

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar

Környezettudományi Doktori Iskola

Környezetbiológia Program

VÍRUSMONITORING KÖRNYEZETI VIZEKBEN –  
ÚJ UTAKON A JÁRVÁNYTANBAN

**Doktori értekezés tézisei**

Róka Eszter



Doktori Iskola vezetője: Dr. Turányi Tamás

Programvezető: Dr. Tóth Erika

Témavezető: Dr. Vargha Márta

Nemzeti Népegészségügyi Központ

Közegészségügyi Laboratóriumi Főosztály, Budapest

2022

## Bevezetés

A XIX. század közepére világossá vált, hogy számos kórokozó képes víz közvetítésével terjedni. A járvány terjedésének megakadályozásához, valamint a további járványok kialakulásának elkerüléséhez elengedhetetlen a fertőző forrás azonosítása. Ehhez a klasszikus epidemiológiai módszerek (a megbetegedettek kikérdezése, a járvány dinamikájának vizsgálata) mellett a mikrobiológiai vizsgálatok is segítséget nyújtanak: a kórokozó kimutatása környezeti közegből döntő bizonyítéknak számít. Ennek vizsgálata a könnyebben tenyészthető bakteriális kórokozók esetében már régóta fennálló gyakorlat, a nukleinsav alapú kimutatás és az új koncentráció módszerek azonban a vírusok esetében is áttörést hoztak.

Bár a fejlett ivóvíz- és szennyvízkezelés miatt hazánkban a víz eredetű fertőző megbetegedések visszaszorulóban vannak, jelentőségük most sem elhanyagolható. Különösen extrém időjárási körülmények vagy alternatív ivóvízforrások használata esetén továbbra is fennáll a fertőzések kockázata, emellett a nem megfelelően kezelt medencés fürdők, vagy a szennyezésnek kitett természetes fürdővizek is kockázatot jelenthetnek.

A szennyvízben kimutatható kórokozók azonban nem csak egészségkockázatot jelentenek: jelenlétük kimutatásával, vagy mennyiségük nyomon követésével a lakosság egészségi állapotáról is fontos információkhoz juthatunk. A SARS-CoV-2 minél gyorsabb és pontosabb nyomon követése a szennyvízben a COVID-19 járvány alatt kiemelt jelentőségű lett.

Bár a SARS-CoV-2 légúti kórokozó, széklettel is ürül. Tünetes és tünetmentes személyek már a fertőzés kezdeti szakaszától ürítik a vírust, így az a szennyvízből már azelőtt kimutatható lehet, hogy az új fertőzöttek az egészségügyi ellátórendszerben megjelenjenek. 2020 első felétől emiatt számos kutatócsoport kezdett szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatással foglalkozni, többségük szoros összefüggést talált az igazolt megbetegedésekkel.

2020 második felétől a SARS-CoV-2 újabb, a korábbiaknál gyorsabban terjedő, súlyosabb megbetegedést okozó vagy eltérő terápiát igénylő variánsai kerültek a figyelem középpontjába. A megbetegedések számának nyomon követése és előrejelzése mellett a variánsok jelenlétének kimutatása is kiemelt céljává vált a szennyvízvizsgálatoknak.

## Célkitűzések

A vizsgálatok során célkitűzéseim a következők voltak:

- Módszerek optimalizálása vírusok ivóvízből, felszíni vízből és szennyvízből történő kimutatására

- Vírusok kimutatása vízből, mint feltételezett terjesztő közegből enterális vízárványok esetén
- Ezzel az újabb megbetegedések kockázatának csökkentése
- Módszerfejlesztés az új koronavírus (SARS-CoV-2) szennyvízből történő kimutatására
  - Biztonságosan elérhető és a szükséges áteresztőképességre optimalizálható víruskoncentrációs módszer kidolgozása
  - Elérhető és hatékony nukleinsav-kivonási módszer beállítása
- A szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatás eredmények járványügyi hasznosíthatóságának vizsgálata
  - Az adatfeldolgozási módszer optimalizálása annak érdekében, hogy megbízható és egyenletes minőségű adatokat nyerjünk a COVID-19 esetszám alakulásának becsléséhez
  - Az egyes városok eredményeinek összefüggésének vizsgálata a COVID-19 esetszámokkal, az előrejelző képesség meghatározása
  - Az eredmények országos átlagának összefüggése a COVID-19 esetszámokkal (beleértve a kórházi kezelésre szorulókat), előrejelző képesség vizsgálata
- A szennyvíz adatok előrejelző képességének összehasonlítása a COVID-19 pandémia különböző hullámaiban
- A SARS-CoV-2 járványügyi szempontból jelentős variánsainak vizsgálata szennyvízből
  - Gyors és hatékony vizsgálati módszer beállítása
  - Az eredmények összevetése a klinikai adatokkal

