



XIII. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia



Vírusok vizsgálata a Tisza állati eredetű fekális szennyezésének nyomjelzésére

Szerző:

Szabó Attila

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológus MSc

Témavezető:

Kern Anita

Országos Környezetegészségügyi Intézet, Vízmikrobiológiai osztály

**Veszprém
2012. április 6-7.**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Absztrakt.....	3
Bevezetés.....	4
Célkitűzések.....	6
Anyagok és módszerek.....	6
Vírusok.....	6
Mintavétel.....	6
Víruskoncentráció.....	7
Nukleinsav kivonás.....	7
A vírusgenom kópiaszám meghatározása valós-idejű qPCR-rel.....	8
Az abszolút kvantifikáláshoz szükséges ismert koncentrációjú törzsoldatok előállítása ..	8
Sertés adenovírus valós-idejű qPCR.....	9
Szarvasmarha polyomavírus valós-idejű qPCR.....	9
Konvencionális PCR-k.....	10
Sertés adenovírus nested PCR.....	10
Szarvasmarha polyomavírus nested PCR.....	10
Konvencionális PCR termékek kimutatása gélelektroforézissel.....	11
Eredmények.....	12
Sertés adenovírus qPCR eredmények.....	13
Szarvasmarha polyomavírus qPCR eredmények.....	15
Diskusszió.....	17
Összefoglalás.....	20
Köszönetnyilvánítás.....	21
Irodalomjegyzék:.....	22
Függelék.....	24
A mintafeldolgozás során alkalmazott oldatok.....	24

Absztrakt

Munkánk során a hazai gyakorlatban még nem alkalmazott fajspecifikus, enterális vírusok kimutatásán alapuló mikrobiális nyomjelzési módszert használtunk felszíni és szennyvizek állati eredetű fekális terhelésének becslésére. Vizsgálatainkat egy Európai Unió pályázat – Viroclime – keretein belül végeztük sertés adenovírus és szarvasmarha polyomavírus jelenlétének kimutatása és mennyiségi meghatározása alapján. 2011 januárjától kezdődően kéthetes gyakorisággal a Tisza 4 pontján vizsgáltunk felszíni vízmintákat, illetve a szennyvíztisztítás hatékonyságát másodlagosan tisztított és nyers szennyvizek vírustiterének elemzésével. A 10 literes felszíni vízmintákat, illetve az 50 mL-es szennyvíz mintákat direkt flokkulációval koncentráltuk. A nukleinsav kivonást követően a két vírus jelenlétét ún. valós idejű (real-time), mennyiségi meghatározásra is alkalmas polimeráz láncreakcióval határoztuk meg. Vizsgálatainkkal igazoltuk állati vírusok folyamatos jelenlétét a felszíni- és szennyvizekben. Eredményeink alapján megállapítható, hogy ezek a vírusok nem távolíthatóak el kellőképpen a másodlagos szennyvízkezelés során. A felszíni vízminták vírustiteri mind évszakos, mind térbeli változatosságot mutattak, valamint a sertés adenovírus egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban volt kimutatható a vizsgált időszakban.

Bevezetés

Bár a nem megfelelő tisztaságú ivóvízről az emberek elsősorban a harmadik világ országaira asszociálnak, de a fejlett országokban, így hazánkban is számos ivóvíz eredetű megbetegedést regisztrálnak (Dura *et al*, 2010). Ezért a vizes környezetek mikrobiális terhelésének meghatározása napjainkban is kiemelten fontos feladat az egészségügyi kockázatok becslésekor. A kezeletlen, illetve a nem megfelelően kezelt állati vagy emberi eredetű szennyvízzel kórokozó mikrobák kerülhetnek a víztérbe, amelyek megbetegedéseket okozhatnak. Jóllehet e patogének többsége a szennyvízkezelés során eltávolítható, de jelentős hányaduk mégis a tisztított szennyvízbe kerül, amelyet a felszíni vizekbe vezetnek (Girones *et al*, 2010). A szennyezés emberi vagy állati eredetének meghatározására ún. mikrobiális nyomjelzési módszereket alkalmaznak. Ezen eljárásokkal azonosítani, néhány esetben mérni lehet a fekális szennyezés domináns forrásait a környezetben, különös tekintettel a vízi rendszerekre. Többféle eljárást dolgoztak ki a széklet eredetű szennyeződés jelzésére és nyomon követésére. Megkülönböztetünk mikrobiológiai (genotípusos vagy fenotípusos) és kémiai módszereket (Scott *et al*, 2002). Ezen módszerek önmagukban nem adnak megfelelő képet a vízminőségről, ezért együttesen több paraméter vizsgálata indokolt (Girones *et al*, 2010). A mikrobiális szennyezettség mértékének becslése indikátor baktériumok csíraszámának meghatározásával történik, annak ellenére, hogy ezen szervezetek alkalmazhatóságát számos tényező korlátozza: a kórokozókhoz képest rövidebb ideig maradnak fenn a környezetben; lehetnek nem kizárólagosan széklet eredetűek; többféle környezetben szaporodóképesek; jórészt minden gerinces állatban előfordulnak; számuk alacsonyan korrelál a kórokozók számával. Az indikátorok ezért nem alkalmasak a szennyeződés forrásának meghatározására. Emellett érzékenyebbek a vízkezelési eljárásokra, valamint a napfény - UV sugárzás - általi inaktivációra, mint a patogén protozoonok és vírusok (Girones *et al*, 2010; Pina *et al*, 1998; Scott *et al*, 2002).

Hazánkban még nem, de más országokban egyre elterjedtebben használnak enterális vírusokat mikrobiális nyomjelzésre. Ezek a vírusok jól alkalmazhatóak vizes környezetek fekális szennyezésének indikátoraként, mivel az ürülékben általánosan előfordulnak, így minden szennyvízzel, illetve direkt úton állati vagy humán fekális szennyezéssel terhelt természetes vízben kimutathatóak. A lipidburok hiányának köszönhetően ellenállóak a detergenssekkel szemben és stabilan fennmaradnak a környezetben; gazdaspecifikusak, és állandóan jelen vannak a populációban, folyamatosan megbetegedéseket okozva. Az emberi enterális és állati enterális vírusok tulajdonságai, így környezeti túlélésük is megegyezik (Thurston-Enriquez *et al*, 2003). A vírusok párhuzamos vizsgálata gazdaspecificitásuk miatt

alkalmas a fekális szennyezés emberi vagy különböző fajú állati eredetének egyértelmű kimutatására. Mennyiségi vizsgálatok esetén a különböző forrásból származó szennyezés relatív jelentősége is meghatározható. Az ismert enterális vírusok nagy része a hagyományos sejtenyészéssel nem, vagy csak nehezen mutatható ki, azonosításukhoz molekuláris technikákra van szükség. A molekuláris módszerek általában polimeráz láncreakción (PCR) alapulnak, gyorsak, érzékenyek és az ún. valós-idejű kvantitatív PCR-k (qPCR) mennyiségi meghatározásra is alkalmasak. Legnagyobb hátrányuk, hogy nem képesek a virulens és a fertőzőképtelen vírusok elkülönítésére, továbbá szükség lenne a különböző laboratóriumokban használt eljárások egységesítésére a megbízhatóság és az ismételhetőség érdekében (Albinana-Gimenez *et al*, 2009; Girones *et al*, 2010). Ahhoz, hogy a vírusokat molekuláris módszerekkel detektálni lehessen, a mintákat előzetesen koncentrálni kell, mivel a vízben alacsony koncentrációban vannak jelen. A víruskoncentráció hagyományosan ultrafiltrációval vagy a vírusok adszorbeáló felületekhez kötődését követő elúciójával történik (Albinana-Gimenez *et al*, 2009). Egy újabban kidolgozott alternatív eljárás során főzőt tejet használnak a vírusok megkötésére (Calgua *et al*, 2008), amely a költséghatékonyabb kivitelezhetőség ellenére is magas érzékenységgel.

