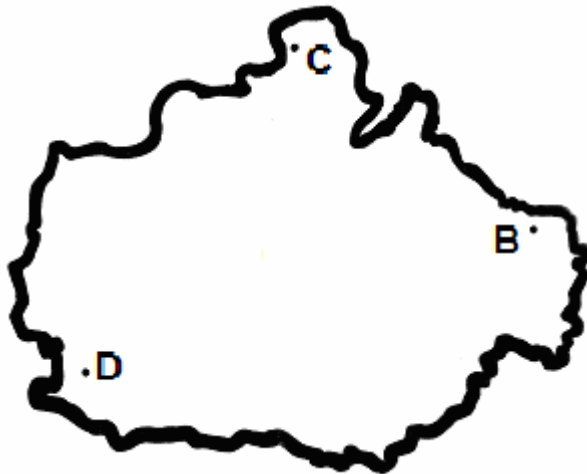
A mintagyűjtés helyszíne, valamint a minta típusa alapján vizsgálati időszakom három periódusra oszlott. Az első ciklusban az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Baranya Megyei Intézetének Regionális Vírusdiagnosztikai Laboratóriumába 2004. április és november között 35 nyers (tisztítatlan) szennyvízminta érkezett Baranya megye 22 szennyvíztelepéről („a”-„v”) (11. ábra). A második ciklusba a 2004. november és 2005. november között Baranya megye 4 szennyvíztisztító telepéről („A”, „B”, „C”, „D”) (12. ábra) beérkezett 36 nyers és tisztított szennyvízminta-pár tartozott. Vizsgálataim 3. periódusát képezte a 2005. november és 2006. augusztus között Baranya megye 3 szennyvíztisztító telepéről („B”, „C”, „D”) vett 12 nyers-tisztított mintapár (13. ábra).



11. ábra: Az 1. vizsgálati periódusban vett nyers minták mintavételi helyei Baranya megyében.



12. ábra: A 2. vizsgálati periódusban vett nyers-tisztított mintapárok mintavételi helyei Baranya megyében.



13. ábra: A 3. vizsgálati periódusban vett nyers-tisztított mintapárok mintavételi helyei Baranya megyében.

A steril üvegpalackban érkezett minták térfogata egyenként 1 liter volt. A palackokat a beérkezést követően 4°C-on tároltam, és a vízmintákat 48 órán belül feldolgoztam.

#### IV.2. Koncentrálás, virális nukleinsav kivonása

A koncentrálást és az extrahálást már ismert eljárások részbeni adaptálásával, módosításával végeztem.

A koncentrációs módszert alapját Nadan és mtsai. (2003) által korábban leírt eljárás képezte. A vízmintákat először centrifugálással üleptettem (3000 X g, 30 min), majd az így nyert üledéket 10 ml felülúszó folyadékban oldottam vissza. A kapott üledékhez kloroformot adtam (Sigma, St.Louis, MO, USA) 10% (v/v) végkoncentrációban, a keveréket vortexeltem, és további centrifugálással tisztítottam (3000 X g, 10 min, 4°C). Az első és a második tisztítási eljárásból származó felülúszókat összeöntöttem, majd a minták koncentráálásához a Minor és mtsai. (1985) által kidolgozott nátrium-klorid–polietilén-glikol (NaCl-PEG) kicsapási módszert alkalmaztam, néhány módosítással. Eszerint állandó mágneses keverés mellett 22,2 g NaCl-ot (Sigma, St.Louis, MO, USA) adtam 1000 ml szennyvízmintához 4°C-on, majd a NaCl teljes feloldódását követően 70 g PEG 6000-et (Fluka, Buchs, Németország) mértem a mintához, amit ezután egész éjszakán át mágneses keverőn kevertem. Másnap a mintákat centrifugáltam (2000 X g, 120 min, 4°C), majd a felülúszót kidobtam és az üledéket 10 ml 10 M guanidin-tiocianát (GuSCN) tartalmú lízis pufferben (Sigma, St.Louis, MO, USA) oldottam fel a kiinduló térfogat 1/100 arányában. A lízis puffer – amit a Boom és mtsai. (1990) által leírtak alapján készítettem el – 120 g GuSCN-ot tartalmazott 100 ml 0,1 M Tris-HCl pufferben (pH 6,4).

A *virális nukleinsav kivonására* a Boom és mtsai. (1990) által publikált módszert használtam néhány módosítással. Röviden, a lízis pufferben visszaoldott üledéket 56°C-on inkubáltam 25 percen át, majd a nukleinsav megkötése érdekében silica részecskéket (Sigma, St. Louis, MO, USA) adtam hozzá az általam korábban meghatározott 0,75% (v/v) optimális koncentrációban. A keveréket szobahőmérsékleten történő legfeljebb 30 perces inkubálást követően centrifugáltam (11000 X g, 5 min, 20°C), és a felülúszót leöntöttem. Ezután a silica pelletet kétszer mostam 2 ml 4 M-os GuSCN-tal, majd kétszer 70%-os etanollal (Spektrum-3D, Magyarország), végül egyszer acetonnal (Spektrum-3D, Magyarország). Az aceton eltávolítása után a csöveket nyitott fedővel 56°C-on szárítottam. A nukleinsav silica partikulumokról történő eluálását 300 µl dietilpirokarbonát (DEPC)-kezelt vízzel (Q-BioGene, Carlsbad, USA) végeztem 65°C-on 15 percig. Végezetül a silicát centrifugálással ülepttettem (18000 X g, 15 min, 20°C), és a nukleinsav-tartalmú felülúszót óvatosan leszívtam, elkerülve a silica mátrixszal való szennyezését. Ezután a nukleinsav mintákat a további vizsgálatokig -80°C-on tároltam.

### **IV.3. Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)**

A HAstV-okat, az A csoportú HRV-okat, HuCV-okat reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR), a B csoportú rotavírusokat RT-semi-nested PCR, a C csoportú rotavírusokat valós idejű (real-time) PCR, az adenovírusokat PCR segítségével mutattam ki.

*A humán astrovírusok, A csoportú humán rotavírusok, és humán calicivírusok kimutatása.* A HAstV-ok 1-3 és 5-8 típusainak kimutatásához a Mon2/PRBEG (Operon, Qiagen Company, USA), a 4-es típushoz a Mon2/JWT4 primer párokat alkalmaztam (Walter és mtsai, 2001), amelyek típustól függően 296-332 bp nagyságú terméket amplifikálnak a vírusgenom kapszid régióját kódoló (ORF2) 3' szakaszának végén (6. táblázat). A HuCV-ok kimutatása a JV13I/JV12Y primer párral történt (Reuter és mtsai., 2005), ami 326 bp terméket amplifikál a vírus polimeráz régiójából (6. táblázat). Az A csoportú rotavírusok kimutatása az End10BK/Beg10BK primer párral történt, mely 691 bp hosszúságú terméket amplifikál a genom NSP4 gén régiójából (6. táblázat). *A rotavírus* esetén a reverz transzkripciót egy denaturációs lépés előzte meg a duplaszálú RNS szétválasztására. A 15 µl denaturációs keverék 3,3 µM negatív szálú

primert (End10BK) és 10 µl RNS mintát tartalmazott. A denaturáció 97°C-on történt 5 percre, majd a denaturált állapot stabilizálása céljából a mintát hirtelen -80°C-ra fagyasztottam az RT keverék hozzáadásáig (3 min).

**Reverz-transzkripció (RT):** A 25 µl összemért reakciókeverék reagensinek koncentrációja: 10x PCR puffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 0,1%-os szarvasmarha szérumalbumin (BSA), 0,4 mM dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) keverék (Promega, Madison, WI, USA), 2 U AMV-RT (Promega, Madison, WI, USA), 4 U nukleáz inhibitor (RNase, Promega, Madison, WI, USA), 0,05 µM dithioeritol (DTT) (Promega, Madison, WI, USA), 2 µM negatív szálú primer (Mon2 /HAstV/; JV13I /HuCV/). A keverékből a reakcióban mintánként 15 µl-t (rotavírus esetében 10 µl-t) alkalmaztam. Az RNS-mintákból és a negatív kontrollként használt vízből (Promega, Madison, WI, USA) 10-10 µl-t használtam. A HAstV-oknál CaCo-2 sejtkultúrán (ATCC HTB 37) izolált 1-es, valamint 4-es szerotípusú HAstV RNS szolgált pozitív kontrollként, amit a fertőzött sejtek szuszpenziójának 150 µl-éből Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) módszerrel vontunk ki a gyártó által megadott felhasználási utasítás alapján. A rotavírusok és a calicivírusok kimutatásánál rotavírus-, illetve calicivírus-pozitív székletminták szolgáltak pozitív kontrollként.

A mintákat PCR készülékben (Eppendorf Mastercycler) 42°C-on 1 órán át inkubáltam.

**Polimeráz láncreakció (PCR):** Az összemért 50 µl elegy koncentrációja 10x PCR puffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 10% dimetil szulfoxid (Sigma, St. Louis, MO, USA), Taq-polimeráz (Dupl-A-Taq, Zenon, Magyarország), 1 µM pozitív szálú primer (PRBEG illetve JWT4 /HAstV/; Beg10BK /HRV-A/; JV12Y /HuCV/). A PCR reakcióhoz a cDNS teljes mennyiségét felhasználtam. A PCR termékek amplifikálásánál alkalmazott ciklusszámokat és értékeket az 5. táblázatban foglaltam össze.

A B csoportú rotavírusok kimutatása. A vírusok kimutatása RT-seminested PCR-rel történt, az A csoportú rotavírusoknál már leírt módon. A denaturációhoz B1 primert használtam, a PCR reakcióban a B4 primert alkalmaztam. A 2. PCR reakció elegy térfogata 50 µl volt, amelynek összetétele: 10x PCR puffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 5% dimetil szulfoxid (Sigma, St. Louis, Mo, USA), Taq-polimeráz (Dupl-A-Taq, Zenon), 1 µM mindkét primerből (B1 és B4), 0,4 mM dNTP (Promega, Madison, WI, USA) és 0,1 %-os szarvasmarha szérum albumin. A

reakcióban az 1. PCR reakciótermékből 5 µl-t használtam. Pozitív kontrollal nem rendelkezem. Az amplifikáció során alkalmazott programot az 5. táblázat mutatja be.

A humán adenovírusok kimutatása. A kimutatáshoz a hexAA1913/hexAA1885 primer párt alkalmaztam, ami 308 bp hosszúságú terméket amplifikál a vírusgenom hexon régiójából (6. táblázat).

A PCR reakcióhoz összemért 50 µl reakciókeverék reagenseinek koncentrációi: 10x PCR puffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 5 % dimetil szulfoxid (Sigma, St. Louis, Mo, USA), Taq-polimeráz (Dupl-A-Taq, Zenon), 1 µM mindkét primerből (hexAA1913 és hexAA1885), 0,4 mM dNTP (Promega, Madison, WI, USA) és 0,1 %-os BSA. Az így összeállított keverékhez a nukleinsavat tartalmazó mintából és a negatív kontrollként használt nukleázmentes vízből 10-10 µl-t adtam. Pozitív kontrollként Graham 293 szövettenyészetben izolált 41-es szerotípusú humán adenovírus szolgált. A PCR termék amplifikálását Eppendorf Mastercycler és Eppendorf Gradient típusú PCR készülékekben végeztem az 5. táblázatban feltüntetett programon.

	HAstV	HRV- A	HRV-B	HuCV	HAdV	RV-C
készülék: Eppendorf Mastercycler és Gradient (Németország, No. 5333 43565 és 5331 43769)						LightCycler 2.0
kezdeti denaturáció	94°C, 3 min	94°C, 3 min	94°C, 3 min	94°C, 3 min	94°C, 4 min	95°C, 10 min *
ciklusszám	40	40	40	40	35	40**
denaturáció	94°C, 1 min	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec	94°C, 1 min	94°C, 30 sec	95°C, 10 sec
annealing	50°C, 1 min	42°C, 45 sec	50°C, 30 sec	37°C, 90 sec	55°C, 30 sec	64°C, 10 sec
elongáció	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min	74°C, 1 min	72°C, 90 sec	72°C, 20 sec
végző extenzió	72°C, 15min	72°C, 7 min	72°C, 15 min	74°C, 10min	72°C, 10 min	

5. táblázat: Az egyes vírusok kimutatására alkalmazott PCR amplifikációs programok.

\* DNS polimeráz előaktiválásának céljából

\*\* további ciklusokat adtam a reakcióhoz azon esetekben, mikor az amplifikációs görbe nem érte el telítési pontját.

A C csoportú rotavírusok kimutatása real-time PCR módszerrel történt. A reverz transzkripció és az azt megelőző hődenaturáció 5 µM BMJ44 primerrel történt a rotavírusoknál már leírt módon. Az RT-t követő valós idejű PCR LightCycler 2.0 készülékben zajlott LightCycler FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország) használatával. A 20 µl végtérfogatú 1x-es koncentrációjú reakció keverék vizet, a gyártó által megadott utasítások alapján készített DNS polimerázt, a humán, sertés és szarvasmarha törzsek kimutatására egyaránt alkalmas 0,25 µM LC1 és LC3 primer párt valamint 2 µl cDNS terméket tartalmazott. A használt primerek szekvenciáját a 6. táblázatban tüntettem fel. Az

amplifikációs lépéseket az 5. táblázat tartalmazza. A fluoreszcenciát minden ciklus végén megmértem. A reakció végén a specificitás meghatározására olvadási görbe analízist végeztem, valamint a terméket agaróz gélben megfuttattam.

A 2005-ben beérkezett mintákat kvantitatív real-time PCR vizsgálatnak vetettem alá. A mennyiségi reakció optimalizálása inszertként a VP6 gént szinte teljes hosszában (11-1353 nt, Jiang és mtsai. nem publikált) tartalmazó TOPO vektorral (pBlueBac4.5; Invitrogen, Grand Island, New York) történt. A nyers, illetve a tisztított mintában lévő víruskópiaszám meghatározásához a gént tartalmazó plazmid-DNS 10-szeres hígítási sorozatából ( $10^8$ -tól  $10^0$ -ig) készített külső kalibrációs görbe szolgált alapul.

Vírus	Primer neve	Primer szekvenciája (5'-3')	Amplikon mérete (bp)	Amplifikált régió
HAstV	Mon2 (-)	GCT TCT GAT TAA ATC AAT TTT	296-324*	kapszid régió 3' vég
	PRBEG (+)	ACC GTG TAA CCC TCC TCT C		
	JWT4 (+)	GCA GAG AGC TTG TTA TTA AC	332	
HAdV	hexAA1913 (-)	CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT	308	hexon
	hexAA1885 (+)	GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C		
HRV-A	End10BK (-)	AAA AGT TCT GTT CCG AGA GA	691	NSP4 gén
	Beg10BK (+)	CCR TTC CTT CCA TTA ACG TC		
RV-B	B1 (+)	CTA TTC AGT GTG TCG TGA GAG G	1.PCR: 489 2.PCR: 434	NSP2 gén
	B3 (-)	CGA AGC GGG CTA GCT TGT CTG C		
	B4 (-)	CGT GGC TTT GGA AAA TTC TTG		
RV-C	BMJ44 (-)	AGC CAC ATA GTT CAC ATT TC	98	VP6 gén 3' vég
	LC1 (-)	AGC CAC ATA GTT CAC ATT TCA TCC TYC TG		
	LC3 (+)	TAG CAT GAA TCA CGA CTG GGT TTA GTC		
HuCV	JV13I (-)	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	326	polimeráz régió
	JV12Y (+)	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA		

6. táblázat: A használt primerek összefoglaló táblázata.

\* típustól függően

**Az RT-PCR, PCR termékek vizsgálata:** A termékek vizsgálata 3%-os agaróz gélben (NuSieve<sup>®</sup>, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA), Tris-Borát-EDTA (pH 8,0) pufferben, etidium-bromid (0,5 µg/ml; Sigma, St.Louis, MO, USA) festéssel történt. A PCR-termékek futtatását 110 V konstans feszültségen, kb. 60 percig végeztem (amíg a bróm-fenol-kék jelzőfesték el nem érte a gél alját). Végül a gélt UV fényel (320 nm) világítottam át (Spectroline Co., Model TVR-312A, USA), és a fotodokumentációt Canon kamerával (PowerShot G6, Japán) készítettem.

Az adott vírusra pozitívnak tekintettem minden olyan mintát, amely a PCR vizsgálatok során a 6. táblázatban feltüntetett primer párral megfelelő méretű amplikont adott.

#### **IV.4. Szekvenca vizsgálat és filogenetikai analízis**

Az RT-PCR specificitását a reakcióból származó amplikonok nukleotid szekvenca meghatározásával és filogenetikai analízisével ellenőriztem.

A Mon2/PRBEG ill. Mon2/JWT4, End10BK/Beg10BK, B1/B3, LC1/LC3, JV13I/JV12Y primer párokkal nyert amplikonokat a humán astrovírus, az A illetve C csoportú rotavírus, a humán calicivírus genotípus diverzitásának meghatározása céljából szekvenáltam. A szekvenca meghatározás kezdetben a PTE ÁOK Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézetben történt, majd – azonos feltételekkel – saját laboratóriumunkban. A szekvenálási reakcióhoz a mintákat 1,5%-os agaróz gélben (Cambrex Bio Science Rockland, ME, USA) futtattam, majd a terméket kivágtam és Wizard<sup>®</sup> SV gél és PCR tisztító kittel (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System, Promega, Madison, WI, USA) tisztítottam a gyártó által megadott utasítások szerint. A tisztított PCR termékeket direkt szekvenálásnak vetettem alá. A szekvenálást mindkét irányból elvégeztem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) segítségével. A dye-jelölt termékeket ABI 310 DNS szekvenálóval (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analizáltam.

A filogenetikai analízishez GenBank-ban közölt szekvenciákat használtam referenciaként. A nyers szekvenciákat a GeneDoc programmal szerkesztettem (Nicholas és mtsai., 1997). A filogenetikai fákat az illesztett szekvenciák alapján a MEGA v 2.1 programmal (Kumar és mtsai., 2001) készítettem Neighbor-Joining algoritmus Kimura 2 szubsztitúciós modellel, 1000 összehasonlítást végezve.

#### **IV.5. Belső kontroll**

Az inhibitorok jelenlétének/hiányának igazolására belső nukleinsav kontrollt mértem a minták egy részéhez. Inszertként 110 bp hosszúságú G9 tipizáló primer párral amplifikált A csoportú rotavírus szekvenciát használtam, melyet a 5'GCT TCT GAT TAA ATC AAT TTT TAT AAA GTC CAT CGC AC 3' és 5'-ACC GTG TAA CCC TCC TCT CTA GCT CCT TTT AAT GTA TGG-3' primer párral sokszorosítottam fel. A primer jellegzetessége, hogy rotavírus- és astrovírus-specifikus szekvenciákat is tartalmaz, hogy az inszert a Mon2/PRBEG primer párral amplifikálható legyen (14. ábra). A ligálás pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) plazmidba történt, a gyártó által forgalmazott reagensekkel a megadott utasításoknak megfelelően. Röviden, a 10





Az általam használt eljárás folyamatábrája:

**1. nap:** 1 liter nyers szennyvízminta



centrifugálás (3000 X g, 30 min, 4°C)



üledék centrifugálása (10 ml felülúszó folyadékban, 10 % (v/v) kloroformmal)



koncentrálás NaCl-dal és PEG 6000-rel (22,2 g NaCl, 70 g PEG 6000),  
keverés éjszakán át



**2. nap:** centrifugálás (2000 X g, 120 min, 4°C)



üledék + 10 ml lízis puffer



vízfürdő (25 min, 56°C)



75 µl silica



mosás: 4 M GuSCN (2 x 2 ml), 70% etanol (2 x 2 ml), aceton (2 ml)



szárítás (kb. 15 min, 56°C)



eluálás (300 µl DEPC kezelt víz, 65°C)



RT-PCR

(Mon2/PRBEG; Mon2/JWT4,  
End10BK/Beg10BK)

seminested PCR

(B1/B4;B1/B3)

PCR

(hexAA1913/hexAA1885)

real-time PCR

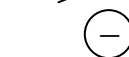
(BMJ44 és LC1/LC3)



szekvencia analízis



filogenetikai analízis



PTE ÁOK, Orvosi Mikrobiológia és Immunológiai Intézet

ÁNTSZ Baranya Megyei Intézete, Regionális Virologiai Laboratórium

## V. AZ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA A CÉLKITŰZÉSEK TÜKRÉBEN

Laboratóriumunkba 2004. április és november között (I. periódus) 22 Baranya megyei szennyvíztelepről 35 nyers szennyvízminta, 2004. november és 2005. november között (II. periódus) 4 szennyvíztelepről 36 nyers és tisztított szennyvízminta-pár (72 minta), 2005. november és 2006. augusztus között (III. periódus) 3 szennyvíztelepről 12 nyers-tisztított mintapár (24 db minta) érkezett, mintánként három 1 literes steril palackban.