## Anyag és módszer

Enterális eredetű járványok vizsgálata céljából négy esetben történt mintavétel a vizsgált időszakban:

- Egy alföldi, kis kiterjedésű tóból calicivírus-járvány miatt, a mintavétel 2015. 07. 13-án történt. (Tó1)
- Három, kórház közelében található gyógyvíz kútból (K1, K2, K3) calicivírus-járvány miatt 2016. 07. 18-án történt mintavétel.
- Egy család magánkútjából 2016. 07. 26-án (K4) vettek mintát hepatitis A halmozódás kivizsgálására.

- Egy medencés fürdő két medencéjéből (M1, M2) 2017.02.15-én érkezett minta calicivírus-járvány kivizsgálására

A laboratóriumba beérkező mintákat tejporos flokkuláció módszerével koncentráltuk, majd a nukleinsav tisztítása után taxon-specifikus PCR-el és agaróz gélelektroforézissel detektáltuk a vizsgált kórokozó jelenlétét. A feldolgozási folyamat ellenőrzésére minden mintasorozattal együtt egy pozitív és egy negatív kontroll minta feldolgozása is megtörtént.

A szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatáshoz Budapesten, valamint az ország minden megyeszékhelyén hetente vettünk mintát 2020. július elejétől. 2020 augusztusától emellett néhány Budapest környéki település mintáját is heti rendszerességgel vizsgáltuk, 2021 októberétől pedig a legnagyobb városokból heti kétszer történt mintavétel. Az adatokat 2021. október végéig dolgoztam fel, emellett az egyes járványhullámok összehasonlításához az országos összesített adatsort 2021 decemberéig kiegészítettem.

Mivel munkacsoportunk korábban kizárólag burok nélküli vírusok koncentrálásához rendelkezett módszerrel, a szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatáshoz számos koncentrálási módszert összehasonlítottunk (tejporos flokkuláció, ultraszűrés kereskedelmi forgalomban kapható membránokkal, ultraszűrés egyedileg gyártott lapmembránnal, elektronnegatív membránon történő koncentrálás, vírusvisszanyerés a szennyvíz üledékből, egyéb kereskedelmi forgalomban kapható rendszerek). A vizsgálatok kezdetén a nukleinsav-kivonó kitek elérhetősége is korlátozott volt, emiatt két általános (pl. vérsavóhoz ajánlott) és két széklethez, illetve talajhoz való kitet is teszteltünk. A SARS-CoV-2 mennyiségi kimutatása RT-qPCR reakcióval történt, a CDC által ajánlott N1 primer szett segítségével.

Mivel a szennyvíz minősége jelentős ingadozást mutathat, ezért a hígulás mértékét fekál indikátor (fekális *Enterococcus*) mennyiségi meghatározásával, illetve a szennyvíztelepre beérkező napi szennyvíz térfogat bekérésével követtük.

A megbetegedések számáról a Nemzeti Népegészségügyi Központ által működtetett Járványügyi Szakrendszer (OSZIR – Országos Szakmai Információs rendszer) adatbázisából szereztünk információt (település szintű bontásban), míg a kórházban kezelték számáról az Operatív Törzs hivatalos jelentéseiből (országos összesítésben).

Az eredmények statisztikai értékeléséhez Microsoft Excelt (verzió: 2110) és TIBCO Statistica szoftvert (verzió:14.0.0.15) használtunk. A módszerek összehasonlító értékeléséhez kétmintás párosított t-próbát, míg a szennyvíz SARS-CoV-2 koncentrációinak és a COVID-19 esetszámok összefüggéseinek vizsgálatához lineáris regressziót és Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modellt alkalmaztunk.