Számos tanulmány alapján a mikrobiális nyomjelzésre különösen jól alkalmazhatóak az adenovírusok és a polyomavírusok (Harwood *et al*, 2009, Hundesa *et al*, 2006). E két víruscsoport kettős szálú DNS örökítőanyaggal rendelkezik, így kevésbé érzékenyek a környezeti behatásokkal, illetve a mintákban előforduló esteleges gátló anyagokkal szemben (Girones *et al*, 2010). Gazdaspecifikusak (bár tehenekkel tartósan érintkező emberekből is kimutathatóak a szarvasmarha polyomavírus (BPyV) elleni ellenanyagok (Hundesa *et al*, 2006) és szélesan elterjedtek a sertés, illetve a marha populációkban. Ellenben megbetegedést nem okoznak, így kitűnően alkalmazhatóak mikrobiális nyomjelzésre (Hundesa *et al*, 2006). Továbbá az irodalmi hivatkozások alapján az adeno- és polyomavírusok előfordulása domináns a többi víruscsoportéhoz képest az eddig tanulmányozott földrajzi régiókban, és titerük kisebb tartományban változik évszakos lebontásban, mint például a mérsékelt övben téli-kora tavaszi halmazódást mutató norovírusok titere (Bofill-Mas *et al*, 2000; Pina *et al*, 1998).

Vizsgálataink során célunk magyarországi gyakorlatban még nem alkalmazott, szennyezés eredetének azonosítására képes, vírus kimutatáson alapuló nyomjelzés módszer beállítása volt. Az állati enterális vírusok másodlagosan tisztított szennyvízben, valamint folyóvízben feltételezett jelenlétének kimutatására és mennyiségi meghatározására törekedtünk. Továbbá fontos részét (és egyben előfeltételét) képezte a munkánknak a vizsgálat során alkalmazott kvantitatív polimeráz láncreakciók adaptálása.

Célkitűzések

- A. Víruskoncentrálni módszer beállítása felszíni és szennyvizekre a Viroclime projektben kidolgozott protokoll alapján.
- B. Szilika alapú nukleinsav kivonási technika bevezetése és optimalizálása.
- C. Mennyiségi meghatározásra is alkalmas vírusspecifikus valós-idejű kvantitatív PCR, valamint vírus specifikus konvencionális PCR-k bevezetése és optimalizálása szarvasmarha polyomavírus (BPyV) és sertés adenovírus (PAdV) kimutatására.
- D. Szarvasmarha polyomavírus és sertés adenovírus kimutatása magyarországi felszíni és szennyvíz mintákból.

Anyagok és módszerek

Vírusok

A PCR vizsgálatok során pozitív kontrollként és az abszolút mennyiségi meghatározásra alkalmas kvantitatív ún. qPCR-hez nélkülözhetetlen mennyiségi standardként a célvírusok megfelelő génszakaszát tartalmazó plazmidok (*Escherichia coli* JM109 sejtekbe transzformálva) Prof. Dr. Rosina Girones-től (University of Barcelona, Barcelona) származtak. A mintafeldolgozás megbízhatóságát 35-ös szerocsoportú humán adenovírus tenyésztéssel ellenőriztük; minden mintafeldolgozás alkalmával a vírussal elegyített felszíni vízminta feldolgozásával (ennek eredményeit a dolgozat nem tartalmazza). A víruskoncentrátumot Dr. Annika Allard-tól (Umea University, Umea) kaptuk.

Mintavétel

A felszíni vízminták a Tisza négy pontjáról származtak, a vízfelszín alól 20 cm-rel:

1. Szolnokon a felszíni vízmű vízkivételi pontjáról, még a Zagyva torkolata előtt;
2. az első mintavételi ponttól délre, a tisztított szennyvíz folyóvízbe vezetése után, a folyó sodorvonalának közepéről;
3. Vezsenyen, a kompátkelőről, 120 cm vízmélységről;
4. Tiszaújlakon a szabadstrandról, szintén 120 cm vízmélységről.

Továbbá mintákat vettünk a szolnoki szennyvíztisztító nyers és a folyóba ömlő másodlagosan tisztított szennyvízéből (effluens) is. A mintavétel 2011. januártól kezdve kéthetes gyakorisággal történt. A vírusok kimutatására 10 L felszíni, és 50 mL szennyvíz mintát használtunk fel. A mintákat a mintavételt követően 8 órán belül a laboratóriumba szállítottuk, ahol azonnal megkezdődött a mintafeldolgozás.

Víruskoncentráció

Az élő vízben a vírusok alacsony koncentrációban fordulnak elő, így a víruskimutatáshoz a mintákat előzetesen koncentrálni kellett. Megfelelő pH és vezetőképesség mellett a vírusrészecskék jól kötődnek a fölözött tejhez (Calgua *et al*, 2008). Ezt kihasználva a felszíni 10 literes vízmintákhoz folyamatos kevertetés mellett tengeri sót adtunk, hogy vezetőképességük 1600 μ S fölötti értéket vegyen fel. Az 50 mL-es szennyvízminták esetében a víruskimutatást esetlegesen gátló szerves anyagok leválasztása érdekében kétszeres térfogatú 0,25 N pH 9,5 glicin pufferrel 30 percen keresztül jégen ráztuk a mintákat. A gátló anyagok eltávolítása ülepítéssel (7000 rpm, 15 perc, 4°C) történt. A szennyvízminták felülúszóját és a felszíni vízminták pH-ját 3,5-re állítottuk 1 N HCl, illetve 1 N NaOH adagolásával. Ezután 1:100 térfogat arányban (felszíni víz esetén 100 mL, szennyvíz esetén 1,5 mL) fölözött tej oldatot mértünk a mintákhoz. Ezen körülmények hatására a fölözött tejből pelyhek képződnek, valamint ezek a paraméterek elősegítik a vírusrészecskék pelyhekhez való kötődését is. A fölözött tej oldat hozzáadása után a mintákat 8 órán át kevertettük, hogy a vírusok hozzákötődjenek a fölözött tejhez. Majd újabb 8 órán át állni hagytuk őket, ezalatt a pelyhek gravitációsan leülepedtek. A szennyvízmintákat ezt követően közvetlenül centrifugáltuk (9600 $\times$ g, 45 perc, 4°C) és a felülúszó leöntése után a leülepedett vírusrészecskéket 1 mL 7,5 pH-jú foszfát pufferben feloldottuk. A felszíni minták esetében a felülúszó leszívása után fennmaradó fél liter üledéket szintén centrifugálással ülepítettük (8000 $\times$ g, 30 perc, 4°C). A felülúszót leöntve az üledéket 7 mL 7,5 pH-jú foszfát pufferben oldottuk fel, majd a koncentrátum térfogatát 10 mL-re egészítettük ki foszfát pufferrel. A koncentráció és víruskimutatás hatékonyságának és megbízhatóságának érdekében pozitív kontrollként humán adenovírussal elegyített felszíni vízmintát, negatív kontrollként (klórmentesítés céljából 0,01% végkoncentrációjú nátrium-tioszulfát oldattal kezelt) csapvíz mintát is feldolgoztunk a mintákkal párhuzamosan azonos körülmények között.