Egy-egy liternyi mintát az Intézet vízkémiai és vízbakteriológiai laboratóriumaiban dolgoztak fel a jogszabályi előírásoknak megfelelően. A 3. palack szennyvízből a HAstV, a HRV (-A, -B, -C), a HuCV és a HAdV jelenlétének kimutatására RT-PCR/RT-semimeseted PCR, PCR, illetve real-time PCR reakciót végeztem.

A továbbiakban az I. mintagyűjtési időszak eredményeit külön kívánom bemutatni a II. és III. periódusok eredményeitől, mert ebben az időszakban még csak nyers szennyvizeket vizsgáltam.

### V.1. *Vizsgálati periódus I.*

Vizsgálatom első periódusa (2004. április-november, 35 nyers szennyvízminta) elsősorban a HAstV-ok kimutatására és az alkalmazott módszer hatékonyságának igazolására irányult. A mellékelt angol, illetve magyar nyelvű közleményben az I. periódus eredményei részletesen olvashatók, ezért azok itt csak vázlatosan szerepelnek.

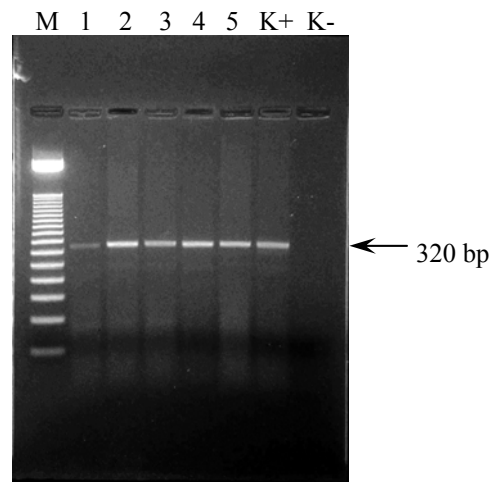
- Ezen időszak alatt a vizsgált minták 43%-ában (15 minta) tudtam HAstV-t kimutatni (15. ábra, 7. táblázat).

- Nem találtam gyakorisági összefüggést a kimutathatóság és az ellátott település nagysága között (pl. „c” telep /11285 fő/-HAstV negatív, „l” telep /712 fő/-HAstV pozitív) (7. táblázat).

- A PCR-t követő szekvencia vizsgálat során 11 mintánál sikerült megerősíteni a HAstV jelenlétét. Tíz vízminta tartalmazott HAstV-1 típust, míg egy esetben HAstV-2 típust azonosítottam; 4 mintát nem tudtam tipizálni.

- A filogenetikai analízis alapján a környezeti mintákban talált HAstV-1 törzsek a klinikai mintákból izolált megfelelő magyar HAstV törzsekkel együtt rendeződtek csoportba, de azoktól egyértelműen elkülönültek. Az egyetlen talált HAstV-2 vírus genetikailag Mexikóból és Dél-Afrikából származó törzsekhez állt a legközelebb.

- A mintákból végzett rutin kémiai tesztek eredményeként kapott kémiai paraméterek és ionok az egyes mintáknál nem mutattak különbségeket (pl. „b” 2004.04.27. és „d” 2004.06.08. minták esetében: pH=8,0 illetve 7,9; KOI=950 mg/l illetve 990 mg/l; kálium=42 mg/l, illetve 43 mg/l).
- Vizsgálataim azt is alátámasztották, hogy a vírusok és jelenleg a fekális eredetű szennyezés indikátoraiként elfogadott fekális koliformok száma között az összefüggés hiányzik (7. táblázat).



15. ábra. *Mon2/PRBEG* és *Mon2/JWT4* primer párokkal kapott RT-PCR termékek. Az amplifikált DNS termékek ~320 bp hosszúak (319 bp a *HAsV-1* és 321 bp a *HAsV-2* esetében). Jelölések: M: marker (50 bp); 1-5: 5 különböző, *HAsV* pozitív szennyvízminta; K+: pozitív kontroll, K-: negatív kontroll.

Telep *	Populáció nagysága	Mintavétel időpontja	Humán astrovírus	Szerotípus	Koliform szám
a	3809	2004.04.20.	+	HAstV-1	nv
		2004.10.05.	-		nv
b	3092	2004.04.27.	+	HAstV-1	nv
		2004.06.22.	+	HAstV-1	nv
		2004.10.12.	+	nt	nv
		2004.11.23.	-		nv
c	11285	2004.04.28.	-		1,3
d	2633	2004.05.10.	-		0,3
		2004.06.08.	+	HAstV-1	nv
		2004.10.05.	-		0,5
		2004.11.16.	-		0,25
e	4798	2004.05.11.	+	HAstV-1	7,5
		2004.11.09.	+	HAstV-1	1150
f	?	2004.05.25.	-		0
		2004.09.28.	-		0,2
g	770	2004.05.25.	+	HAstV-2	0
		2004.09.28.	-		0,45
h	?	2004.05.26.	-		nv
i	2808	2004.06.08.	+	HAstV-1	2003
j		2004.06.08.	-		255
k	3104	2004.06.15.	+	nt	nv
		2004.10.19.	-		nv
		2004.11.30.	-		nv
l	712	2004.06.15.	+	HAstV-1	0
m	?	2004.06.23.	-		0
		2004.10.20.	-		0
n	1331	2004.07.15.	-		0
o	10182	2004.09.21.	+	HAstV-1	0,3
p	4066	2004.09.22.	-		75,35
q	568	2004.09.29.	-		21250000
r	2761	2004.10.05.	-		1,9
s	1605	2004.10.06.	+	nt	0
t	157659	2004.10.20.	+	nt	0,25
u	?	2004.10.20.	-		0
v	3859	2004.11.22.	+	HAstV-1	0

7. táblázat. Az I. vizsgálati periódusban, a 22 szennyvíztelepről beérkezett nyers szennyvízmintákban talált fekális koliform számok és a humán astrovírusok előfordulása.

\* A betűk „a”-tól „v”-ig az egyes szennyvíztelepeket jelölik.

? = nem ismert

nv = nem vizsgált

+ = HAstV kimutatható volt

- = HAstV nem volt kimutatható

nt = nem tipizálható

Ezen eredményeket bemutató poszterek, előadások és folyóiratban megjelent kivonataik, valamint közlemények:

- **Meleg, E., Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.:** Humán astrovírusok első kimutatása szennyvízmintákból Magyarországon. (Előadás, *Semmelweis Egyetem Doktori Iskola PhD Tudományos Napok 2005, április; Budapest*)

- **Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: First detection of human astroviruses in raw sewage samples in Baranya County, Hungary. (*Poszter, 1st Central European Forum for Microbiology, 2005, október; Keszthely*)
- **Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Humán astrovírusok első kimutatása nyers szennyvízből Magyarországon. (*Előadás, Népegészségügyi Tudományos Társaság XV. Nagygyűlése 2006; Siófok*)
- **Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: First Detection of Human Astroviruses in Raw Sewage Samples in Baranya County, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2005, **52(Suppl)**, 95. (*absztrakt*)
- **Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy. (2005) Humán astrovírusok első kimutatása nyers szennyvízből Magyarországon. *Egészségtudomány* **49**, 318-327. (*publikáció*) **IF: —**
- **Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy. (2006) Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 1123-1129. (*publikáció*) **IF: 2,127**
- **Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: First Detection of Human Astroviruses in Raw Sewage Samples in Baranya County, Hungary. *Clinical Microbiology and Infection* 2006, **12 (Suppl 4)**, **R2209**, 112. (*absztrakt*)

## **V.2. Vizsgálati periódus II. és III.**

A II. és III. időszak alatt érkezett mintákból nyert eredményeket célszerűnek láttam együtt bemutatni, hiszen a minták típusa és a mintavételi helyek megegyeztek. Vizsgálatom második (2004. november-2005. november) és harmadik (2005. november-2006. augusztus) periódusában összesen 48 nyers és tisztított szennyvízminta-párt vizsgáltam meg. A minták 4 Baranya megyei szennyvíztelepről („A”, „B”, „C”, „D”) származtak, amelyek területi eloszlásukban a megye egészét lefedték.

A pont-mintavételezés három telep esetén („B”, „C”, „D”) átlagosan kéthavi, míg a 4. helyen („A”) havi egy-két alkalommal történt. A beérkezett mintákat 6 vírus jelenlétére vizsgáltam meg.

### **V.2.1. A szennyvíztelepek részletes virológiai jellemzése**

A következőkben az eredményeket telepenkénti lebontásban ismertetem (8/1., 8/2. táblázat):

Az „A”, „B” és „C” jelű telepről a vizsgált időszak alatt 11-11 (2005-ben 7 pár, 2006-ban 4 pár), a „D” telepről (2005. február-2006. február között) 19 nyers és tisztított vízminta-pár érkezett.

### A telep

Mintavétel időpontja	Minta típusa	Vírus							Op (°C)
		HAstV	Típus	HRV-A	RV-B	AdV	HuCV	RV-C	
2005.2.9	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4, 8	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	82,00
		pozitív	8	negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	82,02
2005.3.10	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	8	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív <sup>hu</sup>	82,06
		pozitív	*	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	82,09
2005.3.25	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4, 8	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	82,02
		pozitív	8	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,97
2005.4.6	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	2	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,98
		pozitív	1	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,87
2005.4.22	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	1	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	82,00
		negatív		pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,85
2005.5.6	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	8	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,99
		pozitív	4*, 8	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,90
2005.5.23	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	2/8	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,93
		pozitív	8	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,93
2005.6.7	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4, ?*	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,43
		pozitív	4*	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,97
2005.7.13	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4, 8	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,28
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.7.28	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4*	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,95
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.9.7	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,45
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.9.26	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	?*	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,34
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
2005.10.12	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,35
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
2005.11.4	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,27
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>?</sup>	?
2005.11.17	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,20
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
2005.12.2	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,21
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.12.16	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,98
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2006.1.12	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	1, 4	negatív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív <sup>?</sup>	
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2006.1.26	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	8 (K)	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív <sup>se</sup>	84,68
		pozitív	1/8	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	

### B telep

Mintavétel időpontja	Minta típusa	Vírus							Op (°C)
		HAstV	Típus	HRV-A	RV-B	AdV	HuCV	RV-C	
2004.11.30	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív <sup>sm</sup>	83,72
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,73
2005.2.8	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,84
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
2005.4.5	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	2	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	82,14
		pozitív	2	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,63
2005.5.17	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	2	pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,48
		pozitív	2	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,54
2005.8.2	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		pozitív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,64
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,39
2005.9.20	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
2005.11.15	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>sm</sup>	83,44
		negatív		negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>hu</sup>	81,87
2006.2.7	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4	negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,51
		pozitív	4*	negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív <sup>?</sup>	82,95
2006.4.4	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	3, 4	negatív	negatív	pozitív	negatív	pozitív <sup>se</sup>	84,08
		pozitív	4*	negatív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
2006.5.16	NYERS TISZTÍTOTT	pozitív	4	pozitív	negatív	pozitív	negatív	negatív	
		pozitív	4	pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív <sup>sm</sup>	83,56
2006.8.1	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		pozitív	negatív	pozitív	pozitív	pozitív <sup>sm</sup>	83,84
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	pozitív <sup>?</sup>	82,93

8/1. táblázat. Az „A” és a „B” telepre beérkezett szennyvízminták összesített táblázata. A „Típus” oszlopban a különböző HAstV szerotípusokat tüntettem fel. ?= a szerotípust nem sikerült meghatározni; \* = nem szekvenálható; (K)= kevert szekvencia. Az egy mintában előforduló típusokat vesszővel választottam el egymástól; „RV-C” oszlopban: <sup>hu</sup>= humán törzsek; <sup>sm</sup>= szarvasmarha törzsek; <sup>se</sup>= sertés törzsek; ?= az olvadáspont alapján a gazdaeredet nem egyértelműen meghatározható, „Op” oszlopban RV-C vizsgálatkor az olvadási görbe analízis során kapott olvadáspontok szerepelnek.

8/2. táblázat. A „C” és a „D” telepre beérkezett szennyvízminták összesített táblázata. A „Típus” oszlopban a különböző HAsV szerotípusokat tüntettem fel. ?= a szerotípust nem sikerült meghatározni; \* = nem szekvenálható. Az egy mintában előforduló típusokat vesszővel választottam el egymástól; „RV-C” oszlopban: <sup>hu</sup>= humán törzsek; <sup>sm</sup>= szarvasmarha törzsek; <sup>se</sup>= sertés törzsek; <sup>?</sup>= az olvadáspont alapján a gazdaeredet nem egyértelműen meghatározható, „Op” oszlopban RV-C vizsgálatok az olvadási görbe analízis során kapott olvadáspontok szerepelnek.

### C telep

Mintavétel időpontja	Minta típusa	Vírus							Op (°C)
		HAsV	Típus	HRV-A	RV-B	AdV	HuCV	RV-C	
2004.11.16	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,54
		negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,62
2005.2.22	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	4, ?*	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,39
		<b>pozitív</b>	4, ?*	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,59
2005.4.19	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	?*	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>hu</sup>	82,02
		<b>pozitív</b>	?*	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>hu</sup>	81,96
2005.6.7	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	5	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>?</sup>	82,36
		<b>pozitív</b>	5	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>hu</sup>	81,94
2005.8.9	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>hu</sup>	82,04
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.9.27	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.11.29	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
		negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,26
2006.2.21	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,32
		negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,58
2006.4.18	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	3	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	
		negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,51
2006.6.6	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,24
		<b>pozitív</b>	4*	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,19
2006.8.8	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>?</sup>	?
		negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	negatív	

### D telep

Mintavétel időpontja	Minta típusa	Vírus							Op (°C)
		HAsV	Típus	HRV-A	RV-B	AdV	HuCV	RV-C	
2004.11.23	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,37
		negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,37
2005.2.1	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>hu</sup>	81,89
		negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>hu</sup>	81,91
2005.4.26	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,35
		<b>pozitív</b>	4*, ?*	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	
2005.6.21	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	4, 8	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,24
		<b>pozitív</b>	?*	negatív	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,53
2005.8.16	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	?*	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,25
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	
2005.10.11	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	?*	negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>se</sup>	84,21
		negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	
2005.11.22	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,29
		negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,30
2006.1.31	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	1	negatív	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,23
		negatív		<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív	negatív	
2006.4.25	NYERS TISZTÍTOTT	<b>pozitív</b>	4	<b>pozitív</b>	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,50
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,55
2006.6.20	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,47
		negatív		negatív	negatív	negatív	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,54
2006.8.15	NYERS TISZTÍTOTT	negatív		<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,60
		negatív		negatív	negatív	<b>pozitív</b>	negatív	<b>pozitív</b> <sup>sm</sup>	83,68



**V.2.1.1 Egyes szennyvíztelepek vírustartalmának összevetése:** Legmagasabb **HAstV** szennyezettségűnek az „A” telep (55,3%) bizonyult. Ezt követte a „B”, majd a „C” telep, míg a legalacsonyabb szennyezettségű a „D” telep (31,8%) volt.

Az **A csoportú rotavírus** terheltség a „C” telepen (36,4%) volt a legmagasabb, és a „B”, illetve a „D” telepen (27,3%) a legalacsonyabb.

**B csoportú rotavírust** vizsgálataim során egyetlen mintában sem találtam.

A **C csoportú rotavírus** szennyezettség a „D” telepen (81,8%) bizonyult a legmagasabbnak. Ezt követte az „A” és közel azonos szennyezettséggel a „B” telep. A „C” telepen (72,7%) volt a legalacsonyabb a C csoportú rotavírusok előfordulása.

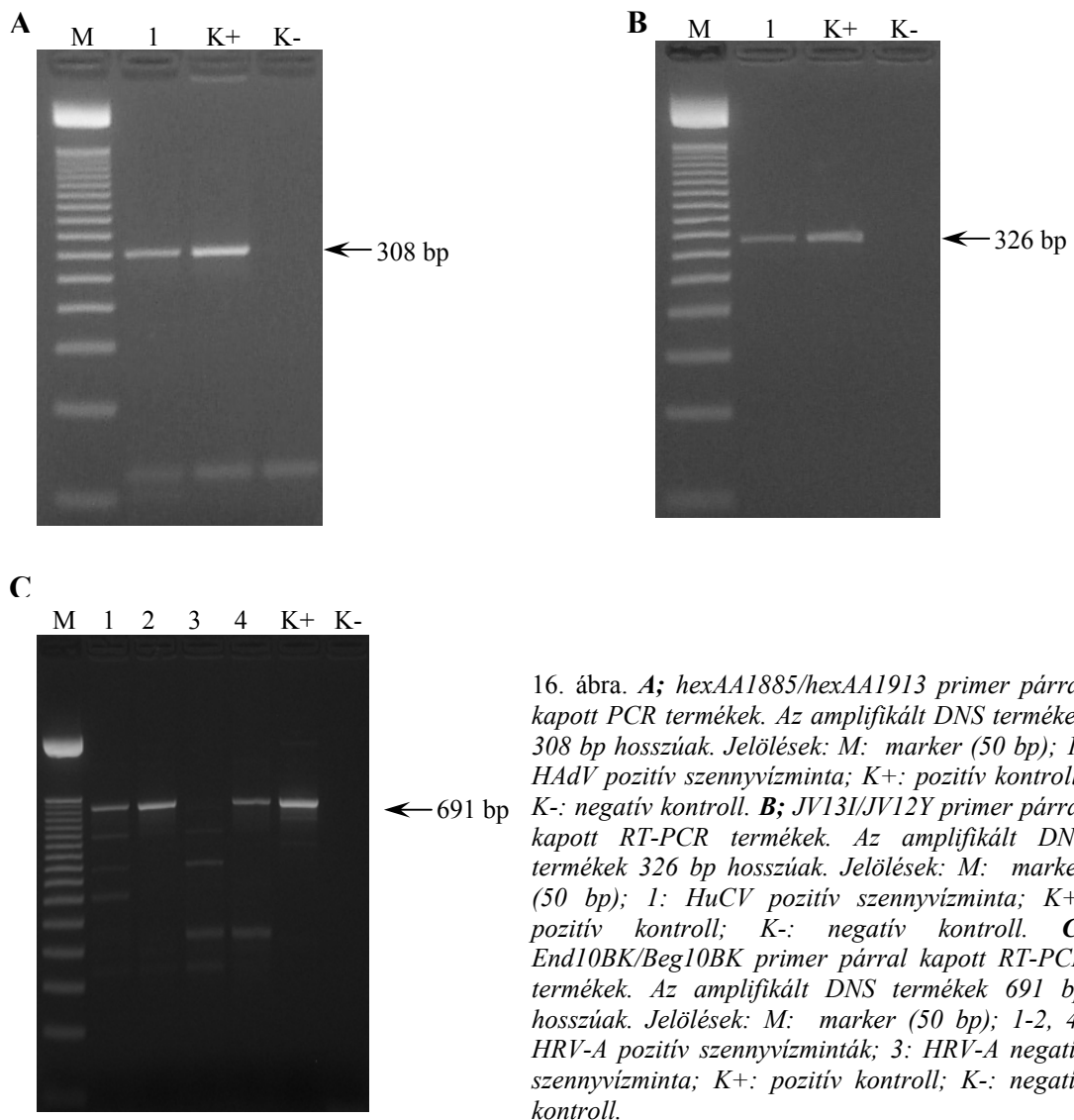
Humán **calicivírusra** a legtöbb pozitív mintát (27,3%) a „C” szennyvíztelep vizeiből sikerült kimutatni. Jóval kevésbé voltak szennyezettek a „D” telepről gyűjtött minták, ezt követte csökkenő **HuCV** szennyezettséggel a „B” telep. A legkevesebb **HuCV** pozitív mintát (7,9%) az „A” telep vizeiben találtam.