## Eredmények és értékelésük

1. A vízzel terjedő kórokozó vírusok (calicivírusok, hepatitis A) kimutatása nem minden esetben adott egyértelmű eredményt. A calicivírus-járvány miatt vizsgált alföldi tó esetében PCR termék nem keletkezett, így feltételezhető, hogy a más közeg közvetítette a fertőzést. A medencék esetében keletkezett ugyan PCR termék a calicivírus kimutatás során, azonban nem pontosan a várt hosszúságban. Ebben az esetben a kétes laboratóriumi eredmény, valamint az egyértelmű epidemiológiai bizonyítékok hiánya miatt sem megerősíteni, sem kizárni nem lehet az esetek víz eredetét. A gyógyvíz kutak esetében PCR termék képződött a calicivírus vizsgálat során, háromból két minta esetében a minta tízszeres hígítása esetében is. Itt az epidemiológiai bizonyítékok mellett a víruskimutatás alapján is megállapítható, hogy a fertőzések forrása minden bizonnyal a gyógyvíz kút volt. A családi hepatitis A halmozódás esetében a vizsgálat nem erősítette meg a víz eredetét, feltételezhető, hogy más úton adták át egymásnak a családtagok a fertőzést.

2. A vízzel terjedő kórokozó vírusok kimutatása környezeti közegből fontos módszer a járvány eredetének tisztázásában, ezért a vizsgálatok további fejlesztése szükséges, elsősorban a kvantitatív meghatározás irányába.

3. A szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatási módszer fejlesztése során számos víruskoncentrálni és nukleinsav-kivonási módszer kipróbálásra került. A munkacsoport által a burok nélküli enterális vírusokra korábban alkalmazott tejporos flokkuláció módszer a burkos SARS-CoV-2-re nem bizonyult megfelelőnek. Csupán két párhuzamos mérés készült ezzel a módszerrel, ezek esetében 0,8, illetve 12% visszanyerést mértünk az azonos mennyiségű, koncentrálni után inokulált kontroll mintához képest. A legjobb eredményeket az ultraszűrési módszerekkel értük el, a kereskedelmi forgalomban kapható Centriprep (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és a SUEZ WTS (Tatabánya, Magyarország) által biztosított egyedi gyártású lapmembrán hasonlóan jó (80, illetve 96%) visszanyerést mértünk. A berendezések beszerezhetőségében, illetve a feldolgozáshoz szükséges munkamennyiségben azonban jelentős eltérések jelentkeztek a lapmembrán javára.

Az eletronnegatív membránnal történő koncentrálni és a pelletből történő vírusvisszanyerés könnyen kivitelezhető és gyors módszereknek bizonyultak, azonban az akkor már rutin módszernél alkalmazott membrán ultraszűrésnél lényegesen alacsonyabb eredményeket adtak valós minták koncentrálni esetén. A kereskedelmi forgalomban kapható víruskoncentrálni kit a minták többségénél (12/18) az ultraszűrési módszerhez hasonló eredményeket adott, 6 minta esetében azonban nagyságrendnyi különbségek jelentkeztek. A hosszú távú hozzáférhetőség, a

vi sszanyerés és a laboratóriumi folyamatok optimalizálása miatt víruskoncentrációs módszerek a lapmembránnal történő ultraszűrést választottuk.

A nukleinsav-kivonási módszer kiválasztása elsősorban azért jelentett kihívást, mert a vizsgálatok kezdetén ezek a kitek is nehezen beszerezhetőnek számítottak. Két általános (pl. vérsavóhoz) és két széklethez, illetve talajhoz javasolt kitet teszteltünk a vizsgálatok során. Annak ellenére, hogy a széklethez, illetve talajhoz ajánlott kitek elméletileg jobb inhibitor-eltávolítási hatásfokkal rendelkeznek, az összehasonlítás során az általános kiteknél alacsonyabb visszanyerést mutattak, emellett a minták feldolgozásához szükséges idő is jóval hosszabb. Emiatt a további vizsgálatokhoz az egyik általános kitet (Viral Mini kit, Qiagen, Hilden, Németország) használtuk.

A módszerbeállítás során sikerült folyamatosan hozzáférhető és nagy mintaszámon is alkalmazható módszert kidolgozni. A választott ultraszűrési módszer megfelelő visszanyeréssel (96%) és érzékenységgel (elvi alsó méréshatár: 1710 GC/L) rendelkezik, amely lehetővé teszi az eredmények járványügyi hasznosítását.