Nukleinsav kivonás

A víruskoncentrátumokból QIAGEN QIAamp Viral RNA kittel vontuk ki a nukleinsavakat, a gyártó utasítása szerint. A tisztítás alapját képező szilikagél membrán szelektíven megköti a 200 nukleotidnál hosszabb nukleinsavakat, így többféle minta párhuzamos feldolgozását tette lehetővé. A kivonáshoz mintánként 140 μ L vírus koncentrátumra volt szükség. Az első lépésben a mintákat lízispufferrel lizáltuk, amely kaotróp sókat és denaturáló ágenseket tartalmaz, így az esetleg a mintába került DNázokat, RNázokat és más enzimeket inaktíválja a virális DNS és RNS épsége érdekében. Az etanolos

kezelést és a két mosópufferrel történő tisztító lépést követően a szilikához kötődött nukleinsavakat leoldottuk az eluáló oldattal. Az így nyert tisztított nukleinsav koncentrátumból történt a vírusok mennyiségi meghatározása.

A vírusgenom kópiaszám meghatározása valós-idejű qPCR-rel

Vírusok mennyiségének meghatározására az egyik leggyorsabb, legegyszerűbb, legérzékenyebb és legmegbízhatóbb módja a valós-idejű, TaqMan® próbákra alapuló qPCR. A módszer abban különbözik a konvencionális PCR-től, hogy a kimutatandó vírus egy génszakaszára tervezett primerek mellett egy mindkét végén fluoreszcensen jelölt ún. próba kötődik szintén specifikusan a primerek által közrefogott génszakaszra. A reakció során a képződött PCR termékek mennyiségével arányosan fluoreszcens jel szabadul fel. Egy minta akkor számít pozitívnak, amennyiben a fluoreszcens jel eléri az alkalmazott háttér fluoreszcens festék által kibocsátott jelet, vagyis a küszöb értéket (Ct: threshold cycle). Minél nagyobb kópiaszámban van jelen a vizsgálandó génszakasz, annál több PCR termék képződik, így annál alacsonyabb ciklusszámmal lesz már a fluoreszcens jel detektálható, vagyis annál alacsonyabb lesz a Ct érték. A kapott Ct értékből egy ismert nukleinsav koncentrációjú, tízes alapú hígítási sorból összeállított standard görbéből levezetve az ABI7300 RT készülékhez megfelelő Applied Biosystems 7300 SD RQ program adja meg 10 µL-re számítva a minta nukleinsav koncentrációját. Az így kapott vírusgenom kópiaszám értékeket korrigáltuk a kiindulási térfogatra, így végeredményül az egy literben található vírusgenom kópiaszámot kaptuk.

Az abszolút kvantifikáláshoz szükséges ismert koncentrációjú törzsoldatok előállítása

A vírus specifikus valós-idejű qPCR-k bevezetését megelőzően olyan oldat előállítása szükséges, amelyben a vizsgálni kívánt vírus megfelelő génszakaszából meghatározott kópiaszám található. Ehhez a célgén tartalmazó plazmiddal már transzformált *Escherichia coli* JM109 kompetens sejteket ampicillin tartalmú LB táplevesben felszaporítottuk, majd QIAGEN Plasmid Midi kit segítségével megtisztítottuk a bakteriális alkotóelemektől a plazmidokat. A plazmidok megfelelő restrikciós endonukleázokkal történő linearizálását (BPyV esetében *NcoI*, PAdV esetében pedig *SacI*), valamint a linearizált plazmid Viogene PCR Advanced Clean Up System kittel való tisztítását követően Nanodrop ND-1000 készülékkel spektrofotometriásan meghatároztuk a DNS koncentrációját. A kapott koncentráció értékek és a célgén is tartalmazó plazmid bázishosszának ismeretében készítettünk vírusonként olyan törzsoldatot, amelyből 10 µL-ben 10⁶ genom kópiaszámban (GC) van jelen a célszakasz. Ebből a törzsoldatból minden egyes qPCR vizsgálat során egy hattagú tízes alapú hígítási sort is vizsgálunk - minden hígítási tagból két-két párhuzamosban

- a mintákkal egy időben, így biztosítva az abszolút mennyiségi meghatározáshoz szükséges kalibrálási görbét.

Sertés adenovírus valós-idejű qPCR

A PAdV qPCR során a hexon génre specifikus primereket (PAdVF: 5' – AAC GGC CGC TAC TGC AAG - 3'; PAdVR: 5' – AGC AGC AGG CTC TTG AGG - 3') és fluoreszcensen jelölt TaqMan® próbát (5' - 6FAM-CAC ATC CAG GTG CCG C-BHQ1 – 3') használtunk (Hundesa *et al*, 2009). Minden minta esetében a tömény és a tízszeresen hígított nukleinsav koncentrátumból történt a mennyiségi meghatározás két-két párhuzamosban. A reakcióelegy összetevői: 0,9 mM forward és reverse primer, 0,225 mM TaqMan® próba, 1×TaqMan® Environmental PCR Master Mix, 10 µL vírus nukleinsav koncentrátum (a végtérfogat 25 µL). A reakció kezdeti denaturációs ciklusa során 10 percig 95°C-on tartja a készülék a mintákat, majd 45 cikluson keresztül követik egymást a denaturációs (15s 95°C), az annealációs (20s 55°C), és az extenziós ciklusok (30s 60°C). A minták mellett a fent említett hattagú tízes hígítású standard hígítási sort (10^6 - 10^1 GC/10 µL), valamint ún. vak (reagens kontroll) mintát is vizsgáltunk, amely reakcióelegyet és hozzáadott steril desztillált vizet tartalmaz. A vak mintával bizonyítható, hogy a reakcióelegy önmagában nem ad fluoreszcens jelet.

Szarvasmarha polyomavírus valós-idejű qPCR

A BPyV jelenlétének igazolásához és mennyiségi meghatározásához a fő kapszid fehérje (VP1) génre specifikus primereket (BPyVF: 5' – CTA GAT CCT ACC CTC AAG GGA AT - 3'; BPyVR: 5'- TTA CTT GGA TCT GGA CAC CAA C - 3') és fluoreszcensen jelölt TaqMan® próbát (5' - FAM-GAC AAA GAT GGT GTG TAT CCT GTT GA-BHQ1 - 3') használtunk a qPCR során (Hundesa *et al*, 2010). Ebben az esetben is mintánként két párhuzamosban történt a tömény és a tízszeresen hígított nukleinsav koncentrátumból a mennyiségi meghatározás. A reakcióelegy összetevőinek aránya azonos a sertés adenovírus qPCR reakciónál leírtakkal: 0,9 mM forward és reverse primer, 0,225 mM TaqMan® próba, 1×TaqMan® Environmental PCR Master Mix, 10 µL vírus nukleinsav koncentrátum (a végtérfogat 25 µL). A reakció hőprofilja: 10 perc 95°C kezdeti denaturáció, majd 45 ciklus 15s 95°C és 30s 60°C. Ez esetben is a minták mellett az említett hattagú tízes hígítású standard hígítási sort (10^6 - 10^1 GC/10 µL), valamint a vak mintát is vizsgáltuk.

Konvencionális PCR-k

A kimutatási határhoz közeli értéket adó mintákat megerősítés céljából PAdV-, illetve BPyV-specifikus nested (kettős) PCR módszerrel is megvizsgáltuk (Hundes *et al*, 2006). Mindkét nested PCR esetében a qPCR során kimutatott génszakaszokra tervezett primerekkel történt a megerősítés. A PCR megfelelő működésének ellenőrzéséhez a standardoldat készítéséhez használt tisztított plazmidokat használtunk pozitív kontrollként.