A „B” telepről érkezett a legtöbb **adenovírus** pozitív minta (81,8%), míg a „C” és a „D” telep adenovírus szennyezettsége volt a legalacsonyabb, de még így is a minták nagy részében sikerült kimutatni a vírus jelenlétét (68,2%).

A százalékos víruselőfordulási adatokat a 9. összesítő táblázatban, az amplifikált termékekről készült gélfotókat pedig a 16. ábrán tüntettem fel.

Telep	Vírusterheltség (összes pozitívítás) (%)				
	<i>HAstV</i>	<i>RV-A</i>	<i>RV-C</i>	<i>HuCV</i>	<i>HAdV</i>
<i>A</i>	55,26	34,21	73,68	7,89	78,95
<i>B</i>	45,45	27,27	77,27	13,64	81,82
<i>C</i>	36,36	36,36	72,73	27,27	68,18
<i>D</i>	31,82	27,27	81,82	18,18	68,18

9. táblázat. A vizsgált vírusok százalékos megoszlása.



**V.2.1.2. A szennyvíztelepek össz-vírusterheltségének** vizsgálatából kiderül, hogy az „A” telep szennyvizében lehetett egy mintán belül a legtöbb vírus együttes előfordulását kimutatni. Legkisebb mértékben voltak terheltek több vírus együttes előfordulásával a „B” és a „C” szennyvíztelep mintái. Az egyes telepekre eső átlag vírus species-szám kiszámításánál figyelembe vettem azon eseteket, amikor a vizsgálatok során egy adott mintában egynél több astrovírus típust sikerült kimutatni. Az átlagos érték meghatározásánál minden típus külön vírusként szerepelt (10. táblázat).

Telep	A	B	C	D
Átlag vírusszám	3,58	3,36	3,09	3,09

10. táblázat. Az egyes telepeken előforduló átlagos vírus species- szám mintánként.

**V.2.1.3. Kimutatásra ható inhibitorok (ellentmondásos mintapárok):** Az „A” telep kivételével minden telepnél észleltem olyan eseteket, amelyekben csak a mintapárok tisztított fele tartalmazott vírust, de a nyers mintából nem sikerült azt kimutatni. A legtöbb ellentmondásos minta (4-4 db) a „C” és a „D” telepről érkezett, a „B” szennyvíztelepről csupán egy mintapárnál fordult elő (2 vírus vizsgálata esetén is) a nyers minta negativitása a tisztított minta pozitivitása mellett. A pozitívítás szempontjából ellentmondásos mintapárokat a 11. táblázatban tüntettem fel.

Telep	Minta	Nyers mintából nem, csak a tisztítottból sikerült kimutatni	Nyers mintából sikerült kimutatni
B	2006.05.16	HuCV RV-C	HAsV RV-A AdV
C	2005.11.29	RV-A RV-C AdV	egyiket sem
	2006.04.18	RV-A RV-C	HAsV AdV
	2006.06.06	HAsV RV-A	RV-C AdV
	2006.08.08	RV-A	RV-C HuCV AdV
D	2004.11.23	HuCV	RV-C AdV
	2005.04.26	HAsV RV-A	RV-C AdV
	2005.11.22	RV-A	RV-C AdV
	2006.01.31	RV-A	HAsV RV-C

11. táblázat: Víruspozitivitás szempontjából ellentmondásos mintapárok. A táblázat 3. oszlopában szerepelnek azon vírusok, amelyeket csupán az adott mintapár tisztított feléből tudtam kimutatni. A táblázat 4. oszlopában szereplő adatok bizonyíthatják a mintákban esetlegesen előforduló PCR-t gátló inhibitorok jelenlétét (lásd később).

**V.2.1.4. Tisztítási hatékonyság:** A vizsgálat elején célul tűztem ki a nyers és tisztított minták vírus-pozitivitásának összehasonlításával a szennyvíztisztító telepek tisztítási hatékonyságának megállapítását a vírusok eliminálásának képessége szempontjából. Az eredmények azonban nem teszik lehetővé a tisztítási hatékonyság egyértelmű meghatározását, hiszen 15 esetben a tisztított minta pozitívnak bizonyult, de a nyers minta nem. A tisztítási hatékonyság 3-féle módon is számolható. Mindhárom számítás a nyers és tisztított minták pozitívításának arányán alapul.

1. számítási módszer: figyelmen kívül hagytam a mintapárok

ellentmondásosságát (vagyis, ahol csupán a pár tisztított mintafele volt víruspozitív), tehát a PCR során ténylegesen pozitívnak talált nyers és tisztított minták számával számoltam (pl. „D” telep esetén 23,3%);

2. számítási módszer: a számításból kihagytam az ellentmondásos mintapárokat (tehát, azon mintapároknál, ahol csak az elfolyó mintafél volt víruspozitív, az egész mintapárt kihagytam a számolásból) (pl. „D” telep esetében 65,8%);

3. számítási módszer: az ellentmondásos pároknál a nyers mintafelet is pozitívnak vettem, azt feltételezve, hogy ha a tisztított minta tartalmazta az adott vírust, akkor a nyers párnak is pozitívnak kellett lennie, de ebből valamiért nem sikerült a vírust kimutatni (pl. „D” telep esetén 45,8%) (12. táblázat).

Telep	Tisztítási hatékonyság az egyes vírusokra vonatkozóan (%)				Számítási mód	Átlagos tisztítási hatékonyság (%)
	<i>HAstV</i>	<i>RV-A</i>	<i>AdV</i>	<i>HuCV</i>		
A	38,46	55,55	42,11	100	1., 2., 3.	59,03
B	0	80	20	50	1.	37,5
				100	2.	50
				66,66	3.	41,67
C	0	0	12,5	0	1.	3,13
	25		25		2.	12,5
	20		22,22		3.	10,56
D	60	0	33,33	0	1.	23,33
	80	100		50	2.	65,83
	66,66	50		33,33	3.	45,83

12. táblázat. A szennyvíztelepek szennyvíztisztítási hatékonysága. A számítási módok magyarázatát a szövegben tüntettem fel.

A három számítási eljárás tehát egymásnak ellentmondó hatékonysági értékeket eredményezett.

Ennél informatívabb adatokat a C csoportú rotavírusok mennyiségi vizsgálatával kaptam. Sajnos ennek a vizsgálatnak az elvégzésére PhD állami ösztöndíjként csak a kutatási időszak utolsó három hónapjában nyílt lehetőségem, de úgy gondolom, hogy a kapott eredményeket így is érdemes áttekinteni, mert azok érvényesek lehetnek a többi enterális vírusra is. A 17. táblázatban a tisztítási hatékonyságot a relatív vírustisztulással adtam meg. Ennek alapján az „A” telepen alkalmazott szennyvízkezelési eljárás bizonyult a leghatásosabbnak a C csoportú rotavírusok eliminálására. A 17 mintapárból 8 esetben az elfolyó mintában lévő RV-C kópiaszám a szennyvízkezelési folyamat során a kimutathatósági határ alá csökkent, a fennmaradó 9 mintapárnál is átlagosan közel 97%-os vírusszám csökkenés volt tapasztalható. A „D”

telepen alkalmazott tisztítási folyamat is jelentős (átlagosan közel 90%-os) redukción eredményezett. (3 mintánál a kimutathatósági határ alá esett a tisztított mintában lévő kópiaszám, így a tisztulást abból a fennmaradó 3 párból számoltam, ahol a befolyó és kifolyó minta is RV-C pozitív volt). A „B” és a „C” telep tisztítási stratégiája bizonyult a legkevésbé hatásosnak a vírus eltávolítására (~60%), ráadásul a „B” telepen egy, a „C” telepen három esetben a tisztított mintában lévő víruskópiaszám meghaladta a nyers mintában lévőét. Ezzel szemben az általánosan elfogadott – baktériumszám csökkenésen alapuló – tisztítási hatékonyság mind a négy tisztítási technológia esetén azonos volt (99,5%).

A telepek tisztítási technológiáit is tanulmányoztam, és megállapítottam, hogy azok eltérnek egymástól. A vizsgált 4 szennyvíztisztító telep főbb jellemzőit a 13. táblázatban foglaltam össze. A telepek 33-50%-os terheltséggel működnek.

- „A” telep: durva rács, finom rács, homokfogó, előülepítő, anaerob medence, anoxikus medence, aerob medence, utóülepítő,
- „B” telep: úgynevezett „hengeres” rács (átmenet a durva és a finom rács között), anaerob medence, anoxikus medence, aerob medence, utóülepítő,
- „C” telep: durva rács, mélylégbefúvásos levegőztető medence, utóülepítő,
- „D” telep: „hengeres” rács, mélylégbefúvásos levegőztető medence, utóülepítő.

Telep	Populáció nagysága (fő)	Szennyvíz jellege	Szennyvíztisztítás jellege			A telepen tartózkodás időtartama (óra)	Befolyó szennyvíz mennyisége (m <sup>3</sup> /nap)
			Elsődleges tisztítás	Másodlagos tisztítás	Klorináció		
A	160000	kommunális	1	■	van	30	27000
B	3100	kommunális	2	■	alkalmanként	72	?
C	2600	kommunális	2	■	van	8	750
D	3100	kommunális	2	■	nincs	13	200

13. táblázat: A vizsgálatba bevont 4 szennyvíztelep jellemzői

*Elsődleges tisztítás: kémiai eljárás*

*Másodlagos tisztítás: biológiai folyamat*

*1: rács, homokfogó, ülepítő medence*

*2: csak rács*

*■: levegőztető medence, ülepítő medence*

**V.2.1.5. Környezeti vírusterheltség** szempontjából a „C” telep fontossága emelhető ki.

Itt fordult elő a legtöbb olyan tisztított vízminta, amely vírussal szennyezettnek bizonyult, így itt távozott a legtöbb esetben vírus az elfolyó szennyvízzel a környezetbe. Tehát egy esetleges vízeredetű járvány népegészségügyi kockázata itt tűnik a

legmagasabbnak. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az értékek kvalitatív, és nem kvantitatív jellegűek. Az egyes telepekre vonatkoztatott környezeti vírusterheltség értékeket a 14. táblázatban tüntettem fel. A környezeti vírusterheltséget a vírust tartalmazó, illetve az összes beérkezett tisztított szennyvízminta arányából számoltam.

Telep	A	B	C	D
<b>Környezeti terheltség (%)</b> <b>(víruspozitív tisztított minták</b> <b>száma/beérkezett összes tisztított minta</b> <b>száma) x 100</b>	33,68	41,81	50,90	36,36

14. táblázat. A vírussal szennyezett tisztított vízminták aránya.

### V.2.2. Az egyes vírusok érzékenysége

A vizsgált vírusok szennyvízkezeléssel szembeni érzékenységének számítása több módon lehetséges, és nem határozható meg egyértelműen. Ennek okát, a már említett olyan mintapárok adják, amelyeknél csupán az elfolyó vízből sikerült egy adott vírust kimutatni, a befolyóból nem. Attól függően, hogy ezeket a párokat hogyan vesszük figyelembe, háromféle kalkuláció lehetséges (15. táblázat).

Két számítási mód (I., II.) is azt az eredményt adta, hogy a vizsgált telepek által alkalmazott kezelési eljárásokkal szemben az adenovírusok a legellenállóbbak, kicsit érzékenyebbek a C csoportú rotavírusok, amit a humán astrovírusok, majd az A csoportú rotavírusok követnek. Legérzékenyebbek a humán calicivírusok bizonyultak.

		Vírusok érzékenysége (%) /telep				
Vírus	A	B	C	D	összesen	
HAstV	38,46	0	0	60	<b>24,62</b>	I.
			25	80	<b>35,87</b>	II.
			20	66,66	<b>31,28</b>	III.
RV-A	55,55	80	0	0	<b>33,89</b>	I.
			100	100	<b>58,89</b>	II.
			50	50	<b>46,39</b>	III.
RV-C	52,63	11,11	0	27,27	<b>22,75</b>	I.
		22,22	25		<b>31,78</b>	II.
		20	20		<b>29,98</b>	III.
AdV	42,11	20	12,5	33,33	<b>26,99</b>	I.
			25		<b>30,11</b>	II.
			22,22		<b>29,42</b>	III.
HuCV	100	50	0	0	<b>37,5</b>	I.
		100		50	<b>62,5</b>	II.
		66,66		33,33	<b>49,99</b>	III.

15. táblázat. A vizsgált vírusok érzékenysége. A római számok a különböző számítási módokat jelölik.

I. 
$$\frac{\text{pozitív nyers minták száma} - \text{pozitív tisztított minták száma}}{\text{pozitív nyers minták száma}} \times 100,$$

II. a képlet megegyezik az I. számításával, DE: a pozitív tisztított minták számába nem számítottak bele azon minták, ahol csak a tisztított minta volt pozitív és a nyersből nem sikerült a vírust kimutatni,

III. a képlet megegyezik az I. számításával, DE: ahol egy mintapárnál csak a tisztított mintafél volt pozitív, és a nyersből nem sikerült a vírust kimutatni, ott a nyers mintafelet is pozitívnak vettem.

### V.2.3. Klinikai és környezeti minták összevetése

A környezeti minták vizsgálata alapján a Baranya megyei populációban a real-time PCR módszerrel kapott eredmények szerint a C csoportú rotavírusok cirkulálnak legáltalánosabban. Helyesebb azonban a „hagyományos”, azonos szenzitivitású PCR eljárással kimutatott vírusok előfordulási arányát összevetni. Ennek alapján az adenovírusok jelenléte mondható leggyakoribbnak a vizsgált populáció körében (~91%), ezt követi a humán astrovírusok és az A csoportú rotavírusok előfordulása (~53-54%), legkevésbé gyakori vírusnak a humán calicivírust találtam (~34%) (16. táblázat).

Szennyvízvizsgálataim eredményeit összehasonlítottam ugyanazon időszakból, Baranya megyéből beérkezett klinikai mintákból kapott vírus-előfordulási adatokkal. A klinikai előfordulások minden vírus esetén a környezeti értékek alatt maradtak (16. táblázat).

		Vírus				
		HAstV	RV-A	RV-C	AdV	HuCV
Előfordulás (%)	Klinikai minták	4,23	18,3	0,1*	6,2	6,46
	Környezeti minták	<u>52,54</u>	<u>53,55</u>	<u>97,93</u>	<u>90,92</u>	<u>34,2</u>

16. táblázat. Klinikai és környezeti vírus-előfordulási adatok a vizsgált 2 évben, Baranya megyében.

\* csak 2005-ös adatok

#### V.2.4. Vírus-mennyiség meghatározása

A mintában lévő vírus-kópiaszám meghatározását a C csoportú rotavírusok esetén végeztem el a 2005-ben beérkezett minták esetében. A kvantitatív PCR vizsgálat során kapott kópiaszámokat a teljes 1 liter térfogatra számoltam ki. A kapott értékeket a 17. táblázat tartalmazza.

Szennyvíz-telep	Minta száma	Vírusterheltség 1 liter nyers szennyvízmintában	Vírusterheltség 1 liter tisztított szennyvízmintában	Relatív vírus-tisztulás (%)
A	2005.02.09.	$3,75 \times 10^6$	$2,43 \times 10^4$	99,3
	2005.03.10.	$5,22 \times 10^5$	$1,635 \times 10^4$	96,8
	2005.03.25.	$5,34 \times 10^6$	$4,44 \times 10^3$	99,9
	2005.04.06.	$7,125 \times 10^6$	$4,56 \times 10^3$	99,9
	2005.04.22.	$4,425 \times 10^6$	$1,158 \times 10^4$	99,7
	2005.05.06.	$6,915 \times 10^5$	$1,83 \times 10^4$	97,4
	2005.05.23.	$5,64 \times 10^5$	$9,375 \times 10^4$	83,4
	2005.06.07.	$4,02 \times 10^5$	$9,27 \times 10^3$	97,7
	2005.07.13.	$2,985 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.07.28.	$2,34 \times 10^5$	$< 10^3$	NSZ
	2005.09.07.	$3,585 \times 10^3$	$< 10^3$	NSZ
	2005.09.26.	$3,36 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.10.12.	$8,355 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.11.04.	$2,955 \times 10^4$	$1,755 \times 10^3$	94,1
	2005.11.17.	$3,15 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.12.02.	$2,055 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.12.16.	$8,43 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
B	2005.02.08.	$1,3365 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.04.05.	$9,45 \times 10^3$	$2,385 \times 10^3$	74,8
	2005.05.17.	$1,209 \times 10^4$	$8,79 \times 10^3$	27,3
	2005.08.02.	$3 \times 10^4$	$6,27 \times 10^3$	79,1
	2005.09.20.	$< 10^3$	$< 10^3$	NSZ
	2005.11.15.	$2,52 \times 10^3$	$7,875 \times 10^3$	!
C	2005.02.22.	$1,095 \times 10^4$	$1,429 \times 10^4$	!
	2005.04.19.	$5,85 \times 10^7$	$2,145 \times 10^7$	63,3
	2005.06.07.	$2,28 \times 10^5$	$8,55 \times 10^5$	!
	2005.08.09.	$8,01 \times 10^3$	$< 10^3$	NSZ
	2005.09.27.	$< 10^3$	$< 10^3$	NSZ
	2005.11.29.	$< 10^3$	$2,4 \times 10^4$	!
D	2005.02.01.	$1,1175 \times 10^8$	$5,91 \times 10^6$	94,7
	2005.04.26.	$5,115 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.06.21.	$4,485 \times 10^5$	$3,165 \times 10^3$	99,3
	2005.08.16.	$2,76 \times 10^4$	$< 10^3$	NSZ
	2005.10.11.	$1,71 \times 10^5$	$< 10^3$	NSZ
	2005.11.22.	$1,414 \times 10^5$	$4,065 \times 10^4$	71,3

17. táblázat: Baranya megye 4 szennyvíztisztító telepén 2005-ben gyűjtött mintákra jellemző RV-C vírusterheltség és relatív vírus-tisztulás értékek. NSZ – nem számolható: elfolyó (tisztított) mintában lévő kópiaszám a kimutathatósági határ alá esik; ! – elfolyó minta C csoportos rotavírus-tartalma magasabb a befolyó (nyers) mintáénál.  $< 10^3$  jelöli, ahol a kópiaszám a kimutathatósági határ alá esett (~1500-3000 genom ekvivalens / 1000 ml vízminta)



### V.2.5. Szekvencia vizsgálat

A PCR-t követő szekvencia vizsgálat során 46-ból 31 mintánál sikerült megerősíteni a HAstV, 33-ból 25 mintánál a HRV-A, 16-ból 8 mintánál a HuCV jelenlétét.\* A HAstV 1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös és 8-as típusát sikerült azonosítani. Négy vízminta (8,7%) tartalmazott HAstV-1 típust, 5 minta HAstV-2 típust (10,87%); 2 minta HAstV-3 típust (4,35%), 13 minta HAstV-4 típust (28,26%), 2 minta HAstV-5 típust (4,35%), 11 mintában (23,91%) pedig HAstV-8 típust azonosítottam. Húsz esetben a vírust nem tudtam tipizálni. Ebből 2 esetben a mintát ugyan sikeresen vettem alá szekvenálásnak, de az eredmények elemzése során kevert szekvenciákat azonosítottam, így a mintában előforduló szerotípus nem volt egyértelműen meghatározható („A” telep 2005.05.23 nyers mintában: HAstV-2 vagy HAstV-8; 2006.01.26. tisztított mintában HAstV-1 vagy HAstV-8 volt valószínűleg jelen). Egy mintapár esetében a nyers és a tisztított minta különböző típusú HAstV-t tartalmazott („A” telep 2005.04.06. nyers mintában HAstV-2 volt jelen, míg a tisztított mintában HAstV-1).