4. A szennyvízben mért SARS-CoV-2 koncentráció és a klinikai esetszámok összevetésére a 2020 júliusa és 2021 októbere közötti időszakot választottam, ebben az időszakban 1738 minta vizsgálata történt meg. Emellett a negyedik hullám pontosabb értékelése érdekében további másfél hónapnyi adatsort felhasználtam (országos átlag alakulása összesen 209 minta alapján).

a. Mivel az egyes eredmények a mintavétel pontatlansága (különösen pontminták esetén) a nem egyenletes kibocsátás és a mérés során fellépő szórás miatt ingadozást mutathatnak, ezért első lépésként szükség volt egy olyan adatfeldolgozási módszer kidolgozására, ami csökkenti ezeket a torzításokat. A szennyvíz nem egyenletes minőségének és hígulásának hatását az adatok normalizálásával (a napi szennyvíz mennyiség figyelembevétele, illetve a fekália tartalom alapján a fekális *Enterococcusok* mennyiségének meghatározásával) igyekeztünk csökkenteni. A mintavételből, illetve a mérésből fakadó bizonytalanságok hatását 3 pontos mozgóátlag alkalmazásával mérsékeljük. Ezután megvizsgáltuk a különböző módszerekkel feldolgozott szennyvíz SARS-CoV-2 genomkópiaszámok, illetve az adott szennyvíztisztító ellátási területén jelentkező új COVID-19 megbetegedések korrelációját (lineáris regresszió). A szennyvíz adatok a legerősebb összefüggést a logaritmikusan transzformált, fekális *Enterococcus* csíraszámra normalizált adatok 3 pontos mozgóátlagával adta.

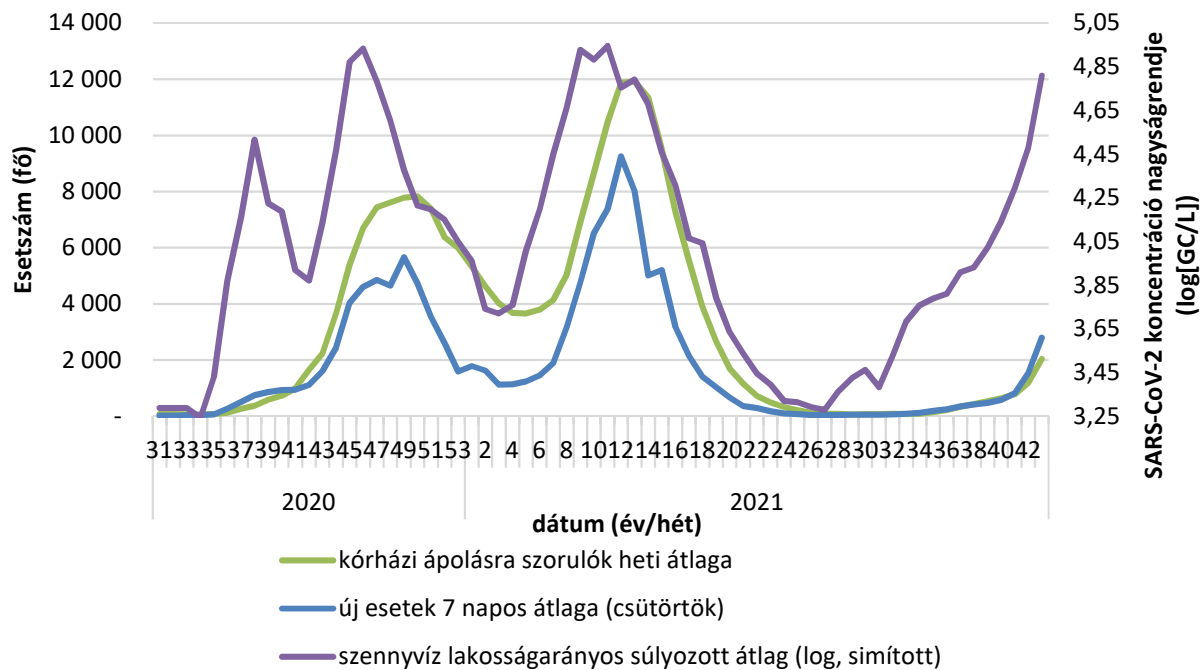
Az így kidolgozott normalizálási és simítási módszert alkalmazva az adatok a legtöbb vizsgált nagyvárosban erős összefüggést mutatnak az új és aktív COVID-19 esetszámokkal. Pearson-korrelációt vizsgálva az  $r^2=0,75 - 0,42$ ; 0,5 alatti érték mindössze három városban figyelhető