Sertés adenovírus nested PCR

Az első reakcióelegy összetétele: 1×PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,025 mM dezoxi-nukleotid-trifoszfát (dNTP), 25 pM a hexon génre specifikus forward (PALF: 5' – GAT GTC ATG GAY AAC GTC AAC - 3') és reverse primer (PARF: 5' - CAC GGA GGA GTC RAA CTG GAT G - 3'), 0,4 mg/mL szarvasmarha szérum albumin (BSA), valamint 2 U *Taq* DNS polimeráz, és 5 µL nukleinsav koncentrátum (végtérfogat 25 µL). Az első reakció hőprofilja: kezdeti denaturáció 4 perc 94°C; 30 ciklus 92°C 60s, 54°C 60s, 72°C 75 s; végül 7 perc 72°C. Az első reakcióban keletkezett PCR termék 612 bp hosszú. A második reakcióelegy összetétele: 1×PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,025 mM dezoxi-nukleotid-trifoszfát (dNTP), 25 pM forward (PALN: 5' – TAC TGC MAG TTY CAC ATC CAG GT - 3') és reverse primer (PARN: 5' - GGA ATG GAG ATG GGC AGG TT - 3'), 0,4 mg/mL BSA, valamint 2 U *Taq* DNS polimeráz, 0,5 µL az első PCR termékeiből (végtérfogat 25 µL). A második reakció hőprofilja: 1 ciklus 4 perc 94°C; 30 ciklus 92°C 60s, 57°C 60s, 72 °C 75 s; és 7 perces extenziós lépés 72°C-on. A reakció végén 344 bp hosszú végterméket kaptunk. A tömény és a tízszeresen hígított nukleinsav koncentrátumból történt a vizsgálat.

Szarvasmarha polyomavírus nested PCR

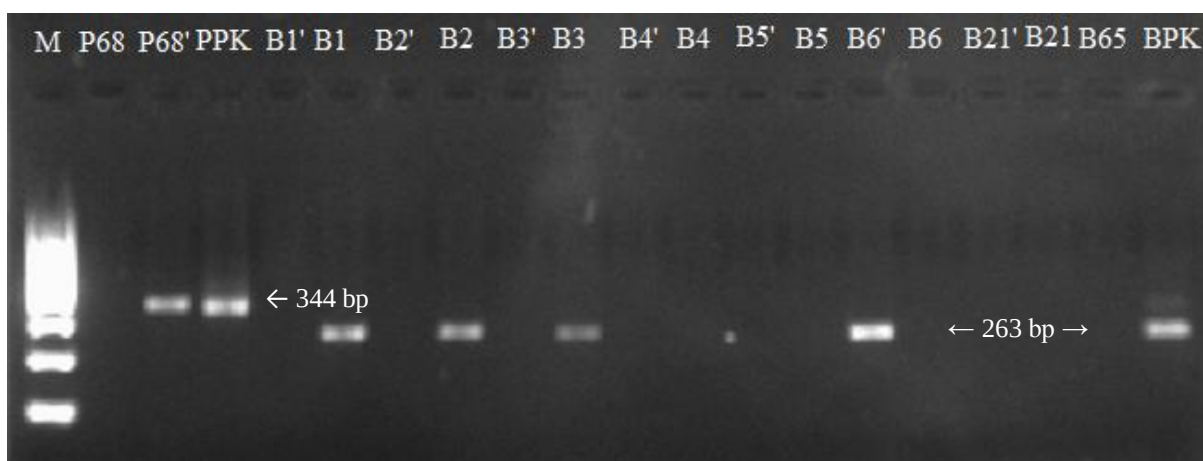
Ezen nested PCR reakcióelegyek összetétele a primerek szekvenciáit leszámítva megegyezik a sertés adenovírusnál leírtakkal. Az első reakcióban használt primerek: VP1F: 5' – GGT ATT CGC CCT CTG CTG GTC AAG – 3', VP1R: 5' – GCT GGC AAT GGG GTA TGG GTT CT - 3') Az első reakció hőprofilja: kezdeti denaturáció 2 perc 94°C; 35 ciklus 94°C 60s, 58°C 75s, 72°C 75 s; majd 5 perc 72°C. Az első reakcióban keletkezett PCR termék 527 bp hosszú. A második reakcióelegyben használt primerpár: VP2F: 5' – ATT TCA AAG CCC CCT ATC ATC - 3'; VP2R: 5' – GCC TAC GCC ATT CTC ATC AAG - 3'. A második reakció hőprofilja megegyezik az elsőével annyi különbséggel, hogy itt 30 amplifikációs ciklust alkalmaztunk. A PCR reakció végterméke 263 bp hosszú. Ez esetben is a tömény és a tízszeresen hígított nukleinsav koncentrátumokat vizsgáltuk.

Konvencionális PCR termékek kimutatása gélelektroforézissel

A nested PCR reakciók második PCR termékeinek kettős szálú nukleinsavat jelölő festékkel (1×GelRed) elegyített 2%-os agaróz gél zsebeibe töltésére 6x Loading Dye-t alkalmaztunk. A gél zsebeibe töltést követően a termékeket, valamint a termékek mellett a molekulasúly markert (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) 45 percen keresztül 150 V feszültséggel 0,5× TBE pufferben megfuttattuk. A keletkezett PCR termékeket UV fényben tettük láthatóvá.

Eredmények

Összesen 101 felszíni és 52 szennyvízminta koncentrációja történt meg, melyből 72-72 mintából végeztük el a két vírus mennyiségi meghatározását valós-idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval, 48-48 mintában ellenőriztük a kimutatási határhoz közel eső eredményeket. A felszíni és a szennyvíz mintákból is mindkét vírus jelenléte kimutatható volt. Az idő előrehaladtával megfigyelhető egy növekvő tendencia a kimutatott vírust tartalmazó minták számának növekedésében. Ez feltehetően a módszer egyre finomabb beállításának, optimalizálásának köszönhető. Sertés adenovírus esetében 9, szarvasmarha polyomavírus esetében 20 mintának lett kimutatási határ közeli Ct értéke, ezeket konvencionális PCR alkalmazásával ellenőriztük. Ez utóbbi vizsgálat 1 mintában erősítette meg a PAdV-, és 9 mintában a BPyV jelenlétét (1. ábra).



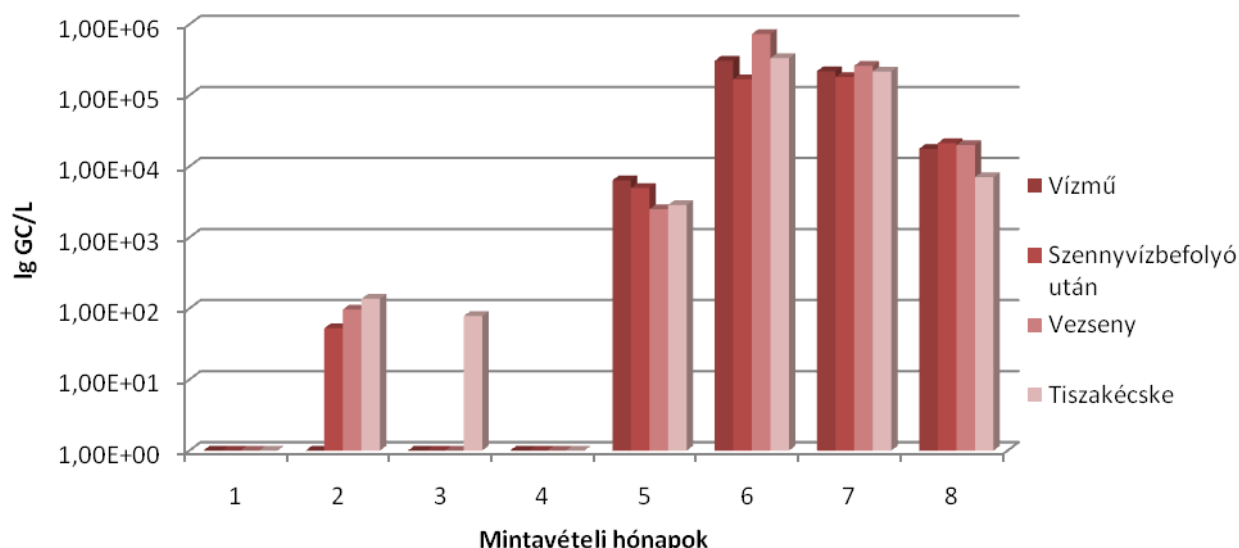
1. ábra: Sertés adenovírus, illetve szarvasmarha polyomavírus nested PCR termékei a gélelektroforézist követően. P68' és P68: PAdV-ra vizsgált minták, B1' – B65' BPyV-ra vizsgált minták, PPK és BPK: PAdV, illetve BPyV pozitív kontrollok, M: 100bp DNS marker. A felülvonással jelölt mintasorszárok a tízszeres hígítású, a jelöletlenek a tömény nukleinsav koncentrációból származnak.