A C csoportú rotavírusok kimutatásánál alkalmazott valós idejű PCR-t követő olvadáspont analízis során 3 különböző olvadáspontot sikerült elkülöníteni. A 2005-ben beérkezett, az olvadási görbe analízis során különböző olvadásponttal rendelkező minták közül 13 nyers mintát vettem alá szekvencia analízisnek. Ennek alapján 3 különböző szekvencia eredményt kaptam. Amikor a kapott szekvenciákat az olvadáspontokkal összevettem, a párosítás során megfeleltethetőséget tapasztaltam:

olvadáspontok: 81,9°C (S.D. 0,06) – humán törzsek (6 szekvenált minta)

83,4°C (S.D. 0,26) – szarvasmarha törzsek (3 szekvenált minta)

84,3°C (S.D. 0,16) – sertés törzsek (4 szekvenált minta).

A megállapított összefüggéseket alkalmaztam az összes 2005-ben, illetve 2006-ban beérkezett és RV-C pozitívnak talált szennyvízmintánál. Ennek alapján a nyers mintákban 12 humán, 15 szarvasmarha és 17 sertés törzset azonosítottam (8/1. és 8/2. táblázat). Ugyanakkor a nyers-tisztított párokban jelenlévő RV-C törzsek vizsgálata során 4 esetben ellentmondásos eredményeket kaptam. Az „A” és a „B” telepen két-két mintapár esetében („A” 2005.04.22. és 2005.06.07.; „B” 2005.04.05. és 2005.11.15.) a

---

\* A feltüntetett számok az adott vírusra pozitív minták számát jelölik, függetlenül attól, hogy egy minta tartalmazott e több genotípust az adott vírustól.

nyers és a tisztított mintában különböző gazdaspecificitású törzsek voltak jelen (18. táblázat).

Minta	Nyers mintában lévő vírus	Olvadáspont	Tisztított mintában lévő vírus	Olvadáspont
„A” 2005.04.22.	humán	82°C	szarvasmarha	83,85°C
„A” 2005.06.07.	sertés	84,43°C	humán	81,97°C
„B” 2005.04.05.	humán	82,14°C	szarvasmarha	83,63°C
„B” 2005.11.15.	szarvasmarha	83,44°C	humán	81,87°C

18. táblázat: Különböző gazdaspecificitással rendelkező C csoportú rotavírust tartalmazó szennyvízpárok.

## V.2.6. Filogenetikai összehasonlító vizsgálat

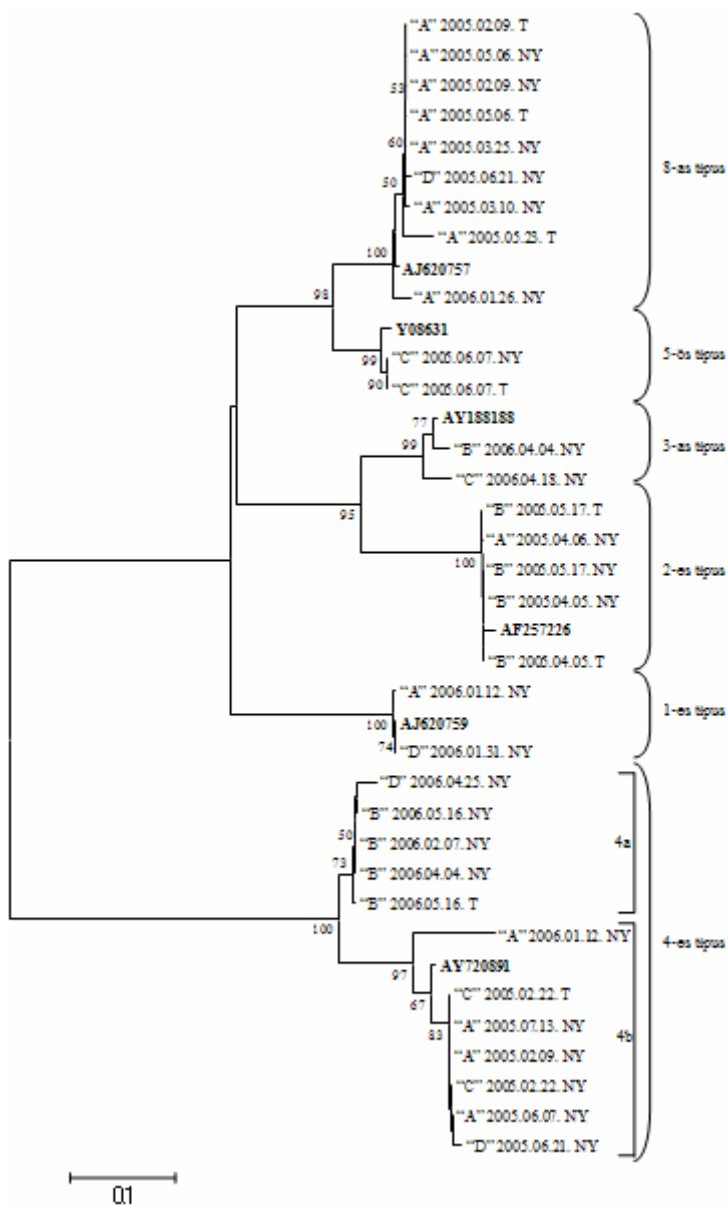
A filogenetikai összehasonlító vizsgálatokat az általam talált környezeti törzsek, valamint HAstV, HRV-A, HRV-C és HuCV referencia-szekvenciák bevonásával végeztem el.

A 39 szekvencia-elemzésnek alávetett HAstV-pozitív szennyvízmintából 32-t tudtam felhasználni a filogenetikai vizsgálatához. Az 1-es és a 8-as típusok leginkább a korábban klinikai mintákból kimutatott magyarországi HAstV törzsek szekvenciáival mutattak hasonlóságot. A 2-es típusok genetikailag Mexikóból származó törzsekhez álltak a legközelebb. A 3-as típusú HAstV-ok egyiptomi szekvenciákkal voltak rokonok. A 4-es típusok Németországban (Drezda) kimutatott vírusokhoz hasonlítottak, és a filogenetikai fán 2 jól elkülöníthető csoportba (4a és 4b) rendeződtek. A HAstV-5 típusok norvégiai szekvenciákhoz álltak a legközelebb (17. ábra).

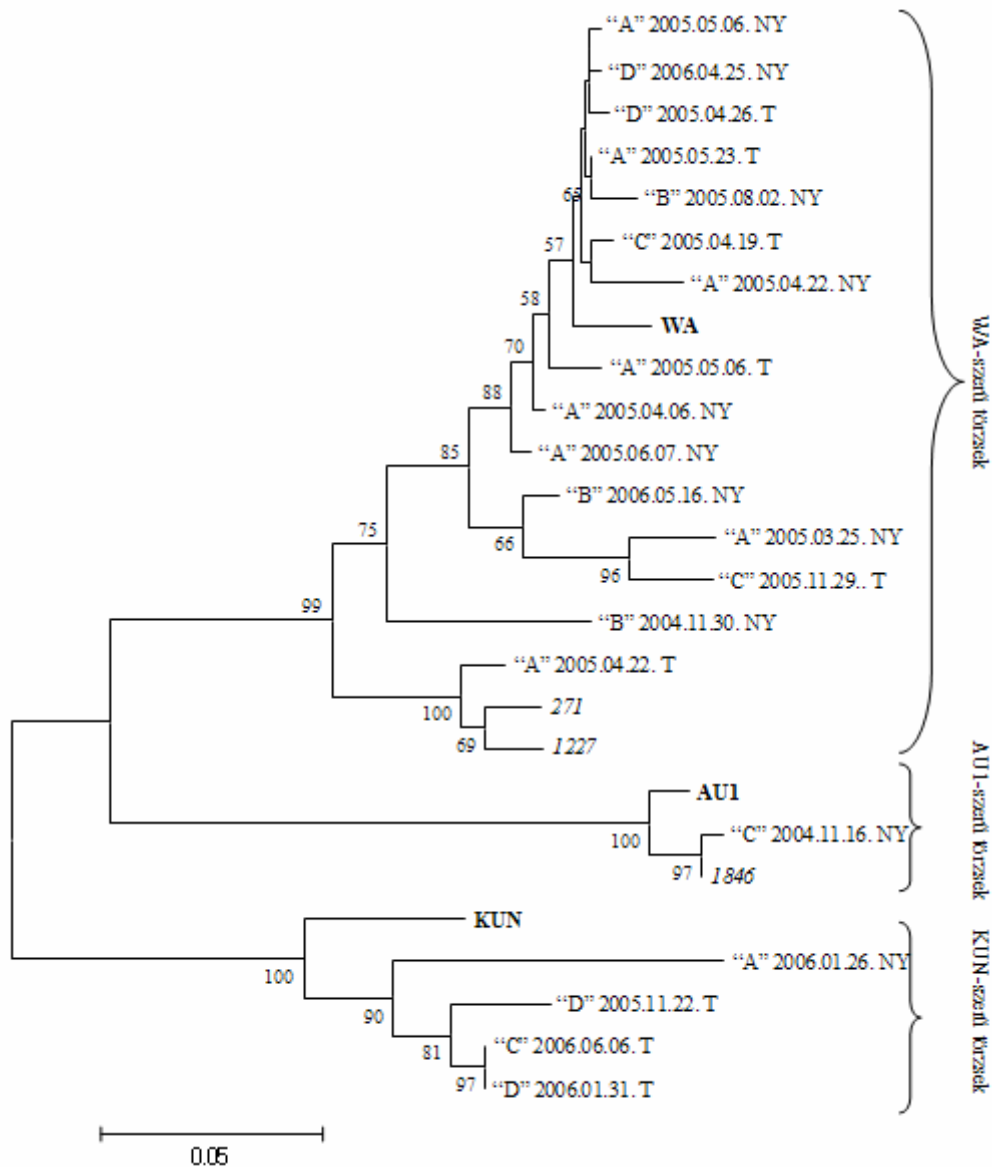
A szekvenált A csoportú rotavírusok közül 20 szekvenciát találtam filogenetikai vizsgálatra alkalmasnak. Az összehasonlítás során humán és sertés törzseket sikerült azonosítani (18. ábra).

Filogenetikai elemzésnek 7 calicivírus szekvenciát tudtam alávetni. Az I. genocsoportba 3, a II-ba 4 szekvencia tartozott. Az általam szennyvízből kimutatott törzsek minden esetben elkülönültek a referencia törzsektől (19. ábra).

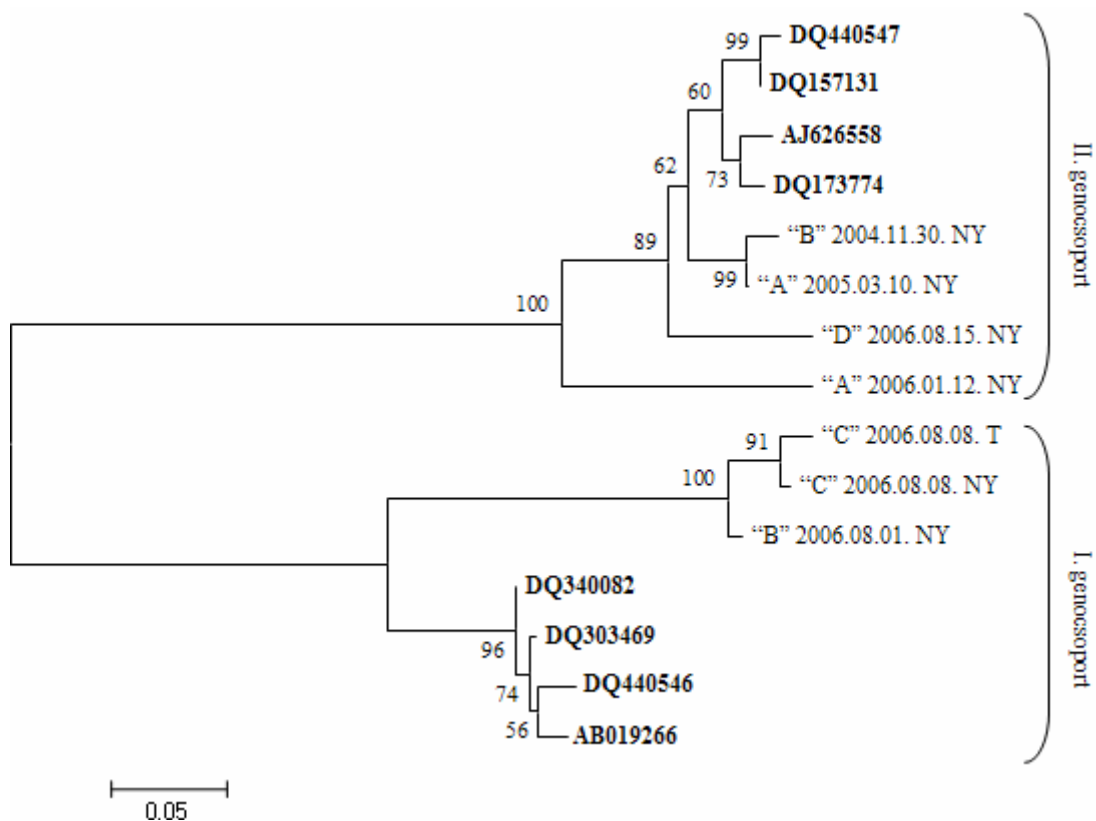
A törzsfák készítéséhez fel nem használt szekvenciák túl rövidek voltak a filogenetikai összehasonlító vizsgálatához, illetve kevert szekvenciákat tartalmaztak.



17. ábra. A humán astrovírus szekvenciákból szerkesztett filogenetikai fa. A filogenetikai fa a kapszid régió 3' hipervariábilis végének 220 bp hosszúságú astrovírus nukleotid szekvenciáján alapul. A fát MEGA v2.1 software segítségével Neighbor-Joining módszer és Kimura 2 szubsztitúciós modell használatával szerkesztettem. A bootstrap értékeket a csomópontokon feltüntettem. A szennyvízből kimutatott törzseket a „telep”, a mintavétel dátuma és a minta típusának (NY= nyers, T= tisztított) feltüntetésével jelöltem (pl. „A” 2005.02.09. T). A referencia törzsek jelölése félkövér betűkkel történt.



18. ábra: Az A csoportú rotavírusok nukleinsav szekvenciájából készített filogenetikai fa. A filogenetikai fa az NSP4 gén 403 bp hosszúságú rotavirus nukleotid szekvenciáján alapul. A fát MEGA v2.1 software segítségével Neighbor-Joining módszer és Kimura 2 szubsztitúciós modell használatával szerkesztettem. A bootstrap értékeket a csomópontokon feltüntettem. A szennyvízből kimutatott törzseket a „telep”, a mintavétel időpontja és a minta típusának (NY= nyers, T= tisztított) feltüntetésével jelöltem (pl. „A” 2005.05.06. NY). A referencia törzsek jelölése félkövér betűkkel, a korábban klinikai mintákból kimutatott törzseké (271, 1227, 1846) dőlt betűkkel történt. Az NSP4 gén elemzése alapján 3 különböző humán genocsoportot különítenek el. Az AU-1-szerű törzsek valószínűleg macska eredetűek, amelyek zoonózis révén kerültek át emberbe. A 271 és az 1227 jelű szekvenciák P[6],G4 genotípusú humán törzsek, amelyek sertés eredetű törzsekkel mutatnak filogenetikai rokonságot. A fa elemzéséből valószínűsíthető, hogy a „B” 2004.11.30. NY és az „A” 2005.04.25. T jelű szekvenciák sertés törzsek. A fa alapján a 271 és az 1227 feltételezett őse az „A” 2005.04.22. T jelölésű törzs. Az AU-1-szerű „C” 2004.11.16. NY jelzésű szekvencia megegyezik a 2000-ben klinikai mintában talált P[9],G6 genotípusú 1846 jelű vírussal.



19. ábra: A humán calicivírus szekvenciákból szerkesztett filogenetikai fa. A fa a polimeráz régió 220 bp hosszúságú calicivírus nukleotid szekvenciáján alapul. A fát MEGA v2.1 software segítségével Neighbor-Joining módszer és Kimura 2 szubsztitúciós modell használatával szerkesztettem. A bootstrap értékeket a csomópontokon feltüntettem. A szennyvízből kimutatott törzseket a „telep”, a mintavétel dátuma és a minta típusának (NY= nyers, T= tisztított) feltüntetésével jelöltem (pl. „B” 2004.11.30. NY). A referencia törzsek jelölése félkövér betűkkel történt.

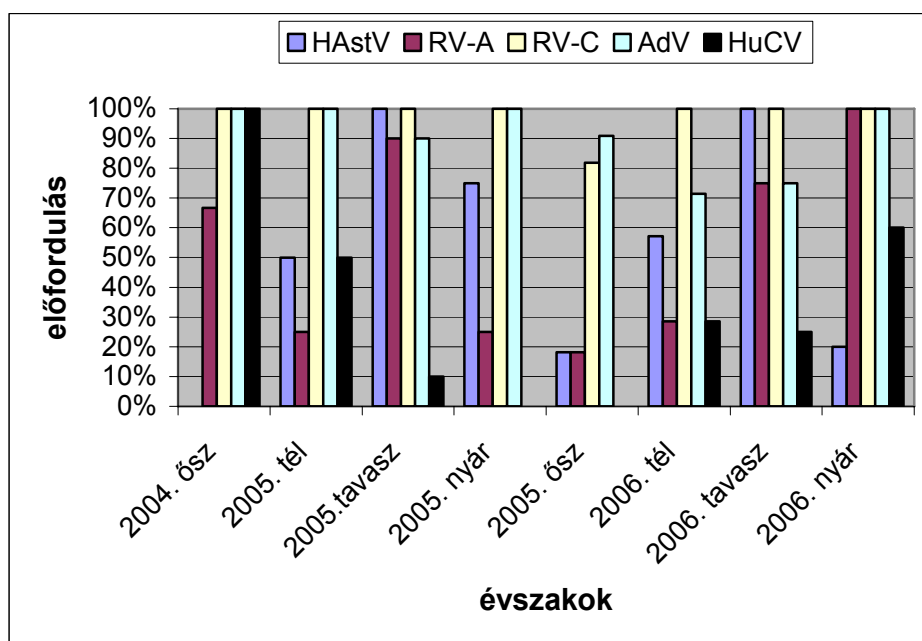
### V.2.7. Szezonális

*Humán astrovírusokat* a vizsgált periódus szinte minden évszakában találtam, de a víruselőfordulás a tavaszi hónapokban (március-május, 100%) érte el a csúcst, amikor az összes beérkezett mintából sikerült kimutatni.

Mindkét vizsgált év eredményeit figyelembe véve, az *A csoportú rotavírusra* pozitív szennyvízminták száma is tavasszal volt a legmagasabb (március-május, 90%, illetve 75%). Nyáron azonban ellentmondásos eredményeket kaptam, hiszen amíg 2005-ben a rotavírus-pozitív mintaszám hirtelen lecsökkent (25%), addig 2006-ban a maximumra emelkedett (100%). Az *adenovírusok* eloszlása nem mutatott szezonálisitást, a vírus minden évszakban általánosan és nagy gyakorisággal cirkulált. A *humán calicivírusoknál* már közel sem ilyen egyszerű a szezonális megoszlás megállapítása. A tavaszi hónapok kivételével a 2005-ben és 2006-ban beérkezett humán calicivírus-

pozitív minták hónapos eloszlása meglehetősen eltérő volt. Például a 2004. őszi minták mindegyikéből sikerült calicivírust kimutatni, de 2005. őszén egyetlen mintában sem találtam meg a vírust. Így a calicivírusok évszakos eloszlása nem volt meghatározható (20. ábra, 19. táblázat).

A C csoportú rotavírusok a vizsgált időszak mindkét évében szinte 100%-os gyakorisággal fordultak elő. Ugyanakkor a humán és állati törzsek évszakos és területi eloszlása jelentős különbségeket mutatott. A humán törzsek elsősorban az „A” telepen fordultak elő, és főként a vizsgált év első hat hónapjában cirkuláltak, majd azokat sertés törzsek váltották fel. Az állati törzsek a vizsgált időszak alatt nem mutattak évszakos eloszlást. A 2005-ben beérkezett mintáknál elvégzett vírus-mennyiség meghatározási kísérletek során kiderült az is, hogy a humán vírusok jóval magasabb kópiaszámban cirkulálnak, mint az állati törzsek (átlag kópiaszám:  $1,2 \times 10^7$  humán törzseknél,  $3,9 \times 10^4$  sertés törzsek esetén,  $9,9 \times 10^4$  szarvasmarha törzseknél). 2006-ban nem találtam humán törzseket, és az állati vírusok közül is inkább a szarvasmarha törzsek domináltak (7/12; 58,33%).



20. ábra. A szennyvízben vizsgált vírusok évszakos eloszlása.

évszakok	Vírusok				
	HAsTV	RV-A	RV-C	AdV	HuCV
2004. ősz	0%	66,66%	100%	100%	100%
2005. tél	50%	25%	100%	100%	50%
2005. tavasz	100%	90,00%	100%	90%	10%
2005. nyár	75%	25%	100%	100%	0%
2005. ősz	18,18%	18,18%	81,82%	90,91%	0%
2006. tél	57%	29%	100%	71,43%	28,57%
2006. tavasz	100%	75%	100%	75%	25%
2006. nyár	20%	100%	100%	100%	60%

19. táblázat. A vizsgált vírusok százalékos előfordulása évszakonként.

## V.2.8. Kémiai és bakteriológiai eredmények

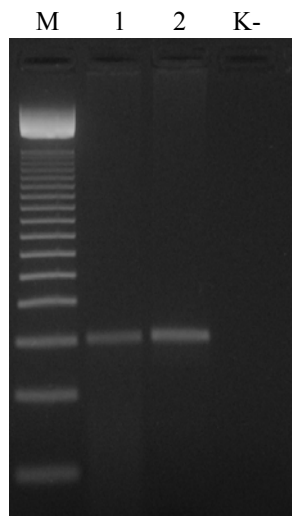
Kémiai és bakteriológiai vizsgálatok csak a „B”, „C” és „D” telepekről érkezett minták esetében készültek. A mintákból végzett rutin kémiai tesztek eredményeként kapott kémiai paraméterek és ionok az egyes mintáknál nem mutattak különbségeket (pl.: „C”2005.06.07.NY és „B”2005.08.02.NY: pH=8,0 és 7,6; KOI=930 és 941; kálium=36 és 35 mg/l; 20. táblázat). Az eredmények alapján a vírusok jelenléte és jelenleg a fekális eredetű szennyezés indikátoraiként elfogadott fekális koliformok száma között az összefüggés hiányzott (pl.: „D”2005.02.01.: AdV-pozitív és koliform-negatív, „C”2005.06.07.: RV-A-negatív és koliform-pozitív; 20. táblázat). Sajnos ilyen irányú vizsgálatok csak 2005-ben történtek, és csupán a vírusokra megvizsgált minták közel 7%-ánál állt bakteriológiai vizsgálatokból származó adat rendelkezésemre, ezért eredményeim az adott időszakra nézve nem reprezentatívak.

*	Minta								
	„D”2004.11.23.		„D”2005.02.01.		„C”2005.06.07.		„B”2005.08.02.		
	<u>NY</u>	<u>T</u>	<u>NY</u>	<u>T</u>	<u>NY</u>	<u>T</u>	<u>NY</u>	<u>T</u>	
pH	8,5	8,3	8,2	8,2	8,0	7,9	7,6	7,5	
Nitrit ion	-	0,15	-	0,15	-	0,04	-	3,4	
Nitrát ion	-	<0,5	-	<0,5	-	1,2	-	49	
Zsírok, olajok	-	<0,1	-	<0,1	-	6,5	-	0,3	
KOI kr	920	188	833	78	930	177	941	54	
BOI 5	210	8	321	12	432	71	287	<5	
Szabad aktív klór (mg/l)	-	0,1	-	0,25	-	-	-	<0,02	
Kötött aktív klór (mg/l)	-	9,7	-	8,3	-	-	-	1,125	
Kálium (mg/l)	42	32	33	29	36	28	34,8	48,3	
Koliform szám (/ml)	-	0	-	0	-	3x10 <sup>5</sup>	-	176	
Vírus	HAsTV	—	—	—	—	+	+	—	—
	RV-A	—	—	—	—	—	—	+	—
	RV-C	+	+	+	+	+	+	+	+
	AdV	+	+	+	+	+	+	+	+
	HuCV	—	+	+	+	—	—	—	—

20. táblázat: Vízkémiai, vízbakteriológiai és vízvirologiai eredmények. \*A táblázatban csupán néhány jellemző vízkémiai paramétert tüntettem fel. -: nem áll adat rendelkezésre; —: a vírus nem kimutatható; +: a vírus kimutatható; □: nyers mintákra jellemző értékek; □: tisztított mintákra jellemző értékek, ■: koliform szám és vírus-előfordulás közötti összefüggés hiánya.

### V.2.9. Vizsgálatok belső kontroll alkalmazásával

A 2006. február 21-étől beérkezett mintákhoz belső nukleinsav kontrollt adtam. Az optimalizálás során a plazmid-DNS csökkenő mennyiségét mértem 1 liter vízmintához (10 µl-től 1 µl-ig). Ezt követően a legkisebb, de még biztosan kimutatható mennyiséget alkalmaztam a továbbiakban, ami 2 µl plazmid-DNS-t jelentett. Ezt a mennyiséget pipettáztam a nyers és a tisztított szennyvízmintákhoz egyaránt. A belső kontroll a minták mindegyikénél kimutatható volt (21. ábra).



21. ábra. Mon2/PRBEG primer párral kapott RT-PCR termékek. Az amplifikált DNS termékek 150 bp hosszúak. A szennyvízminták 2 µl belső nukleinsav standardot tartalmaztak. M: marker (50 bp), 1: 2 µl belső nukleinsav kontrollt tartalmazó HAsV negatív nyers szennyvízminta, 2: 2 µl belső nukleinsav kontrollt tartalmazó HAsV negatív tisztított szennyvízminta, K-: negatív kontroll.

Ezen eredményeket bemutató előadások, poszterek és folyóiratban megjelent kivonataik, valamint közlemények:

- **Meleg, E.,** Bányai, K., Szűcs, Gy.: Detection of human, porcine and bovine group C rotaviruses in the communal sewage: zoonosis or contamination? (Poszter, II. DIVINE EVENT Meeting, 2006. szeptember; Róma)
- **Meleg, E.,** Bányai, K., Jakab, F., Kocsis, B., Bogdán, Á., Melegh, B., Szűcs, Gy.: C csoportú rotavírusok kimutatása szennyvízből real-time PCR módszerrel Baranya megyében. (Poszter, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése, 2006. október; Keszthely)



- **Meleg, E.**, Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Bogdán, Á., Szűcs, Gy.: Baranya megyei szennyvizek virológiai vizsgálata. (*Előadás, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése, 2006. október; Keszthely*)
- **Meleg, E.**, Bányai, K., Jakab, F., Kocsis, B., Bogdán, Á., Szűcs, Gy.: Detection of group C rotaviruses by real-time PCR in sewage samples in Baranya County, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2006, **53(3)**, 316-317. (*absztrakt*)
- **Meleg, E.**, Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Bogdán, Á., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Viral examination of sewage samples in Baranya County, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2006, **53(3)**, 315-316. (*absztrakt*)
- **Meleg, E.**, Bányai, K., Martella, V., Jiang, B., Kocsis, B., Kisfali, P., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Detection and quantification of group C rotaviruses in the communal sewage. (*közlésre benyújtva*)

## VI. MEGBESZÉLÉS

A patogén vírusok különböző vizekben való jelenlétének bizonyítása szerte a világon egyre fontosabbá válik az egészségügyi és környezetvédelmi szervek számára különösen azért, mert a vízforrások elszennyeződése napról-napra nő. Az utóbbi két évszázadban ugyanis a népesség szaporodása és a megnövekedett ipari tevékenység a hulladék mennyiségét is megsokszorozta. Hulladék jut a csatornába a konyhákból, a fürdőszobákból, a mezőgazdasági és az ipari termelésből.

Az eddigi nemzetközi vizsgálatok feltárták, hogy vírusok az összes természetes vízben előfordulhatnak, ezért a felszíni vizek minden fajtája veszélyes lehet az emberre nézve. A kontaminálódott felszíni vizek és a szennyvizek könnyen fertőzések forrásává válhatnak, és jelentős járványokat idézhetnek elő (Griffin és mtsai., 2003; Lawson és mtsai., 1991; Simmons és mtsai., 2001). Kiderült, hogy a szennyvíztelepek azon dolgozói, akik gyakran kerülnek kapcsolatba nyers szennyvízzel, jóval nagyobb eséllyel betegednek meg gasztroenteritiszben, mint más emberek (Rylander, 1999). A vírusok igazi veszélye ugyanis abban rejlik, hogy a környezetben hosszú ideig túlélhetnek, és kedvező körülmények között akár néhány partikulum is betegséget idézhet elő az emberben. Ugyanakkor a vízeredetű, vírus okozta megbetegedések felismerése nem könnyű, hiszen egyrészt a fertőzést okozó vírusok tünetszegény vagy aszimptomatikus megbetegedéseket okoznak, amit nehéz a vízeredetre visszavezetni. A fertőzött vízzel kapcsolatba kerülő személy légútjaiban/béltraktusában akár tünet nélkül is szaporodhat a vírus. Ez a személy viszont megfertőzhet olyan embereket, akiknél már tünetek is fellépnek, így a vízeredet nem felderíthető. Másrészt az epidemiológiai módszerek a vízzel terjedő vírusbetegségek jelzésére nem mindig alkalmasak. Emellett a legtöbb enterális vírus nagyon sokféle tünetet hozhat létre, ami félrevezető lehet. Elsősorban fürdőzés, szennyezett ivóvíz vagy jégtartalmú italok fogyasztása, szennyezett források, kutak használata, nem megfelelően klórozott medence és települési ivóvíz használata hozhatók összefüggésbe olyan vízeredetű járványokkal, amelyekben a vírusok kórokként azonosíthatók.

Mivel az enterális vírusok általánosan rendkívül ellenállóak a különböző környezeti károsító tényezőknek, így feltételezhető volt, hogy azok szennyvízből is kimutathatók. (Az enterovírusok 2-168 napig őrzik meg fertőzőképességüket csapvízben, 2-130 napig tengervízben, 25-125 napig talajban és akár 90 napig is

infektívek maradnak kagylókban /Melnick és mtsai., 1978/). Ezért a megfelelő koncentrálsási, nukleinsav kivonási és kimutatási eljárások optimalizálása után 2004-ben 22 szennyvíztelep nyers szennyvizét vettem vizsgálat alá, hogy meggyőződjek az alkalmazott módszer hatékonyságáról. A kísérletek ezen kezdeti stádiumában figyelmem a HAstV-ra irányult, mert ennek kimutatásában a korábbi években hasmenéses gyermekektől származó klinikai minták vizsgálata folytán már szereztem bizonyos tapasztalatokat. A kezdeti kecsegtető eredmények után, 2005-2006-ban 4 szennyvíztelep nyers és tisztított szennyvizeit vizsgáltam rendszeresen. Ez az astrovírusokon kívül már az A, B, és C csoportú rotavírusok, az adenovírusok és a calicivírusok kimutatását is magában foglalta.

A bevezetőben igyekeztem az olvasót megismertetni a gyakorlatban alkalmazott koncentrálsási eljárásokkal. A megfelelő módszer kiválasztása nem bizonyult egyszerűnek. Végül a Minor (1985) által publikált PEG 6000-NaCl eljárás mellett döntöttem (a PEG 6000 egy hidrofil, kémiailag semleges, nem toxikus, nagy molekulásúlyú etilén-oxid polimer, amely számos fehérje kicsapására alkalmas), hiszen könnyen alkalmazhatónak, kis eszközigényűnek, emellett rendkívül gyorsnak (a minták koncentrálsása kb. 12 órát vesz igénybe) és nem utolsó sorban költséghatékonynak (mintánként kb. 1200 Ft) bizonyult. Ezután a vírusok kimutatását kellett megoldani. A szokványos víruskimutatást a vírusok sejt kultúrában történő izolálása jelenti. Azonban a szennyvízben található vírusok tenyésztéssel történő izolálása nem egyszerű, hiszen az enterális vírusok többsége nehezen (pl. astrovírus, rotavírus, enterális adenovírus), vagy egyáltalán nem (pl. calicivírus) szaporítható szövetkultúrában. Ezenkívül a szennyvíz esetében a bakteriális kontamináció a sejt kultúrában történő vírus szaporítást még nehezebbé teszi. A minta nagy mennyiségű antibiotikummal vagy kloroformmal való kezelése hatásos lehet ugyan, de a sejt károsító hatás az alkalmazandó koncentráció mellett már nem zárható ki. Mindezen okok miatt a vírustenyésztést elvettem. Napjainkban a molekuláris technikák jelentik a környezeti mintákból történő víruskimutatás legjobb alternatíváját (Tsai és mtsai., 1994). A koncentrált mintákból a vírusok nukleinsavának kivonása többféle módszerrel történhet, pl. fenol-kloroformos extrakcióval, SDS-proteináz K emésztéssel, triklórecetsav kicsapással. A virális nukleinsav kivonására a Boom és mtsai. (1990) által leírt GuSCN-silica módszert választottam, mert a szakirodalom szerint hatékonyan távolítja el az inhibitorokat

(Gilgen és mtsai., 1997), egy lépésben képes a DNS és az RNS extrakciójára, könnyen és igen gyorsan kivitelezhető, ráadásul meglehetősen érzékeny, továbbá nem igényel speciális laboratóriumi felszereltséget.

A molekuláris biológiai módszerek közül a reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR) új lehetőséget adott számomra, ráadásul ez a módszer a laboratóriumban, klinikai minták vizsgálatára már rutinszerűen alkalmazott eljárás volt. Napjainkban a környezeti mintákból történő víruskimutatásnál is ez a legérzékenyebb és legspecifikusabb módszer, amellyel mind a fertőző, mind a nem fertőző víruspartikulumok kimutathatók. Ugyanakkor ennek a molekuláris technikának kétségtelen hátránya is, hogy a fertőző és a nem fertőző partikulumok között nem tud különbséget tenni. Ezért a jövőben – ahol lehetséges – a már leírt hátrányok ellenére tenyésztési kísérleteket kell elvégezni a fertőzőképesség igazolására, hiszen nagyon fontos megtudni, hogy a vizsgált vírusok a szennyvízben fertőzőképességüket megtartották-e vagy sem. Mindenesetre ezek a vírusok különösen ellenállóak, hosszú ideig képesek infektivitásukat a vízben megőrizni. Genomjuk az RNáz és DNáz gazdag környezetben nem maradhatna ép a víruskapszid védelme nélkül. Mivel a PCR-rel történő felsokszorozítás után a genomiális RNS, illetve DNS kimutatható volt, ezért feltételezhető, hogy a vírusok a szennyvízben fertőzőképesek maradtak. Ezt a feltevést támasztja alá Limsawat és Ohgaki (1997) tanulmánya, amelyben a szerzők arról számolnak be, hogy a szabad RNS-nek szennyvízben néhány percen belül nyoma vész.

A *környezeti anyagok* vizsgálatából kapott adatokat összevettem az azonos időszakban *klinikai minták* vizsgálatára során nyert vírus-előfordulási értékekkel. Az összehasonlításból kapott eredmények alátámasztják, hogy a szennyvízben vizsgált vírusok minden valószínűség szerint magasabb arányban vannak jelen a populációban, mint ahogy azt a klinikai minták vizsgálatából feltételezni lehetett (HAsTV környezeti mintákban ~53%-ban, klinikai mintákban csupán ~4%-ban, HRV-A szennyvízben ~54%-ban, kórházi mintákban ~18%-ban volt kimutatható, HAdV környezeti mintákban ~91%-ban, klinikai mintákban ~6%-ban, a HuCV környezeti mintákban ~34%-ban, klinikai mintákban ~6%-ban fordult elő). Ez arra enged következtetni, hogy a Baranya megyei populációban jelentős a tünetszegény vagy tünetmentes vírusfertőzések száma, amelyek így nem kerülnek felismerésre és kórházi ellátásra. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy klinikai anyagok csupán csecsemőktől és

kisgyermektől származtak. Le Cann és mtsai. (2004) astrovírusokkal folytatott vizsgálataik után azonos állításokat fogalmaztak meg.

Nem találtam gyakorisági összefüggést a *kimutathatóság és az ellátott település* nagysága között. Ez valószínűsíti, hogy a vizsgált vírusok a populációban a tanulmányozott időszak alatt általánosan cirkuláltak.

Több mintapár esetében a vízmintapár nyers fele az alkalmazott víruskimutatási eljárás végén negatívnak bizonyult egy adott vírusra, de a tisztított mintafélben sikerült igazolni a vírus jelenlétét. Az *ellentmondásos jelenség* egyik magyarázata az lehet, hogy ezekben az esetekben valószínűleg a nyers mintában jelenlévő PCR-t gátló inhibitorok zavaró hatása miatt nem sikerült a víruskimutatás. Azonban a PCR reakciót akadályozó ágensek a kezelési folyamat során oly mértékben hígulhattak fel, hogy a tisztított mintánál már nem gátolták a polimeráz láncreakciót. Számos tanulmány számol be arról, hogy amennyiben az inhibitorok kihígulnak, a PCR érzékenysége megnő és végbemehet a mintában jelenlévő nukleinsav amplifikációja (Alvarez és mtsai., 1994; Tsai és Olson, 1992a; Tsai és Olson, 1992b). A nem megfelelő reakciókörülmények, a mintában jelen lévő anyagok zavaró hatása, a reagensek, illetve a reakció során felhasznált bármely anyag, eszköz esetleges kontaminációja a reakció gátlását, csökkent érzékenységét okozhatja. Ezért vizsgálataim megfelelő gondosság és óvintézkedések betartása mellett történtek. A hagyományos és különösen a valós idejű PCR érzékenységére való tekintettel, a keresztszennyezések megakadályozására a reagensek összemérése (lamináris fülke alatt), a nukleinsavnak a reakciókeverékhez való hozzáadása (lamináris fülke alatt), a PCR amplifikáció, a nyert amplikonok gélelektroforézise mind külön-külön helyiségben történt, ahol a levegő közlekedése csak egyirányban biztosított a technológia sorrendjében, megakadályozva így az előző helyiségbe történő visszaáramlást. Minden lépésnél új pár púdermentes latex kesztyűt használtam. A gátló hatás minimalizálható a PCR reakció optimalizálásával is (megfelelő primerek és polimeráz enzimek választása, a különböző PCR lépések során ideális hőmérséklet és időtartam alkalmazása, elegendő amplifikációs ciklus, optimális  $Mg^{2+}$  koncentráció), amikor is minden szükséges reagens megfelelő mennyiségben áll rendelkezésre az amplifikációhoz. A klinikai anyagok vizsgálatánál már bevált és hosszú évek óta használt (RT-) PCR protokollokat ezért minden egyes vírusnál a szennyvízre is optimalizáltam. A reakcióelegyekbe DMSO-t mértem, hiszen az képes

az RT-PCR hatékonyságának megnövelésére (Sidhu és mtsai., 1996). Feltételezések szerint a DMSO háromféleképpen képes a láncreakció eredményességének fokozására: a templát másodlagos stuktúrájának destabilizációjával fokozza az annealing lépés hatékonyságát, esetleg kiküszöböli a nem specifikus amplifikációkat, de módosíthatja a polimeráz hőaktivitását is. Szennyvíz esetében PCR-gátló anyagok lehetnek például a huminsavak szerves összetevői (Wilson, 1997). A GuSCN-silica módszerrel történő nukleinsav kivonási eljárással az inhibitorok jelentős része eliminálható a mintából (Boom és mtsai., 1990), de a PEG és a kloroform is előmozdítja az inhibitorok mennyiségének csökkenését (Wilson, 1997). A beérkezett 9 olyan mintapárból, amelynek csupán tisztított feléből sikerült egy adott vírust kimutatni, mindössze egy pár akadt („C” telep, 2005.11.29.), amelynek nyers mintafeléből egyetlen vizsgált vírus sem volt kimutatható; a többi mintapár esetében egyéb enterális vírusok jelenlétét igazolni tudtam a nyers mintában (11. táblázat, a feltehetően inhibitort tartalmazó mintát félkövér betűkkel jelöltem). Így valószínűsíthető, hogy inhibitorok csupán a „C” telepről 2005.11.29-én beérkezett nyers mintában lehettek jelen. Az ellentmondásos eredmények tisztázására a 2006. februárjától beérkezett minták esetében belső nukleinsav standard – egy modifikált nukleinsav szakasz – segítségével igyekeztem a PCR inhibitorok jelenlétére fényt deríteni. A belső nukleinsav kontroll a vizsgálat során végig követhető, amennyiben a PCR végén nem sikerül visszanyerni, akkor valami meggátolta kimutatását, amely a mintában lévő inhibitor jelenlétére utal. A belső standard az azt tartalmazó minták mindegyikénél kimutatható volt, ennek alapján kizárható volt a mintában lévő inhibitorok jelenléte.