A korábbi tanulmányok során is tapasztalt jelenség (Kern, 2008) is megfigyelhető volt a konvencionális PCR során, miszerint egyes esetekben a tízszeres hígítású nukleinsav koncentrátumból sikerült kimutatni a vírust, viszont a töményből nem. Ennek oka a vízmintákban nagyobb mennyiségben található PCR-t gátló anyagok jelenléte lehet, mint például a humusz-, és egyéb szerves savaké, valamint bizonyos fémionoké (Abbaszadegan *et al*, 1993). Ezek a vegyületek a víruskoncentráció során feldúsulhatnak, és a nukleinsav tisztítás során is a mintákban maradhatnak. Ellenben a nukleinsav koncentrátumok hígításával koncentrációjuk csökken, így a PCR-t is csekélyebb mértékben zavarják. Az egyes qPCR

eredményeket összefoglaló diagramokon a nested polimeráz láncreakcióval megerősített eredmények lettek feltüntetve.

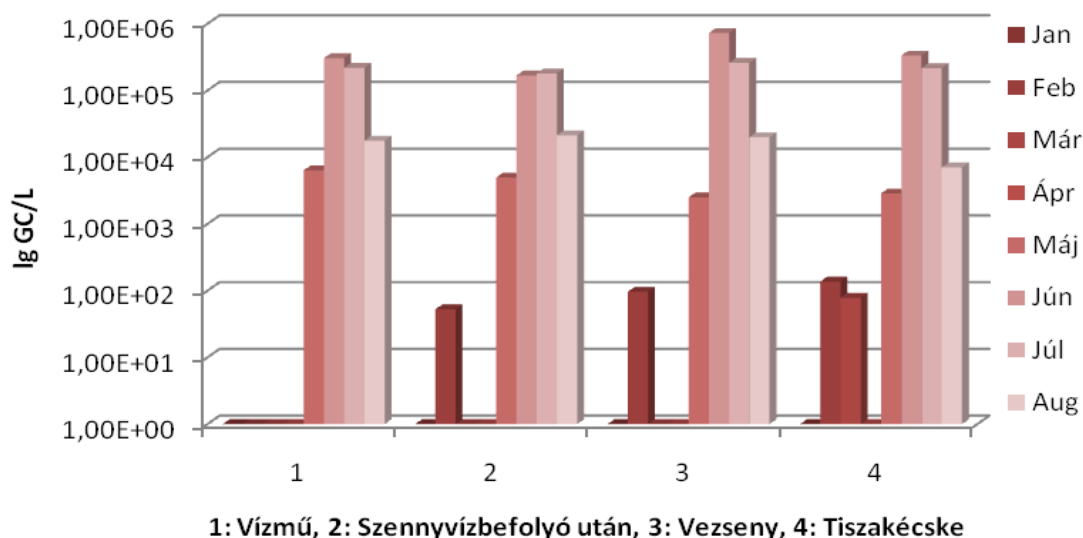
Sertés adenovírus qPCR eredmények

Sertés adenovírusra a felszíni vízminták többsége pozitívnak bizonyult (2. és 3. ábra). A víruskoncentráció magasabb volt a nyári hónapokban, legnagyobb koncentrációban a júniusi mintavétel alkalmával fordult elő (2. ábra).



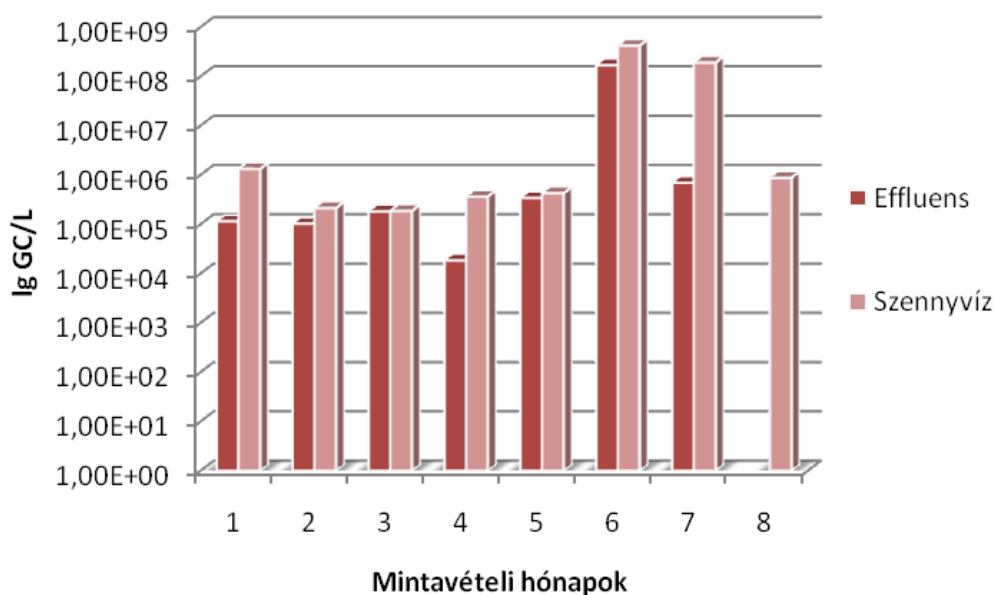
2. ábra: Sertés adenovírus koncentrációjának változása a mintavételi időpontok függvényében.

Az első és a negyedik mintavétel során a vírus nem volt kimutatható egyik felszíni vízmintából sem, de e két mintavételi alkalom között februárban a vízű mintavételi pont kivételével, valamint márciusban Tiszakécskén detektálható volt (3. ábra). A mintavételi helyek szerint a vízűnél 4, a szennyvízbefolyó utáni ponton 5, Vezsenynél 5, Tiszakécskén 6 alkalommal mutattuk ki a vírust. Az egyes mintavételi pontokon a PAdV koncentráció az alábbiak szerint változott: vízű: $5,01 \times 10^3$ – $2,51 \times 10^5$ GC/L; szennyvízbefolyó után: $3,98 \times 10^1$ – $1,58 \times 10^5$ GC/L; Vezseny: $7,94 \times 10^1$ – $6,31 \times 10^5$ GC/L; Tiszakécske: $6,31 \times 10^1$ – $2,51 \times 10^5$ GC/L.