A fent leírtakból az következik, hogy az ellentmondásos mintapároknál további eshetőségekre is gondolnunk kell. Így a jelenséget magyarázhatja az is, hogy a nyers, illetve a tisztított minták gyűjtése ugyanazon a napon, ugyanabban az órában történt, ezért a vizsgálatnak alávetett tisztított minta nem a vizsgált nyers minta valódi párját képezte. Ezért további kiterjedt vizsgálatok szükségesek annak meghatározására, hogy egy adott térfogatú, adott időpontban a szennyvíztelepre befolyó nyers szennyvíz mennyi idő múlva jelenik meg elfolyó, tisztított vízként. Az átfolyási idő meghatározása (a szennyvíznek a telepen való tartózkodási ideje) módot ad arra, hogy egy pont-mintavételezéssel vett nyers szennyvízmintának a tényleges tisztított párját lehessen vírusvizsgálat alá vetni. Ugyanakkor kérdéses, hogy a viszonylag pontos

átfolyási idő valóban meghatározható-e, hiszen a nagyobb esőzések és a szennyvíztelepre befolyó kezeletlen víz mennyiségének napi, illetve napszakonkénti ingadozása mind hatással vannak a szennyvízkezelés időtartamára, és így egy adott vízmennyiségnek a telepen eltöltött idejére. Magyarázhatók az ellentmondásos eredmények – ahogy az átfolyási idő meghatározásánál már említettem – a telepre befolyó vízmennyiség napi ingadozásával is. Elképzelhető az is, hogy a mintákban olyan inhibitorok voltak jelen, melyek csak az RT-t gátolták, a PCR-t nem, ezért az inszert amplifikálható volt.

Mivel leginkább az A csoportú rotavírusok esetében észlelhető ellentmondás a nyers és a tisztított minta pozitivitását tekintve (összesen 7 mintapárnál), ezért feltételezhető, hogy az A csoportú rotavírusok kimutatására alkalmazott primer pár specificitása mégsem volt a legmegfelelőbb a szennyvízből történő víruskimutatásra, ami újabb alternatívát szolgáltathat az ellentmondó adatok magyarázatához.

Érdekes megfigyeléseket tettem a kimutatott vírusok molekuláris elemzése során. Vizsgálataim alapján a HAstV 8-as és a 4-es típus dominanciája figyelhető meg, ami eltér a klinikai minták vizsgálatából világszerte kapott eredményektől, amelyek a HAstV-1 túlsúlyáról számolnak be (Jakab és mtsai., 2004; Guix és mtsai., 2002; Liu és mtsai., 2004; Sakamoto és mtsai., 2000; Palombo és Bishop, 1996; Lee és Kurtz, 1994; Noel és mtsai., 1995). Liu és mtsai. rávilágítanak arra, hogy a HAstV-1 típus dominál Európán kívül az USA-ban és Ausztráliában is, ugyanakkor a 8-as típust az egyik legritkább szerotípusként azonosítják világszerte (Liu és mtsai., 2004). A klinikai minták HAstV-1 gyakorisága arra utal, hogy az 1-es típusú astrovírusok által okozott tünetek súlyosabbak lehetnek a többi típus által okozott fertőzés szimptomáival szemben, így elsősorban a HAstV-1-el fertőzöttek kerülnek kórházi ellátásra. További vizsgálatokat kell elvégezni, hogy a HAstV valódi gyakoriságára fény derüljön, és a klinikai, valamint a környezeti minták között fennálló szerotípusbeli kérdések tisztázhatók legyenek. Mindenesetre elgondolkodtató, hogy a szennyvízben talált törzsek talán a klinikailag tünetszegény esetekből kerülnek ki, vagy esetleg az egyéb típusoknál ellenállóbbak a különböző környezeti behatásokkal szemben.

Az astrovírusokhoz hasonlóan, a rotavírusok környezeti és klinikai mintákban való előfordulása közötti kapcsolat is további vizsgálatokat igényel, amely elsősorban a szennyvízben talált rotavírus törzsek G és P tipizálásával a vízben lévő genotípusok

feltárását, majd ezeknek a típusoknak kórházi mintákban talált rotavírus-genotípusokkal való összehasonlítását kell, hogy megcélolja. Baggi és Peduzzi svájci tanulmányukban szennyvizekben és felszíni vizekben nézték a rotavírusok előfordulását, és ezzel párhuzamosan 4 évnél fiatalabb, hasmenésben szenvedő gyermekektől gyűjtött székletminták vizsgálatát is elvégezték. Kísérleteikben a vizsgált vízminták ~17%-ában találták meg a rotavírusokat. Elvégezték az általuk talált törzsek G tipizálását is, amelynek eredményéből arra a megállapításra jutottak, hogy az egészséges felnőttek rezervoárként működnek a rotavírusok terjesztésében (Baggi és Peduzzi, 2000).

Az elvégzett *szekvencia vizsgálatok* során olyan eredményeket is kaptam, amely nem tette lehetővé a szekvencia egyértelmű meghatározását. A kromatogram elemzésekor több egymásra rakódó szekvencia volt megfigyelhető. Ennek oka, hogy a mintában egyidejűleg az adott vírus 2 (vagy több) különböző genotípusa volt jelen, vagyis kevert fertőzésről beszélhetünk. Nadan és mtsai. (2003) humán astrovírussal végzett kísérleteik nyomán leírták, hogy akár több genotípus is jelen lehet egy mintában, és rávilágítottak arra, hogy amennyiben az amplifikálás és a karakterizálás során egyetlen genotípust azonosítunk, az még nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a mintában több genotípus egyidejűleg legyen jelen. Calicivírusoknál is leírták – a PCR termék klónozását majd az egyedi klónok szekvenálását követően – egy mintában különböző genotípusok jelenlétét (Lodder és mtsai., 1999). Ezért a későbbiekben célszerű lenne a kevert fertőzések tisztázása és a típus egyértelmű meghatározása céljából a PCR-rel pozitívnak talált minták esetében a PCR terméknek egy megfelelő plazmidba való klónozását, majd a kapott klónok szekvenálását elvégezni, és csak ezután elemezni és értelmezni az adatokat. Van den Berg és mtsai. is a klónozást ajánlják a genotípusok egyértelmű meghatározására (2005).

Azonban a sikeres szekvenálási vizsgálatok eredménye sem volt minden esetben egyértelmű. HAsTV-nál 1 mintapár, RV-C-nél 4 mintapár esetében a nyers és a tisztított minta más típusú vírust tartalmazott (8/1. és 18. táblázat). Ennek egyik feltételezett oka az inhibíció magyarázatánál már említett mintavételezésben jelentkező időkülönbségben keresendő. A szennyvíz szennyvíztelepen való tartózkodási idejének meghatározása után a valódi tisztított mintafél vizsgálatának eredménye lehetne igazán perdöntő. Valószínűbb azonban az a feltevés, hogy a nyers mintában mindkét típus előfordult, de az egyik típusú vírus jóval nagyobb kópiaszámban volt jelen, ezért a PCR



vizsgálattal azt lehetett kimutatni. A tisztítási folyamat során azonban olyan mértékben csökkent ezen típusú vírusok száma, hogy lehetővé vált a tisztított mintában a másik típus azonosítása, vagyis a magasabb kópiaszámban előforduló vírus-típus az amplifikáció során elfedte az egyéb típusokat. Ugyanakkor az elvégzett szekvencia vizsgálattal elsődleges célom a PCR specificitásának megerősítése és az uralkodó szekvenciák megállapítása volt. Mindazonáltal epidemiológiai szempontból mindenképp fontos lehet az egy mintában lévő genotípusok feltárása, mert nem szabad elfelejteni azt a tényt, hogy a mintában lévő különböző genotípusok rekombinálódhatnak, amelyek eredményeként a populációban már cirkuláló törzsekhez képest akár virulensebb, patogénebb rekombinánsok is kialakulhatnak (van den Berg és mtsai., 2005).

Harmincnégy esetben nem sikerült a vírusok genotípusának meghatározása (II. és III. periódus alapján), amelyek feltételezett oka, hogy csak elégtelen mennyiségű ampifikált PCR termék állt rendelkezésre a szekvenáláshoz.

A II. és III. periódusban gyűjtött HAstV pozitív minták közel 11%-ában (5 minta) találtam meg az eddig hazánkban csak környezeti mintákból azonosított 2-es típust. Tizenegy mintában két típus együttes előfordulását igazoltam, ami alátámasztja azt a – sikertelen szekvenálások során is megfigyelt – jelenséget, hogy egy mintában különböző genotípusok egyidejűleg lehetnek jelen. Érdekes jelenség, hogy a 8-as típusú astrovírusokat szinte kizárólag csak az „A” telepen, 2-es típusúakat a „B” telepen sikerült kimutatni, ami utalhat arra, hogy ezek a típusok az adott területen esetleg endémiásan fordultak elő a vizsgált időszakban.

Mindenesetre megfigyeléseim közvetetten azt igazolják, hogy egyszerre több HAstV, RV-A, RV-C, illetve HuCV genotípus van jelen a Baranya megyei lakosságban.

A HAstV-ok közül az 1-es és a 8-as típusok mutattak közeli rokonságot magyar klinikai mintákból izolált törzsekkel, ugyanakkor el is különültek tőlük, ezzel is alátámasztva azt a korábban megfogalmazott feltevésemet, hogy a szennyvízben talált törzsek esetleg a klinikailag tünetszegény esetekből kerülnek ki. A többi típus egyéb európai, illetve afrikai és közép-amerikai szekvenciákkal mutatott hasonlóságot. További vizsgálatok szükségesek ezen törzseknél a valódi genetikai kapcsolat megállapításához.

A calicivírusok német, holland és svéd törzsekkel mutattak rokonságot,

ugyanakkor a szennyvízben talált vírusok a referencia szekvenciáktól külön rendeződtek. Így további vizsgálatokat igényel a valódi genetikai kapcsolat feltárása.

Eredményeim alapján az egyes vírusok *évszakos eloszlása* nem minden esetben felelt meg a klinikai minták elemzése során általánosan elfogadott halmozódásnak. A calicivírus-fertőzések előfordulásának csúcsát klinikai minták vizsgálata alapján a téli-tavaszi hónapokra teszik, ezzel szemben szennyvízben semmilyen eloszlási mintázatot nem mutattak. Például amíg 2005. nyarán egyetlen mintából sem sikerült calicivírusokat kimutatni, addig 2006. nyári hónapjaiban a minták 60%-ában jelen voltak (20. ábra). Ugyanakkor, ha a calicivírusok szennyvízminták vizsgálatából kapott évszakos eloszlását a Magyarországon norovírusok által okozott járványok előfordulásával vetjük össze, egyezést tapasztalunk. A hazai calicivírus-járványok száma 2006-ban 2,5-szer magasabb volt a 2005. évihez képest. 2005. és 2006. téli hónapjaiban a norovírus-járványok száma nem mutatott jelentős különbséget (62 és 68 epidémia), ám 2006. tavaszán a járványok száma megduplázódott a 2005. tavaszi hónapjaiban észleltekhöz képest, majd 2006-ban nyáron és ősszel megnégyszereződött az előző évhez képest. Ennek egyik felelőse a 2006. júniusában Miskolcon kitört, 3600 embert érintő ivóvíz eredetű calicivírus járvány volt. Júniust követően Borsod-Abaúj-Zemplén megyében megnőtt a norovírus által okozott fertőzések száma. A megnövekedett aktivitás ezután a szomszédos területeken, majd Magyarország középső, északi és nyugati területén is éreztette hatását (Krisztalovics és mtsai., 2006). Mindez az eloszlás Baranya megye szennyvízeiben is nyomon követhető. A szennyvízben való előfordulás tehát végső soron megfelel a kórházi előfordulásnak.

A HAstV és HRV szennyvízben való jelenléte viszont jól tükrözi a klinikai adatok alapján elfogadott évszakos eloszlásukat. Klinikai minták vizsgálatából megállapították, hogy az astrovírus-fertőzések csúcsa a mérsékelt égövben a hidegebb, téli hónapokra esik. Vizsgált mintáimban a vírus a klinikai esethalmozódás utáni időszakban érte el előfordulásának tetőpontját, vagyis a fertőzések kapcsán megnövekvő vírusürítés után jelentősen megnőtt ezeknek a vírusoknak a szennyvízben való előfordulása. A vizsgált telepek szennyvízeiben a tanulmányozott két év ezt követő szakaszaiban a HAstV előfordulás csökkent, de az év minden szakában kimutatható volt (20. ábra). Hasonló mintázat figyelhető meg a HRV-A évszakos eloszlásában. A február-márciusi kórházi esethalmozódás után a szennyvízben is megnőtt a HRV-A előfordulása. Hasonlóképpen

az adenovírus is jól tükrözi az irodalomban közölt szezonális jellemzőket, és a vizsgált két évben minden évszakban általánosan cirkulált. A C csoportú rotavírusok előfordulása volt a legáltalánosabb, de sem a humán, sem az egyes állati törzsek nem mutattak évszakos eloszlást. Állati C csoportú rotavírusok 2005-ben az „A” telepen leginkább a vizsgált időszak utolsó 5 hónapjában cirkuláltak. A „B”, „C” és „D” telep szennyvízeiben mindkét vizsgált évben előfordultak állati típusok, sőt 2006-ban humán törzseket nem is sikerült azonosítani. Ráadásul az A csoportú rotavírusok esetén is kimutathatók voltak állati eredetű vírustörzsek. Ugyanakkor a vizsgált területen állattartó telepek nem találhatók. Érdemes tehát végiggondolni, hogyan kerülhettek mégis *állati törzsek* a kommunális szennyvízbe. Ennek egyik feltételezhető oka, hogy az „A” telepre naponta befolyó átlagosan 27000 m<sup>3</sup> szennyvízből körülbelül 300 m<sup>3</sup> egy vágóhidről érkezik. A többi telepen háztáji sertés- és szarvasmarhatartás járulhat hozzá a kommunális szennyvízben talált magas állati vírusszámhoz. A „B” szennyvíztelepen dolgozó szakemberek elmondása alapján jutott tudomásomra, hogy sokszor az állati folyékony trágyát a gazdák törvénytellenesen a kommunális szennyvízbe bocsátják. Mindazonáltal kérdéses, hogy az illegálisan a szennyvízbe vezetett állati ürülék valóban hozzájárult-e az állati törzsek ilyen mértékű jelenlétéhez. A jelenség egy másik lehetséges magyarázata, hogy az állati törzsek humán fertőzésekért is felelőssé tehetőek (zoonózis). Klinikai minták vizsgálatai alapján az 5 év alatti korosztály körében meglehetősen alacsony a C csoportú rotavírusok előfordulása (0,6-3%) (Bányai és mtsai., 2006; Castello és mtsai., 2002; Sanchez-Fauquier és mtsai., 2003; von Bonsdorff és Svensson, 1988). Ezzel szemben 5 éves korra a gyermekek 20-30%-a rendelkezik RV-C elleni antitestekkel (James és mtsai., 1997; Steele és James, 1999; Kuzuya és mtsai., 2001). Iturizza-Gomara és mtsai. (2004) beszámolnak arról, hogy a falvakban élő gyermekek között jóval magasabb a RV-C elleni antitestekkel rendelkezők aránya, és feltételezik, hogy ehhez hozzájárul az állati törzseknek való kitettség miatt megnövekedett kockázat. Mégis valószínűbbnek látszik, hogy a gyermekkori RV-C fertőzések kevésbé súlyosak, vagy akár tünetmentesek is lehetnek, amelyek így nem igényelnek orvosi ellátást. A humán székletmintákból izolált RV-C törzsek monofilétikus leszármazásúak, tehát szigorú gazdaspecificitást mutatnak. Kérdéses tehát, hogy a feltételezett tünetmentes fertőzésekért kizárólag humán törzsek tehetőek-e felelőssé, vagy állati vírusok is szerepet játszanak benne. Ezért az A és C

csoporthú rotavírusok szennyvízben való előfordulásának további vizsgálata és klinikai minták együttes elemzése szükséges ahhoz, hogy a zoonózis lehetőségét egyértelműen igazolni lehessen.

Számos tanulmányban foglalkoztak már azzal, hogy a szennyvízben lévő *fekális koliformok száma és a vírusok jelenléte közötti lehetséges összefüggéseket* feltárják (Grabow és mtsai., 2001). Több kutatócsoport is rávilágított már arra, hogy vizsgálataik semmilyen összefüggést nem igazoltak a fekális indikátorszervezetek száma és a vírusok előfordulása között (Pina és mtsai., 1998; Puig és mtsai., 1994, Taylor és mtsai.; 2001; Sobsey, 1989). Eredményeim is azt támasztják alá, hogy a vírusok jelenléte és jelenleg a fekális eredetű szennyezés indikátoraiként elfogadott fekális koliformok száma között nincs összefüggés. Vagyis, ha például a kezelés hatására sikerült is az indikátor-baktériumokat eliminálni, attól a tisztított mintában még lehetett vírusokat kimutatni. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy az általam vizsgált minták csupán 7%-át vetették alá bakteriális analízisnek, tehát a kapott eredmény az adott időszakra nézve nem reprezentatív. Mégis vizsgálataim egyik legfontosabb felismerése az, hogy a rutin vízminősítéssel kifogásmentesnek ítélt vizek is tartalmazhatnak enterális vírusokat, így célszerű és időszerű lenne a jelenlegi indikátor mikroorganizmusokon alapuló vízminősítési direktívák újragondolása. Érdeemes lenne megfontolni az adenovírus kimutatás jövőbeni alkalmazását a virális szennyezés jelzésére, hiszen a „hagyományos” PCR-rel is a minták igen magas hányadában (~91%) és minden időszakban sikerült az adenovírusokat kimutatni, ráadásul ellenállónak bizonyultak a tisztítási folyamatokkal szemben is. Hasonló következtetésre jutottak pl. Puig és mtsai. szennyvizekkel és folyók vizével (1994), illetve Pina és mtsai. (1998) szennyvizekkel, folyók vizével, tengervízzel és kagylókkal folytatott vizsgálataik során.

A dolgozatban leírt eredmények alátámasztják azt a széles körben elterjedt nézetet, miszerint a napjainkban is alkalmazott *szennyvízkezelési és fertőtlenítési eljárások* nem eléggé hatásosak a vírusok elpusztítására. Bár a HAstV-ok, HRV-A-ok, HuCV-ok, HAdV-ok esetében a szennyvíztisztítás hatékonysága nem volt egyértelműen megállapítható az ellentmondásos mintapárok miatt, ráadásul a nyers és a tisztított vízminták víruspozitivitásának összevetésével csupán minőségi, a PCR sávok intenzitása alapján csak szemikvantitatív összehasonlítás végezhető. Mindazonáltal az eredmények alapján a tisztított minták is bővelkedtek vírusokban. Német és francia

kutatók arról számoltak be humán astrovírusokkal folytatott kísérleteikben, hogy a szennyvízkezelés hatására bekövetkező vírusszám degradáció meghaladja a 99%-ot (Pusch és mtsai., 2005; Le Cann és mtsai., 2004), és van den Berg és mtsai. (2005) is ugyanezt az értéket kapták calicivírusok vizsgálata során. C csoportú rotavírusok vizsgálatánál a nyers és tisztított minták víruskópiaszámának mennyiségi összehasonlítása is lehetővé vált, így a kezelés határfoka már vizsgálható volt. A baktériumszám csökkenést meg sem közelíti a vírusok számának csökkenése. Ugyanakkor a már említett tenyésztési kísérletek elvégzése a jövőben információt adhat a kezelési technikák vírusokra kifejtett hatásáról is, hiszen fennáll annak lehetősége, hogy az elfolyó szennyvízből kimutatott vírusok már elveszítették fertőzőképességüket, s a virális nukleinsav csupán nem-infektív vírus részecskékké zárva volt jelen a mintában. Monpoeho és mtsai. (2000) enterovírusokkal folytatott vizsgálataik során ugyanakkor megállapították, hogy átlagosan 150 genom kópiaszámra jut egy infektív víruspartikulum. Ha ezt az értéket a C csoportú rotavírusokra is érvényesnek tekintjük, akkor 1 liter tisztított mintában átlagosan 476 fertőző víruspartikulum volt jelen. (Mivel a vírusok kópiaszámának szórása meglehetősen nagy volt  $/10^3-10^7$  kópia literenként/, ezért a két legkisebb és legnagyobb értéket a számításnál figyelmen kívül hagytam.)

A jövőben egy – a C csoportú rotavírusok kimutatásánál már sikeresen alkalmazott – kvantifikálási valós idejű PCR módszer alkalmazása lenne célravezető minden egyes vírusnál, amellyel a vírusok nemcsak minőségi, hanem mennyiségi meghatározása is lehetővé válna. A hagyományos PCR real-time PCR eljárással való „felváltása”, illetve kiegészítése új lendületet adna a hazai környezeti virológiai kutatásoknak. Pontosabb és megbízhatóbb eredményeket kaphatnánk a szennyvízben lévő vírusok előfordulásáról, szezonálisáról, mennyiségéről, a szennyvízkezeléssel szembeni érzékenységükről (a szennyvíztisztítás hatékonyságáról), hiszen a valós idejű PCR nagyságrendekkel érzékenyebb nemcsak az eddigi gyakorlatban alkalmazott PCR-nél, hanem annak nested változatánál is, lehetővé téve az adott térfogatú mintában lévő vírusok mennyiségének pontos meghatározását is.

Eredményeim alátámasztják azt a feltételezést, hogy a szennyvizek virológiai vizsgálatának komoly *közegészségügyi jelentősége* van, különösen akkor, ha az elfolyó szennyvízzel az emberek bármilyen későbbi tevékenység folytán (pl. sportolás, pihenés) érintkezhetnek. Ezért az ilyen vizsgálatokat a jövőben felszíni vizekre is ki kell

terjeszteni. A fertőzőképességet igazolni kell, továbbá mennyiségi vizsgálatokat is kell végezni, hogy a valódi népegészségügyi kockázatra fény derüljön. Az alapos, molekuláris módszereken alapuló vírusszám meghatározás drága standardizációs eljárásokat és nagymennyiségű vízminta elemzését kívánja. Dolgozatom fő célja azonban nem a vírusok kópiaszámának mennyiségi meghatározása volt, és főleg nem felszíni vízből vagy ivóvízből, így vizsgálataimban egyelőre nem is léptem tovább ebbe az irányba. Mégis el kell gondolkodni az ilyen vizsgálatok fontosságán, és azokon az eredményeken, amelyeket Pusch és mtsai. (2005) kaptak, amikor egy szennyvíztelep befolyó és elfolyó szennyvizét vetették vírusvizsgálat alá. Az általuk tanulmányozott szennyvíztelep elfolyó szennyvize egy folyóba került, majd onnan egy csővezetékkel egy tóba ömlött. Vizsgálataikkal a teleptől ~20 km-re lévő tóból is sikerült kimutatniuk enterovírusokat (29%), astrovírusokat (24%;  $3,7 \times 10^3$  kópia/l), calicivírusokat (18%;  $1,8 \times 10^4$  kópia/l), rotavírusokat (11%) és hepatitis-A vírusokat (5%).

Láthattuk tehát, hogy a vírusok könnyen túlélhetik a szokásos vízkezelési eljárásokat, különösen akkor, ha esetlegesen fellépő műszaki hibák vagy a technológiai figyelem hiánya rontja a kezeléseket hatásfokát. Mivel azonban a világ számos részén a populáció és az ipar robbanásszerű növekedése miatt a szóba jöhető vízforrásokkal szemben fokozott igény lép fel, amit távlatilag csak a kommunális szennyvizek újrahasznosításával lehet enyhíteni, egyre növekszik az igény az olyan módszerek kidolgozására, amelyekkel biztosan eliminálni lehet vizeinkből az emberre veszélyt jelentő vírusokat is. Azonban a vírusok vízből való eltávolításával kapcsolatban több nehézség is felmerül. Az elimináló módszereket két csoportra oszthatjuk: 1. a vírusok fizikai eltávolítása (szedimentáció, adszorpció, koaguláció és precipitáció, szűrés), és 2. a vírusok inaktiválása, destrukciója (pH növelése, kémiai oxidálás /pl. halogénekkal/, fotooxidálás bizonyos festékekkel, fénnel).

Közegészségügyi szempontból az inaktivációt előidéző módszereket részesítik előnyben. A kezeléseket során azonban több tényezőre kell figyelemmel lenni. A szennyvizek vírustartalma napi megoszlásban is igen különböző lehet (Rolland és mtsai., 1983). Ezért a kívánt kezelés „erősségét” nehéz beállítani.

Az előkezelések (pl. az ülepítés) nem vagy alig távolítják el a vírusokat, legfeljebb a szilárd részecskékhez kötődött partikulumok azokkal együtt leülepednek (ugyanakkor, pl. a rotavírusok csak gyengén kötődnek az ülepíthető részecskékhez, és így

benmaradnak a felszíni rétegekben is; Melnick és mtsai., 1978).

Megfelelően megválasztott körülmények között a vírusok meglehetősen sokféle felszínhez kötődhetnek (pl. aktivált szén, kovaföld, szén, üveg, membránfilterek, kolloidális szerves anyagok, talaj). Ez a kötődés reverzibilis, az ionerősség, a pH, különböző szerves anyagok jelenléte elúciót eredményezhet. Például a homokkal végzett szűrés esetén sem a homok maga, hanem sokkal inkább a homok által befogott anyagok kötik meg a vírusokat.

A legjobb vírusszám redukción a szennyvíz fizikai-kémiai kezelése idézi elő. Koagulációval a vírusok jól eltávolíthatók, és fertőtlenítéssel együtt alkalmazva ez a módszer bizonyult a leghatásosabbak egyikének. Alumínium szulfát, kalcium-hidroxid, vassók, polielektrolitok akár 99,9%-ban eltávolíthatják a vízben lévő vírusokat. Arról azonban keveset tudunk, hogy a klórozás hogyan képes inaktiválni a vírusokat. A klorináció hatása nagyon sok tényezőtől függ, pl. a hőmérséklettől, a pH-tól, a szerves anyagok jelenlététől, a vírus fizikai állapotától (adszorbeált, aggregálódott). A klór 8 mg/l koncentrációban alkalmazva szennyvízben nem csökkenti a legtöbb vírus számát, azonban 40 mg/l koncentrációban 10 perc alatt már 99,9%-os vírusszám redukción eredményez. A klór ekkora dózisa azonban már erősen toxikus. A különböző vírusok ráadásul eltérő mértékben érzékenyek a klórra; az adszorbeálódott vagy aggregálódott vírusok különösen ellenállóak. Ismeretesek klórral szemben rezisztens enterális vírusok is. Mivel rendkívül ellenállóak a hagyományos klórral történő fertőtlenítéssel szemben, a calicivírusokat számos vízeredetű járványban azonosítják kórokozóként. Keswick és mtsai. (1985) kimutatták, hogy a klór azon koncentrációja, amely hatékonyan inaktivál számos vírust, a calicivírussal szemben hatástalan. A vizek fertőtlenítésénél több telepen ózont is alkalmaznak (Burlleson és mtsai., 1975; Sommer és mtsai., 2004; Wang és mtsai., 2005), azonban ennek vírusölő hatásáról még manapság is keveset tudunk (Wang és mtsai., 2005). Számos tanulmány szerint a hagyományos szennyvíztisztítási eljárások UV sugárzással vagy ózonos kezeléssel való kiegészítése hatékony módszer lehet a vírusok számának csökkentésére (Gehr és mtsai., 2003; Jacangelo és mtsai., 2003).

Szem előtt kell tartanunk, hogy bár a felszíni vizekbe a vírusok már erőteljesen felhígulva kerülnek, és itt még tovább hígulnak, ráadásul számtalan inaktiváló tényezőnek vannak kitéve, mégis ezen vizek minden fajtája veszélyes lehet az emberre

nézve; a folyók, tavak vírusokkal kontaminált vizének széleskörű felhasználása miatt (pihenés, sportolás) könnyen fertőzés forrásává válhatnak, és jelentős járványokat idézhetnek elő. Különösen nagy veszélyt rejt magában a felszíni vízből előállított ivóvizek, vagy a parti szűrésű kutak vizének virális szennyezése. Mivel ivóvíz-minőségű vizet használunk közvetlen fogyasztásra, főzésre, mosásra, fürdésre, stb., ezért az sem fertőző, sem szennyezett nem lehet. Így általános közegészségügyi igényként jelenik meg, hogy a víztisztítás hatékonyságának mérését, valamint az ivóvíz minőségének folyamatos ellenőrzését kiterjesszék a vírusokra is.

Sajnos ma még világviszonylatban is kevés azon laboratóriumok száma, amelyek képesek a vizekből történő víruskimutatásra. Jelenleg hazánkban sem bevett gyakorlat a vizek vírusokra történő vizsgálata, pedig Magyarországon is egyre nő a vízforrások terhelése, a kezelt szennyvizek újrahasznosítása, a szennyvízzel kezelt mezőgazdasági területek aránya. Azonban a legszembetűnőbb a virológiai lehetőségek elmaradásának fokozódása. Amíg számos ország erőfeszítéseinek következtében a vírus-kimutatói módszerek ugrásszerű fejlődésnek indultak, s felvetették az ivóvízre vonatkozó vízminősítési mutatók újragondolását, korszerűsítését, továbbá elősegítették, hogy a világ több részén is támogatást kapott az ivóvizek virológiai ellenőrzése, (<http://nlquery.epa.gov/epasearch/epasearch>) addig itthon a korábbi kecsesítő vizsgálatokat újabbak évtizedekig nem követték.

Több országban (pl. USA, Kanada) szerepelnek már a vízminősítő előírásokban a virológiai vizsgálatok is. 1974 óta, amikor a vízvirológusok először találkoztak Mexico Cityben, nemzetközi szinten sok erőfeszítés történt. Azonban a kutatók még mindig óvakodnak a vírus-kimutatói eljárások és a vírusokra vonatkozó határértékek szabványban rögzítésétől. Nem szabad azonban megfelelni a virológiai standardok felállításáról. Ennek elősegítésére módszereinket állandóan fejlesztenünk, optimalizálnunk, lehetőségeinket növelnünk kell, és törekednünk kell arra, hogy környezetünk vizeinek virológiai ellenőrzését, az adatok gyűjtését, vízkezelési módszereink hatékonyságát nyomon kövessük.

Magyarországon az elmúlt néhány évben csupán az ÁNTSZ Baranya Megyei Intézetének Regionális Virológiai Laboratóriumában történtek erőfeszítések a hazai vízvirológia felélesztésére, és születtek új, mind a hazai, mind a nemzetközi szakemberek figyelmére számottartó, publikált eredmények. Ennek a munkának a



háttérvizsgálatait, és elért sikereit ismertette ez a dolgozat.

## VII. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

Az ipari fejlődés, az urbanizáció folyamatos erősödése, valamint a mezőgazdaság nagymértékű kemizálása miatt egyre nagyobb népegészségügyi problémát jelent a vizek elszennyeződése. Az elmúlt közel 70 évben, mióta a vírusok vízből történő kimutatása elkezdődött, jelentős fejlődés valósult meg. Noha igen kiterjedt, több ezer főt érintő vízeredetű vírus-járványokat ismerünk, a vízben lévő vírusok által okozott fertőzések jelentős része mégis elenyésző tünetekkel jár, vagy éppen teljesen tünetmentes formában zajlik le, ezért nehéz felismerni az összefüggéseket, ráadásul a legtöbb helyen a vírusok kimutatására szolgáló módszerek sem állnak rendelkezésre. Tovább súlyosbítja a helyzetet, hogy a vírusok akár több hónapig is képesek megőrizni fertőzőképességüket a természetes vizekben. Ezért napjainkban egyre többet hallunk vírus okozta vízeredetű járványokról, miközben a bakteriális eredetűek száma relatíve csökken. Emiatt a vízben lévő vírusok közegészségügyi jelentőségének megállapítása további kiterjedt vizsgálatokat igényel.

Értekezésemben a Baranya megyei szennyvizekben lévő enterális vírusok előfordulásáról igyekeztem átfogó képet adni. Vizsgálataim teljesen úttörőek a magyarországi virológiai kutatások terén. Ezért valamennyi eredménynek új tudományos értéke van a hazai környezeti virológiában. A célkitűzések tükrében a következő új felismerések születtek:

- Magyarországon 20 év szünet után sikerült újraindítani a szennyvízből történő víruskimutatásokat.
- Egy ezelőtt ilyen formában még nem alkalmazott gyors, hatékony, megbízható koncentrálnálási és direkt molekuláris kimutatási módszert sikerült optimalizálni és bevezetni, amely a szennyvízből történő víruskimutatást lehetővé teszi.
- Hazánkban első alkalommal használtam molekuláris módszereket szennyvízből történő víruskimutatásra.
- Az ÁNTSZ Baranya Megyei Intézetébe érkező szennyvízminták rutin vízbakteriológiai és vízkémiai vizsgálatainak sorába sikerült a molekuláris virológiai vizsgálatokat bekapcsolni.
- Első alkalommal vizsgáltam Magyarországon nyers-tisztított szennyvízminta párokat.

- Vizsgálatom az első astrovírus, rotavírus, adenovírus és calicivírus kimutatás környezeti mintákból, amellyel a Baranya megyei populáció körében keringő enterális vírusok legkomplexebb vizsgálata valósult meg.
- Szennyvízvizsgálataim nyomán megállapítottam, hogy a kórházi előfordulásnál minden valószínűség szerint magasabb arányban vannak jelen az astro-, rota-, calici- és adenovírusok a vizsgált populációban. Ebből arra következtettem, hogy jelentős a tünetszegény, vagy tünetmentes fertőzések száma, tehát a hasmenéses esetek nem tükrözik a vizsgált vírusoknak a populációban betöltött valódi szerepét, s csupán a fertőzések bizonyos hányada észlelt az orvosok által.
- Megállapítottam, hogy a Baranya megyei populációban az adenovírusok cirkulálnak a legáltalánosabban, és mivel ezek a vírusok meglehetősen ellenállóak a környezeti behatásokkal szemben, ezért javasoltam a virális szennyezés jelzésére (vírusindikátorként) a jövőben a szennyvízminták adenovírus pozitivitásának alkalmazását.
- Első alkalommal vettem össze a vírus-pozitív minták számát a települések lélekszámával, amelynek eredményeként nem találtam gyakorisági összefüggést a kimutathatóság és az ellátott település nagysága között, ebből azt a következtetést vontam le, hogy a vizsgált vírusok a populációban általánosan cirkulálnak.
- A polimeráz láncreakciót gátló inhibitorok jelenlétének kimutatására egy belső virális nukleinsav kontrollt alkottam meg, amely az astrovírust is kimutató primer párral amplifikálható, de a termék az astrovírusokétól méret alapján elkülöníthető.
- A belső standardot tartalmazó minták egyike sem tartalmazott PCR-t gátló zavaró anyagokat, amellyel bebizonyítottam, hogy a víruskimutatásra optimalizált rendszer hatékonyan távolítja el az inhibitorokat a szennyvízmintákból.
- Vizsgálataimmal alátámasztottam, hogy a vírusok és jelenleg a fekális eredetű szennyezés indikátoraiként elfogadott fekális koliformok száma között nincs összefüggés. Bizonyítottam, hogy a vírusok jelentős része a koliform vagy más enteropatogén baktériumoknál ellenállóbb a víztisztítási eljárásokkal szemben.

Ezért a rutin vízminősítéssel kifogásmentesnek ítélt vizek is tartalmazhatnak enterális vírusokat.

- Bár a szennyvíztisztítási hatékonyság pontosan nem volt meghatározható, hiszen több mintapárnál csupán a tisztított minta bizonyult pozitívnak egy adott vírusra, mégis alátámasztottam azt a – külföldi irodalomban amúgy már közölt – megfigyelést, miszerint a mai szennyvízkezelési és fertőtlenítési eljárások hazánkban sem elég hatékonyak a vírusok szennyvízből való eltávolítására.
- Első alkalommal végeztem molekuláris módszerekkel mennyiségi vizsgálatokat, amelynek során az elfolyó mintákban lévő víruskópiaszámot is meghatároztam, továbbá megállapítottam, hogy a vizsgálatba bevont szennyvíztelepek vírusokra vonatkoztatott tisztítási hatékonysága olykor a 60%-ot sem éri el. Mivel a tisztított szennyvizek jelentős számban tartalmaztak még vírusokat, ezért felhívtam a figyelmet arra, hogy a vírustartalmú szennyvíz fontos népegészségügyi jelentőséggel bír. Vizsgálataim nyomán első alkalommal mondható ki, hogy a magyarországi szennyvizek is az enterális vírusfertőzések lehetséges forrásai lehetnek.
- Megállapítottam, hogy a szennyvizekben kimutatott vírustörzsek genotípusa eltér a klinikai mintákban talált törzsekétől. Ebből arra következtettem, hogy a szennyvízben talált törzsek talán a klinikailag tünetszegény esetekből kerülnek ki, vagy esetleg az egyéb típusoknál ellenállóbbak a különböző környezeti faktorokkal szemben.
- Megfigyeléseim alapján megállapítottam, hogy egyszerre több HAsV, RV-A, RV-C, illetve HuCV genotípus volt jelen a Baranya megyei lakosságban a vizsgált időszakban, ráadásul sikerült több mintában is egyidejűleg egy adott vírus 2 különböző genotípusát kimutatni.
- A hazánkban több mint 10 éves múltra visszatekintő astrovírus kutatások során először sikerült 2-es típusú astrovírust azonosítani. Ráadásul ezt az eddig csak környezeti mintákból azonosított típust a HAsV-pozitív minták közel 11%-ából mutattam ki.
- Megállapítottam, hogy a vizsgált vírusok szezonális eloszlása jól tükrözte a járványok, illetve a klinikai esetek számának halmozódását.
- Sikerült állati törzseket is azonosítanom, illetve hazánkban először vettem fel

a C csoportú rotavírusok esetében a zoonózis lehetséges szerepét a fertőzés terjedésében.