3. ábra: Sertés adenovírus koncentrációjának időbeli változása az egyes mintavételi helyszíneken.

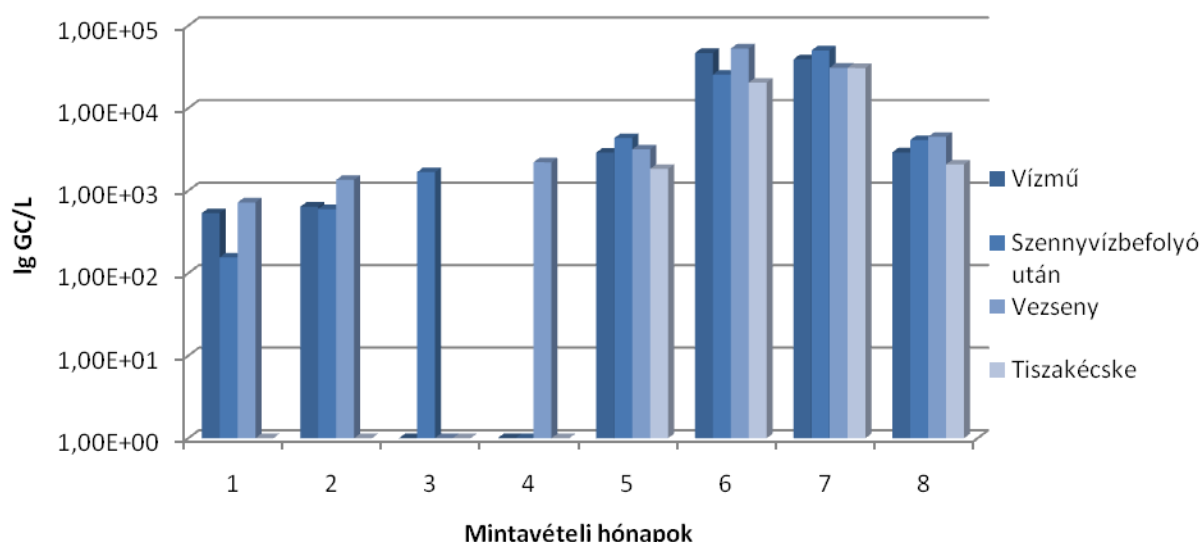
A szennyvízmű mintáit vizsgálva a nyers szennyvízben sertés adenovírusra minden minta pozitívnak bizonyult (4. ábra). A nyolcadik mintavételi alkalom kivételével a tisztított szennyvízmintákból is kimutatható volt a vírus. Az effluens vírustitere egy esetben nagyjából azonos, a júliusi mintavétel során mintegy 2 nagyságrenddel, a többi mintában pedig maximálisan egy nagyságrenddel alacsonyabb volt a szennyvízben található víruskoncentrációnál. A vírusgenom kópiaszám nyers szennyvízben $1,00 \times 10^5 - 3,16 \times 10^8$ GC/L között, tisztított szennyvízben $1,00 \times 10^4$ és $1,00 \times 10^8$ GC/L érték között változott.



4. ábra: A PAdV koncentráció változásai a nyers és a másodlagosan tisztított szennyvízben a különböző mintavételi időpontokban.

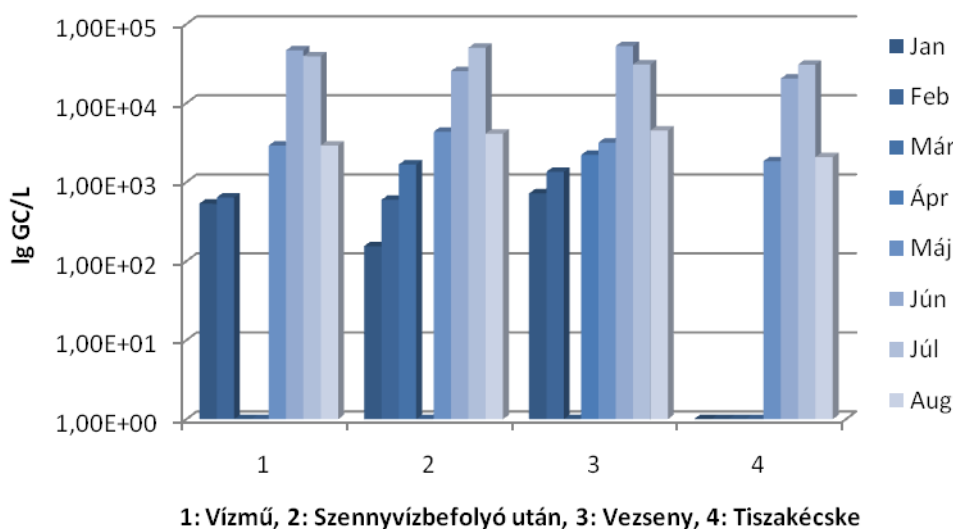
Szarvasmarha polyomavírus qPCR eredmények

A szarvasmarha polyomavírusra a felszíni vízminták többsége szintén pozitívnak bizonyult. Minden mintavételi alkalommal volt olyan mintavételi hely ahol ki lehetett mutatni a polyomavírust (5 és 6. ábra). A vírustiter ez esetben is júniusban volt a legmagasabb. A vírust Tiszakécskén egészen májusig nem detektáltuk (5. ábra).



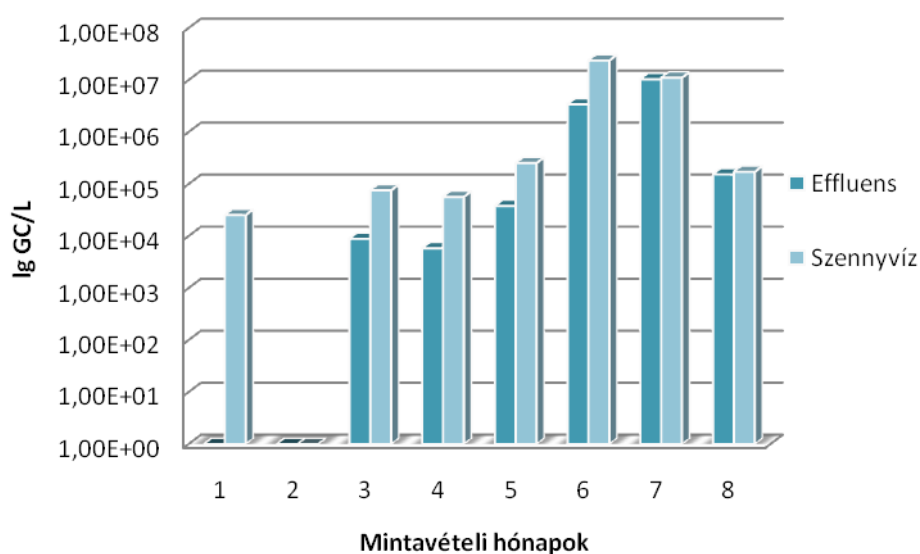
5. ábra: A szarvasmarha polyomavírus koncentrációjának változása a mintavételi időpontok függvényében.

A mintavételi helyek szerint a BPyV-ra pozitív minták száma a következőképpen alakult: a vízműnél 6, a szennyvízbefolyás utáni mintavételi pontnál 7, Vezsenynél 7, Tiszakécskén 4 esetben mutattuk ki a kórokozót. A vírusgenom kópiaszám az egyes mintavételi pontokon az alábbiak szerint változott: vízműnél $3,98 \times 10^2$ - $3,98 \times 10^4$ GC/L; a szennyvízbefolyás után $1,26 \times 10^2$ - $3,98 \times 10^4$ GC/L; Vezsenynél $5,11 \times 10^2$ - $3,98 \times 10^4$ GC/L, Tiszakécskén $1,58 \times 10^3$ - $2,51 \times 10^4$ GC/L (6. ábra).