- Tanulmányom alapján kijelenthető, hogy a vizsgált vírusok endémiásan fordulnak elő Baranya megyében. (Ha a betegség eredete, az átvitel módja és a betegsége fogékony személyek száma révén a vírusok gyorsan replikálódhatnának, akkor a fertőzések járványos formát ölthetnének, és könnyen azonosítható, epidemiológiailag összefüggő, klinikailag manifesztálódó eseményeket eredményezhetnének.)
- A vírusok jelenlétének bizonyítása környezetünk vizeiben új fejezetet jelent mind az epidemiológiai intézkedések, mind a vízminősítési mutatók kidolgozásának szempontjából. Az a tény, hogy a humán patogén vírusok a vízben jelen vannak, és potenciális fertőző forrást jelentenek sem közegészségügyi, sem járványügyi szempontból nem hagyható figyelmen kívül.
- Eredményeimet hazai és nemzetközi fórumokon, tudományos közleményekben bemutattva igyekeztem információt szolgáltatni az egészségügyi és a környezetanalitikával foglalkozó szakemberek számára a hazai szennyvizek vírusokra is kiterjedő vizsgálatának fontosságáról.

## VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Szűcs György főorvos úrnak, hogy lehetőséget adott, és helyet biztosított számomra a laboratóriumi munkák elvégzésére, valamint szakmai és erkölcsi támogatásával segítette munkámat.

Külön köszönöm dr. Kocsis Béla docens úrnak a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézetéből a vízminták koncentráálásában nyújtott segítségét, értékes szakmai tanácsait, önzetlen emberi gesztusait, irántam tanúsított türelmét, szívélyességét, amelyekkel munkámat támogatta.

Köszönettel tartozom Gúth Istvánnak a vizsgálati minták gyűjtéséért, Szilas Erikának a vízkémiai és vízbakteriológiai adatok biztosításáért.

Köszönetemet fejezem ki dr. Jakab Ferencnek és dr. Bányai Krisztiánnak a munkálatokban nyújtott technikai segítségükért, a minták gyűjtésében való közreműködésükért, sokat érő szakmai tanácsaikért, támogatásukért, együttműködésükért.

Köszönöm dr. Reuter Gábornak a calicivírusok kimutatásában nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Melegh Bélának, Oksai Juditnak, Regős Juditnak és Kisfali Péternek a szekvenálási vizsgálatokban való segédkezésükért.

Köszönetemet fejezem ki az ÁNTSZ Víruslaboratórium valamennyi dolgozójának.

Végül, de nem utolsó sorban, hálával tartozom vőlegényemnek, családomnak, hogy végig kitartottak mellettem, buzdítottak, támogattak és biztosították azt a hátteret, amely e munka elvégzését, és az értekezés megírását lehetővé tette számomra.

## IX. Irodalomjegyzék

Abbaszadegan, M., Stewart, P., LeChevallier, M. (1999) A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 444-449.

Alvarez, A. J., Buttner, M. P., Toranzos, G. A., Dvorsky, E. A., Toro, A., Heikes, T. B., Mertikas-Pifer, L. E., Stetzenbach, L. D. (1994) Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 374-376.

Andrási, A. (1983) Vírusok kimutatása ivóvízből (irodalmi áttekintés). *Budapesti Közegészségügy* **4**, 115-118.

Baggi, F., Peduzzi, R. (2000) Genotyping of rotaviruses in environmental water and stool samples in Southern Switzerland by nucleotide sequence analysis of 189 base pairs at the 5' end of the VP7 gene. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3681-3685.

Bányai, K., Jiang, B., Bogdán, Á., Horváth, B., Jakab, F., Meleg, E., Martella, V., Magyar, L., Meleg, B., Szűcs, Gy. (2006) Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J. Clin. Virol.* **37**, 317-322.

Berencsi, Gy. (szerk.) (2005) Orvosi molekuláris virológia. Convention Budapest Kft. p. 168., 170.

Bergh, Ø., Børsheim, K. Y., Bratbak, G., Heldal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**, 467-468.

Beuret, C., Kohler, D., Luthi, T. (2000) Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *J. Food Prot.* **63**, 1576-1582.

Bitton, G. (1980) Introduction to environmental virology. A Wiley-Interscience Publication (John Wiley & Sons, New York).

Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R. (2000) Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 238-245.

- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.Clin. Microbiol.* **28**, 495-503.
- Burleson, G. R., Murray, T. M., Pollard, M. (1975) Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Microbiol.* **29**, 340-344.
- Castello, A. A., Arguelles, M. H., Villegas, G. A., Olthoff, A., Glikmann, G. (2002) Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. *J. Med. Virol.* **67**, 106-112.
- Csuros, M., Csuros, Cs. (1999) Microbiological examination of water and wastewater. Lewis Publishers, Boca Raton: CRC Press.
- Dalldorf, G., Sickles, G. M. (1948) An unidentified, filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* **108**, 61-62.
- Dániel, M., Dömök, I. (1962) Szennyvízminták virológiai vizsgálata attenuált poliovírusokkal végzett védőoltások időszakában. *Orv. Hetilap* **103**, 1735-1739.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. (szerk.) (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater. (19<sup>th</sup> ed.) pp 9.87-9.102. American Public Health Association Washington, D.C.
- Fout, G. S., Martinson, B. C., Moyer, M. W., Dahling, D. R. (2003) A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3158-3164.
- Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P., Payment, P. (2003) Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Res.* **37**, 4573-4586.
- Gilgen, M., Germann, D., Lüthy, J., Hübner, Ph. (1997) Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 189-199.



Girones, R. (2006) Tracking viruses that contaminate environments. *Microbe* **1**, 19-25.  
[ <http://www.asm.org/ASM/files/ccLibraryFiles/Filename/000000002024/znw00106000019.pdf> ]

Grabow, W. O. K., Taylor, M. B., de Villiers, J. C. (2001) New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci. Technol.* **43**, 1-8.

Griffin, D. W., Donaldson, K. A., Paul, J. H., Rose, J. B. (2003) Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 129-143.

Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolomé, R., Lattore, C., Rabella, N., Simó, M., Bosch, A., Pintó, R. M. (2002) Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 133-139.

<http://nlquery.epa.gov/epasearch/epasearch>

[http://www.kvvm.hu/dokumentum.php?content\\_id=1236&section\\_id=0](http://www.kvvm.hu/dokumentum.php?content_id=1236&section_id=0)

<http://www.nlv.ch/Rotavirus/Rotafactsheet.htm>

[http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNAreo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAreo.html)

[http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNAastro.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAastro.html)

[http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNacalici.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNacalici.html)

Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. (2002) *Manual of Environmental Microbiology* (2<sup>nd</sup> ed.), 182 ASM Press, Washington, USA.

Iturriza-Gomara, M., Clarke, I., Desselberger, U., Brown, D., Thomas, D., Gray, J. (2004) Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales. *Eur. J. Epidemiol.* **19**, 589-595.

Jacangelo, J. G., Loughran, P., Petrik, B., Simpson, D., McIlroy, C. (2003) Removal of enteric viruses and selected microbial indicators by UV irradiation of secondary

effluent. *Water Sci. Technol.* **47**, 193-198.

Jakab, F., Meleg, E., Bányai, K., Melegh, B., Tímár, L., Péterfai, J., Szűcs, Gy. (2004) One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: occurrence and genetic analysis of astroviruses. *J. Med. Virol.* **74**, 71-77.

James, V. L. A., Lambden, P. R., Caul, E. O., Cooke, S. J., Clarke, I. N. (1997) Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. *J. Med. Virol.* **52**, 86–91.

Jothikumar, N., Khanna, P., Paulmurugan, R., Kamatchiammal, S., Padmanabhan, P. (1995) A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **55**, 401-415.

Keswick, B. H., Satterwhite, T. K., Johnson P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W., Hoff, J. C. (1985) Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 261-264.

Krisztalovics, K., Reuter, G., Szűcs Gy., Csohán, Á., Böröcz, K. (2006) Increase in norovirus circulation in Hungary in October-November 2006. *Euro. Surveill.* **11**, E061214.2, [ <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/061214.asp#2> ].

Kukkula, M., Arstila, P., Klossner, M. L., Maunula, L., Bonsdorff, C. H., Jaatinen, P. (1997) Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand. J. Infect. Dis.* **29**, 415-418.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.

Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H., Yamada, M. (2001) Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 161-165.

Lawson, H. W., Braun, M. M., Glass, R. I., Stine, S. E., Monroe, S. S., Atrash, J. K., Lee, L. E., Englander, S. J. (1991) Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a Southwest U.S. resort: role of geological formations in the

contamination of well water. *Lancet* **337**, 1200-1204.

Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F., Ferré V. (2004) Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res. In Microbiol.* **155**, 11-15.

Lee, T. W., Kurtz, J. B. (1994) Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* **112**, 187-193.

Limsawat, S., Ohgaki, S. (1997) Fate of liberated viral RNA in wastewater determined by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2932-2933.

Liu, C. Y., Shen, K. L., Wang, S. X., Liu, Y. Y., Zhaori, G. T. (2004) Astrovirus infection in young children with diarrhea hospitalized at Beijing Children's Hospital. *Chin. Med. J. (Engl.)* **117**, 353-356.

Lodder, W. J., Vinjé, J., van de Heide, R., de Roda Husman, A. M., Leenen, E. J. T. M., Koopmans, M. P. G. (1999) Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5624-5627.

Marx, F. E., Taylor, M. B., Grabow, W. O. K. (1997) A comparison of two sets of primers for the RT-PCR detection of astroviruses in environmental samples. *Water SA* **23**, 257-261.

Mehnert, D. U., Stewien, K. E. (1993) Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 140-143.

Melnick, J. L., Gerba, C. P., Wallis, C. (1978) Viruses in water. *Bull. WHO* **56**, 499-508.

Meng, Z. D., Birch, C., Heath, R., Gust, I. (1987) Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol.* **53**, 727-730.

Minor, P. D. (1985) Growth, assay and purification of Picornaviruses. In *Virology: A Practical Approach*, (szerk.) Mahy, B. W. J. pp. 25-41 IRL Press Ltd., Oxford.

Monpoeho, S., Dehee, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J. C.,

- Billaudel, S., Ferre, V. (2000) Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* **29**, 88-93.
- Myint, S., Manley, R., Cubitt, D. (1994) Viruses in bathing water. *Lancet* **343**, 1640-1641.
- Nadan, S., Walter, J. E., Grabow, W. O. K., Mitchell, D. K., Taylor, M. B. (2003) Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 747-753.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., Deerfield, D. W. I. (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNET News* **4**, 1-4.
- Noel, J. S., Lee, T. W., Kurtz, J. B., Glass, R. I., Monroe, S. S. (1995) Typing of astoviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 797-801.
- Pálfí, Á., Simon, M., Schulek E. (1970) Budapesti szennyvizek virológiai vizsgálata II. Vírusizolálási kísérletek szennyvízből. *Egészségtudomány* **14**, 127-132.
- Palombo, E. A., Bishop, R. F. (1996) Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1750-1753.
- Paul, J. R., Trask, J. D. (1941) The virus of poliomyelitis in stools and sewage. *JAMA* **116**, 493-497.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R. (1998) Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3376-3382.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., Girones, R. (1994) Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2963-2970.

- Pusch, D., Oh, D-Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I., Schreier, E. (2005) Detection of enteric viruses and bacterial indicators in german environmental waters. *Arch. Virol.* **150**, 929-947.
- Rao, V. C., Melnick, J. L. (1986) Environmental Virology, pp. 10-17 *Van Nostran Reinhold (UK) Co. Ltd., Wokingham.*
- Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., Szűcs, Gy. (2005) Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks – emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *J. Med. Virol.* **76**, 598-607.
- Rolland, D., Joret, J. C., Villeval, F., Block, J. C., Hartemann, P. (1983) Sampling strategy for detecting viruses in a sewage treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1767-1774.
- Rylander, R. (1999) Health effects among workers in sewage treatment plants. *Occup. Environ. Med.* **56**, 354-357.
- Sakamoto, T., Negishi, H., Wang, Q. H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., Kaneshi, K., Nakaya, S., Ueda, Y., Sugita, K., Motohiro, T., Nishimura, T., Ushijima, H. (2000) Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J. Med. Virol.* **61**, 326-331.
- Sanchez-Fauquier, A., Roman, E., Colomina, J., Wilhelmi, I., Glass, R. I., Jiang, B. (2003) First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch. Virol.* **148**, 399-404.
- Seidel, K. (1983) Communicable disease problems of sewage with special reference to human pathogenic viruses. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg., 1. Abt. Orig. B.*, **178**, 98-110.
- Sidhu, M. K., Liao, M. J., Rashidbaigi, A. (1996) Dimethyl sulfoxide improves RNA amplification. *Biotechniques* **21**, 44-47.
- Simmons, G., Greening, G., Gao, W., Campbell, D. (2001) Raw oyster consumption

and outbreaks of viral gastroenteritis in New Zealand: evidence for risk to the public's health. *Aust. N. Z. J. Public Health* **25**, 234-240.

Simon, M., Pálfi, Á. (1970) Budapesti szennyvizek virológiai vizsgálata I. Víruskoncentráció kalciumfoszfát adszorbenssel vízminták vírustartalmának vizsgálatára. *Egészségtudomány* **14**, 13-18.

Smith, J. L. (2001) A review of hepatitis E virus. *J. Food Prot.* **64**, 572-586.

Sobsey, M. D. (1989) Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Sci. Technol.* **21**, 179-195.

Sommer, R., Pribil, W., Pflieger, S., Haider, T., Werderitsch, M., Gehringer, P. (2004) Microbicidal efficacy of an advanced oxidation process using ozone/hydrogen peroxide in water treatment. *Water Sci. Technol.* **50**, 159-164.

Steele, A. D., James, V. L. A. (1999) Seroepidemiology of human group C rotavirus in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 4142-4144.

Stewart, P. L., Burnett, R. M. (1995) Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 25-38.

Taylor, M. B., Cox, N., Vrey, M. A., Grabow, W. O. K. (2001) The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Res.* **35**, 2653-2660.

Tsai, Y-L., Olson, B. H. (1992a) Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 754-757.

Tsai, Y-L., Olson B. H. (1992b) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2292-2295.

Tsai, Y-L., Tran, B., Sangermano, L. R., Palmer, C. J. (1994) Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2400-2407.

van den Berg, H., Lodder, W., van der Poel, W., Vennema, H., de Roda Husman, A. M. (2005) Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res. Microbiol.* **156**, 532-540.

von Bonsdorff, C. H., Svensson, L. (1988) Human serogroup C rotavirus in Finland. *Scand. J. Infect. Dis.* **20**, 475-478.

Walter, J. E., Mitchell, D. K., Guerrero, M. L., Berke, T., Matson, D. O., Monroe, S. S., Pickering, L. K., Ruiz-Palacios, G. (2001) Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J. Infect. Dis.* **183**, 681-686.

Wang, X. C., Qiu F. G., Xue, X. P., Lu, X. (2005) Application of a virological tracer method for the assessment of pathogen removal by physicochemical treatment and chemical disinfection. *Water Sci. Technol.* **52**, 205-212.

WHO (1997) Health and Environment in Sustainable Development: Five years after the Earth Summit. Geneva: WHO, WHO/EHG/07.8

Wilson, I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3741-3751.

**FÜGGELÉK 1. – előadások, előadás kivonatok és publikációk**



### ***Előadások, poszterek***

1. **Meleg, E.**, Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Humán astrovírusok első kimutatása szennyvízmintákból Magyarországon. (*Előadás, Semmelweis Egyetem Doktori Iskola PhD Tudományos Napok 2005, április; Budapest*)
2. **Meleg, E.**, Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Humán astrovírusok első kimutatása nyers szennyvízből Magyarországon. (*Előadás, Népegészségügyi Tudományos Társaság XV. Nagygyűlése 2006; Siófok*)
3. **Meleg, E.**, Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Bogdán, Á., Szűcs, Gy.: Baranya megyei szennyvizek virológiai vizsgálata. (*Előadás, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése, 2006. október; Keszthely*)
4. **Meleg, E.**, Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: First detection of human astroviruses in raw sewage samples in Baranya County, Hungary. (*Poszter, 1st Central European Forum for Microbiology, 2005, október; Keszthely*)
5. Bogdán, Á., Bányai, K., Jakab, F., **Meleg, E.**, Martella, V., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Humán C csoportú rotavírusok kimutatása és molekuláris jellemzése Baranya megyében (*Poszter, Népegészségügyi Tudományos Társaság XV. Nagygyűlése 2006; Siófok*)
6. **Meleg, E.**, Bányai, K., Jakab, F., Kocsis, B., Bogdán, Á., Melegh, B., Szűcs, Gy.: C csoportú rotavírusok kimutatása szennyvízből real-time PCR módszerrel Baranya megyében. (*Poszter, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése, 2006. október; Keszthely*)
7. **Meleg, E.**, Bányai, K., Szűcs, Gy.: Detection of human, porcine and bovine group C rotaviruses in the communal sewage: zoonosis or contamination? (*Poszter, II. DIVINE EVENT Meeting, 2006. szeptember; Róma*)

### ***Közlemények, absztraktok***

**Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: First Detection of Human Astroviruses in Raw Sewage Samples in Baranya County, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2005, **52(Suppl)**, 95. (*absztrakt*)

**Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy.: First Detection of Human Astroviruses in Raw Sewage Samples in Baranya County, Hungary. *Clinical Microbiology and Infection* 2006, **12 (Suppl 4): R2209**, 112. (*absztrakt*)

**Meleg, E.,** Bányai, K., Jakab, F., Kocsis, B., Bogdán, Á., Szűcs, Gy.: Detection of group C rotaviruses by real-time PCR in sewage samples in Baranya County, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2006, **53(3)**, 316-317. (*absztrakt*)

**Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Bogdán, Á., Melegh, B., Szűcs, Gy.: Viral examination of sewage samples in Baranya County, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2006, **53(3)**, 315-316. (*absztrakt*)

**Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy. (2005) Humán astrovírusok első kimutatása nyers szennyvízből Magyarországon. *Egészségtudomány* **49**, 318-327. (*publikáció*)

**Meleg, E.,** Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szűcs, Gy. (2006) Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 1123-1129. (*publikáció*) **IF: 2,127**

Jakab, F., **Meleg, E.,** Bányai, K., Melegh, B., Tímár, L., Péterfai, J., Szűcs, Gy. (2004) One year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary - Occurance and genetic analysis of astroviruses. *Journal of Medical Virology* **74**, 71-77. (*publikáció*) **IF: 2,52**

Bányai, K., Gentsch, J. R., Schipp, R., Jakab, F., **Meleg, E.,** Mihály I., Szűcs, Gy. (2005) Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *Journal of Medical Virology* **76**, 414-423. (*publikáció*) **IF: 2,52**

Jakab, F., Péterfai, J., **Meleg, E.,** Bányai, K., Mitchell, D. K., Szűcs, Gy. (2005)

Comparison of clinical characteristics between astrovirus and rotavirus infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. *Acta Paediatrica* **94**, 667-671. (publikáció)

**IF: 1,277**

Jakab, F., Péterfai, J., Verebély, T., **Meleg, E.**, Bányai, K., Mitchell, D. K., Szűcs, Gy. (2007) Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. *Pediatrics International* **49**, 103-105. (publikáció) **IF: 0,666**

Bányai, K., Jiang, B., Bogdán, Á., Horváth, B., Jakab, F., **Meleg, E.**, Martella, V., Magyarai, L., Melegh, B., Szűcs, Gy. (2006) Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *Journal of Clinical Virology*, **37**, 317-322. (publikáció) **IF: 2,623**

**Meleg, E.**, Bányai, K., Martella, V., Jiang, B., Kocsis, B., Kisfali, P., Melegh, B., Szűcs, Gy. Detection and quantification of group C rotaviruses in the communal sewage. (közlésre benyújtva)

**Összesített impakt faktor: 11,733**

## **FÜGGELÉK 2. – A témával kapcsolatos publikációk**