6. ábra: BPyV koncentrációjának változása az egyes mintavételi helyszíneken.

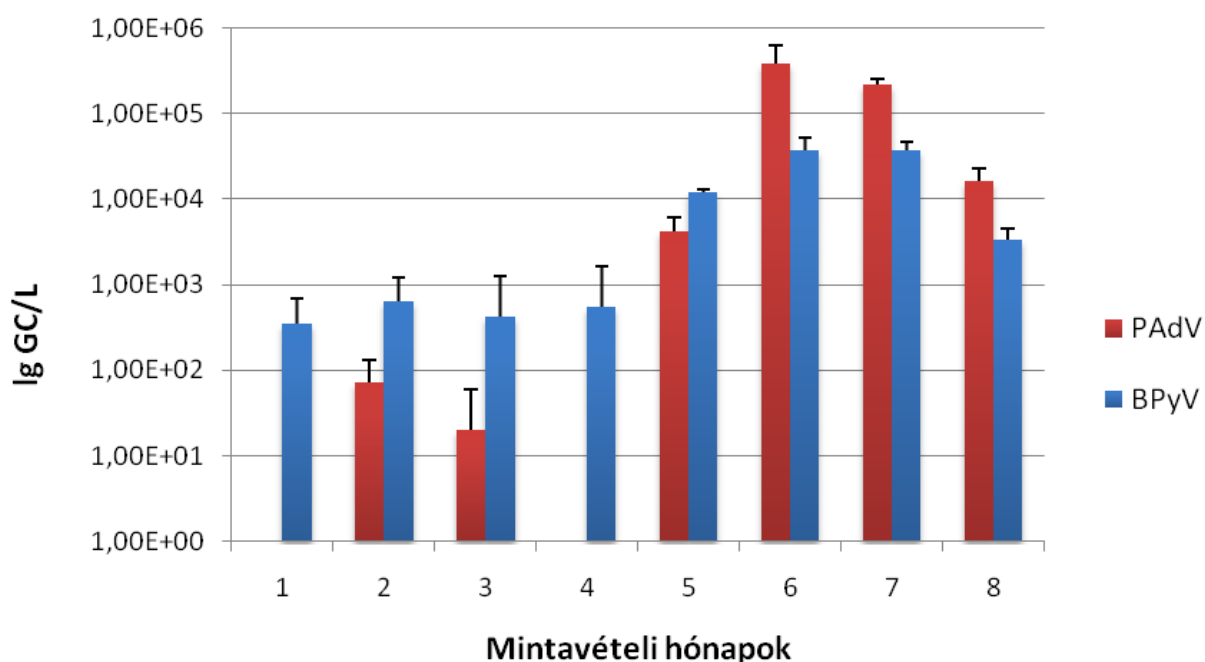
A szennyvíztisztítómű mintáiban a második mintavételt leszámítva minden mintavétel alkalmával sikerült kimutatni a vírust (7. ábra). A másodlagosan tisztított szennyvízből csak az első, és a második mintavételi alkalommal nem volt a vírus detektálható. A polyomavírus esetében is a nyers szennyvízben mért víruskoncentráció minden alkalommal magasabb volt a tisztított szennyvízben mértnél. A vírus titere nyers szennyvízben $1,26 \times 10^4$ - $1,58 \times 10^7$ GC/L között, tisztított szennyvízben $5,01 \times 10^3$ - $1,00 \times 10^7$ GC/L érték között variált.



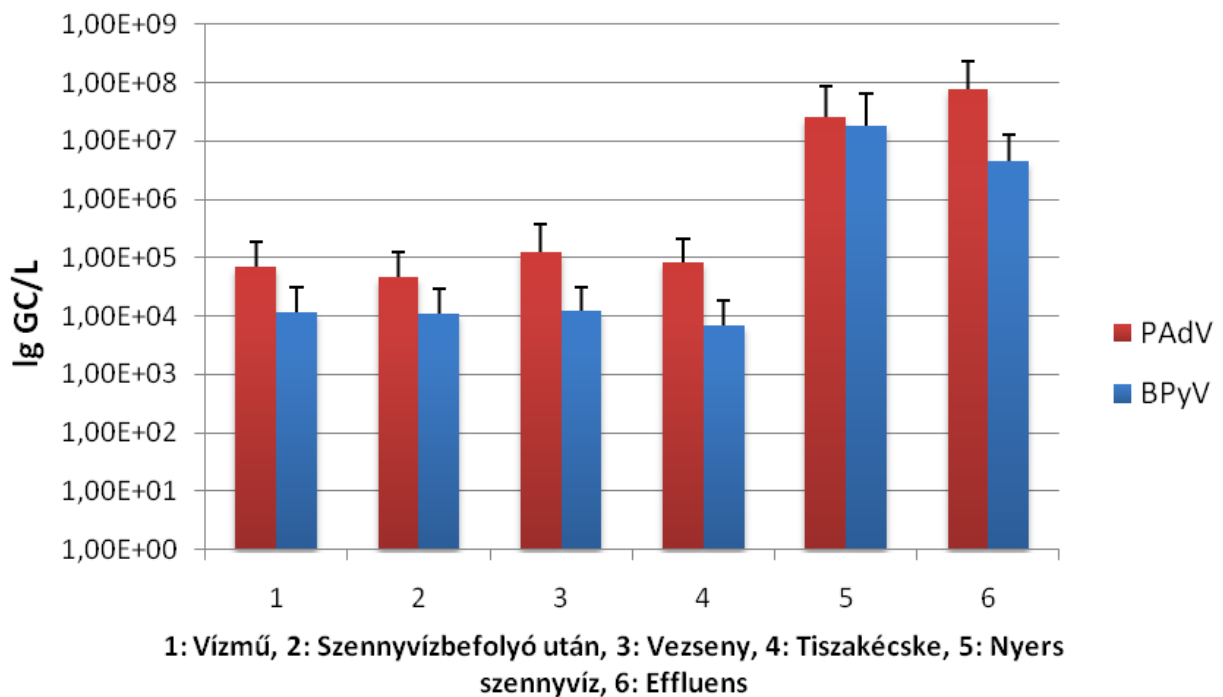
7. ábra: A BPyV koncentráció változásai a nyers és a tisztított szennyvízben az egyes mintavételezések során.

Diszkusszió

Általánosságban elmondható, hogy mindkét vírus koncentrációja hasonlóan változott mind időben, mind mintavételi helyek szerint (8. és 9. ábra). Az év eleji mintákban azonban a BPyV koncentrációja egyenletes, míg a PAdV mennyisége fluktuált. A vírusok titere februárban egy erőteljesebb emelkedést mutat, ami még márciusban is tart, majd májustól erőteljesen emelkedik, júniusban eléri a csúcst, és júliustól ismét csökken. A BPyV viszont ezt a kis emelkedést leszámítva folyamatosan van jelen a víztérben, bár március – áprilisban csak egy-egy mintavételi ponton volt kimutatható. Az év eleji adatok szórásában szerepet játszhat a módszer nem megfelelő beállítása, ezt támaszthatja alá, hogy a februári mintavételi alkalommal a szennyvízműből származó BPyV minták is negatívak lettek. E kivételtől eltekintve azonban mindkét állati eredetű vírus megjelenik a nyers szennyvízben, pedig a szennyvízüzem csak kommunális szennyvizet fogad be és dolgoz fel.



8. ábra: A víruskoncentrációk átlagértékeinek változása az egyes mintavételi időpontokban.



9. ábra: A víruskoncentrációk átlagértékeinek változása az egyes mintavételi helyszíneken.

A szennyvíztisztítás hatása mindkét vírus esetében kimutatható, mivel minden tisztított szennyvízmintában, ha csekély mértékben is, de alacsonyabb volt a víruskoncentráció, mint a nyers szennyvízben (4-7. ábra). A tisztított szennyvíz bevezetése és a vírusszám mennyisége közt ellenben az eddigi vizsgálatok alapján nem mutatható ki összefüggés, mivel a szennyvízbevezető feletti (vízmű) és a bevezető alatti mintavételi pontok vírustíerei között nincs összefüggés egyik vírus esetében sem. Ennek valószínű oka, hogy a vízmű mintavételi pont és a szennyvízbevezetés utáni mintavételi pont között nemcsak a szennyvízbevezető, hanem a Tisza egyik mellékfolyója, a Zagyva is torkollik, hozva a saját víruskészletét, ami úgy tűnik időben szintén nem állandó. Ezt eldöntendő további mintavételi pontok bevezetésére lenne szükség. Sertés adenovírus esetében az első és a negyedik mintavételi alkalomnál nem voltak pozitívak a minták, illetve a második mintavételkor a vízmű mintavételi ponton sem. Viszont ezt a mintavételi pontot leszámítva a vírus mennyisége egyre nőtt a mintavételi pontokon. A harmadik alkalommal csak Tiszakécskén detektáltunk sertés adenovírust. Szarvasmarha polyomavírusra nagyobb volt a vizsgált pozitív minták száma, mint sertés adenovírus esetében (8. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy az adenovírusok széklet eredetűek, míg a polyomavírusok a vizelettel ürülnek, amely folyadék jellegéből adódóan egyszerűbben és gyakrabban bemosódhat a szennyvízbe (Hundesa *et al*, 2006). Általánosságban viszont a BPyV mért titere egy nagyságrenddel kisebb, mint a PAdV koncentrációja (9. ábra). Mindkét vírus esetén Vezsenynél volt legmagasabb a víruskoncentráció. Ez a mennyiségi kiugrás a PAdV koncentrációjában jelentősebb.

Feltehetően a közelben üzemel(nek) olyan állattartó telep(ek), amely(ek) szennyvizüket közvetlenül a folyóba vezetik. A Tiszaécscsénél mért PAdV titer az első kettő felszíni vízmintavételi ponthoz képest magasabb, de a vezsenyi mintavételi ponthoz képest alacsonyabb víruskoncentrációja e szennyeződés hígulásával hozható összefüggésbe.

Összefoglalás

A kezeletlen vagy nem megfelelően tisztított szennyvízzel számos olyan mikroba kerül természetes vizeinkbe, amely a víz felhasználása során (fogyasztás, fürdőzés, halászat) különféle megbetegedéseket okozhat. A szennyezés(ek) eredetének meghatározása kiemelten fontos vizeink természetes állapotához fenntartásához. Vizsgálataink célja egy, a magyarországi gyakorlatban még nem alkalmazott, a szennyezés eredetének azonosítására képes, vírus kimutatáson alapuló nyomjelzéses módszer beállítása volt. A módszer alkalmazása során olyan állati vírusokat detektáltunk (sertés adeno-, és szarvasmarha polyomavírus), amelyek ismert megbetegedést nem okoznak, de tartósan jelen vannak a haszonállat populációban és a vizelettel, illetve a széklettel folyamatosan ürülnek. 2011 januárjától kezdve kéthetes gyakorisággal végeztünk mintavételt tisztított és nyers szennyvízből, valamint négy felszíni vízmintavételi pontról.

Összesen 101 felszíni és 52 szennyvízminta koncentrációját végeztük el, melyből 72-72 mintából történt meg a két vírus mennyiségi meghatározása valós-idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval, 48-48 minta kimutatási határhoz közel eső eredményeit nested-PCR-rel ellenőriztük. A dolgozat az ellenőrző vizsgálatokkal alátámasztott, minden hónap első mintavétel eredményeit tartalmazza januártól – augusztusig.

Vizsgálatainkkal igazoltuk a koncentrációs és a nukleinsav kivonási módszer hatékonyságát, valamint állati vírusok folyamatos jelenlétét felszíni vizekben és a kommunális szennyvizekben. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a vírushatárértékeknek csak egy része távolítható el a jelenleg alkalmazott szennyvíztisztítási eljárásokkal. A vírustiter meghatározása alapján általános tendenciákat figyelhettünk meg a vírusszám alakulásáról az idő függvényében és az egyes mintavételi helyszíneken. A köztes minták tisztított nukleinsav koncentrációjaiból a vírus jelenlét és vírustiter meghatározása, valamint a mintavételezés folyamatosan zajlik. További célunk ezen minták PAdV és BPyV tartalmának összevetése az eddigi minták eredményeivel, illetve a mintavételi spektrum kiszélesítése.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőm, Kern Anita türelmét és segítségét, valamint további köszönettel tartozom Dr. Vargha Mártának és az Országos Környezetegészségügyi Intézet munkatársainak segítségükért.

Irodalomjegyzék:

Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, and Pepper IL. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1318-1324.

Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R. 2009. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods.* **158**(1-2):104-9.

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

Dura G, Pándics T, Kádár M, Krisztalovics K, Kiss Z, Bodnár J, Asztalos A, Papp E. 2010. Environmental health aspects of drinking water-borne outbreak due to karst flooding: case study. *J Water Health.* **8**(3):513-20.

Girones R, Ferru MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, de Abreu Corrêa A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. 2010. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, **44**(15): 4325-39

Harwood VJ, Brownell M, Wang S, Lepo J, Ellender RD, Ajidahun A, Hellein KN, Kennedy E, Ye X, Flood C. 2009. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Res.* **43**(19): 4812-4819.

Hundesa A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R. 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol.* **72**(12):7886-93.

Hundesa A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Suñen E, Girones R. 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Methods.* **158**(1-2): 130-135.

Hundesa A, Bofill-Mas S, Maluquer de Motes C, Rodriguez-Manzano J, Bach A, Casas M, Girones R. 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol. Methods.* **163**(2): 385-389.

Kern A. 2008. Humán patogén vírusok kimutatása magyarországi fürdővizekből, ELTE, Diplomamunka

Kern A, Szabó A, Vargha M, Kádár M. Humán patogén vírusok túlélése a vízkezelés során, MHT XXIX. Országos Vándorgyűlés, Eger, 2011. július 6-8.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3376-3382.

Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. 2002. Microbial Source Tracking: Current methodology and future directions. *Appl. and Environ. Microbiol.* **68**(12): 5796-5803

Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl Environ Microbiol.* **69(7)**: 3979-85.

Függelék

A mintafeldolgozás során alkalmazott oldatok

1 N HCL oldat

- 34,4 mL tömény HCl
- 400 mL ioncserélt víz

1M / 4% NaOH oldat

- 40 g NaOH
- 1000 mL ioncserélt víz

Főlözött tej oldat

- 33,33 g tengeri só
- 10 g főlözött tej
- 1000 mL steril desztillált víz

Glicin oldat

- 18,75 g glicin
- 1000 mL steril desztillált víz

LB (Luria-Bertani) tápleves 100 µg/mL ampicillinnel

- 10 g tripton
- 5 g élesztőkivonat
- 5 g NaCl
- 1000 mL desztillált víz
- A 100 mg ampicillint a 121°C-on 20 percig történő autoklávozást követően a már 40°C-ra lehűlt oldathoz adjuk.