meg. Az összefüggés minden esetben szignifikáns ( $p < 0,05$ ). Az egyes megyeszékhelyek eredményei között azonban jelentős különbségek is tapasztalhatóak. Az eltérés okait keresve azt találtuk, hogy az automata átlag mintavételt alkalmazó szennyvíztisztítók mindegyike viszonylag jó eredményt adott (Pearson-korreláció,  $r^2 = 0,75 - 0,58$ ). Azonban a pontmintavételt alkalmazó szennyvíztelepek között is találunk hasonlóan jó összefüggést, a 15 pontmintavételt alkalmazó telep közül 10 esetben a korreláció a fenti tartományba esik. A vizsgált megyeszékhelyek, illetve szennyvíztelepek egyéb jellemzőit összehasonlítva a lakosságszám hatását kizártuk, mivel a legnagyobb városok közül is találunk olyat, ahol az eredmény kevésbé megbízható (pl. Debrecen esetében). Felmerült annak a lehetősége, hogy az eredményt a mintavétel pontos helye is befolyásolhatja, azonban az üzemeltetőkkel folytatott egyeztetés alapján mindenhol ugyanazt a pontot, a durvarács utáni nyers szennyvizet mintázták. Feltehető, hogy az eltéréseket gátló anyagok jelenléte, időszakos ipari szennyezés, vagy más hatás okozhatja, ennek felderítéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

b. A szennyvizek SARS-CoV-2 kópiaszáma és a klinikai adatok közötti időbeli összefüggés vizsgálatára Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modellt alkalmaztunk. A modellel meghatározható, hogy a különböző késleltetési idők milyen hatással vannak a függő változóra. Az országos átlagot tekintve a szennyvíz eredmények az új esetek számával egy, míg a kórházi esetszámokkal két hetes eltolással mutatják a legerősebb összefüggést (1. ábra). Az egyes városokban csak az új esetek számáról álltak rendelkezésre pontos adatok, az összefüggés a legtöbb város esetében itt is egy hetes eltolással volt a legerősebb, bár sok esetben a két hetes eltolás is hasonlóan erős összefüggést mutatott.

c. A pandémia hazai második, harmadik és negyedik hullámát tekintve a szennyvíz eredmények és a klinikai adatok közötti összefüggést számos tényező befolyásolta. A fertőzöttek átlagos életkora főleg a második hullám felfutó szakaszában jelentősen alacsonyabb volt, mint a későbbiekben. A fiatal fertőzöttek körében gyakoribb a tünetmentes vagy enyhe tünetes megbetegedés, így általában aluldiagnosztizáltak. A domináns SARS-CoV-2 variáns tulajdonságai mind az egy fertőzöttre jutó átlagos vírusürítést, mind a fertőzés súlyosságát képes befolyásolni, ami szintén hatással van a regisztrált fertőzöttek száma és a szennyvíz eredmények közti összefüggésre. A tesztelési stratégia szintén sokat változott a vizsgált másfél év alatt. Míg 2020 őszen a vizsgálatokat az érzékeny, de laboratóriumi feldolgozást igénylő, így hosszadalmas PCR teszttel végezték, addig 2021 első felétől kezdve fokozatosan nőtt a jóval gyorsabb eredményt adó antigén-gyorsteszték aránya, ami jelentősen rövidíthette a tünetek megjelenése és a diagnózis elkészülte közti időt. Az átoltottság a harmadik hullám végére elérte a 60%-t, ami mérsékelte a járvány terjedését és csökkentette az esetleges

fertőzöttek tüneteit. A szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszámok országos átlaga és az új, valamint kórházi kezelést igénylő COVID-19 esetszámok közötti összefüggést vizsgálva azonban azt találtuk, hogy a három vizsgált járványhullám esetében trendszerű eltolódás nem figyelhető meg az előrejelző képességben.



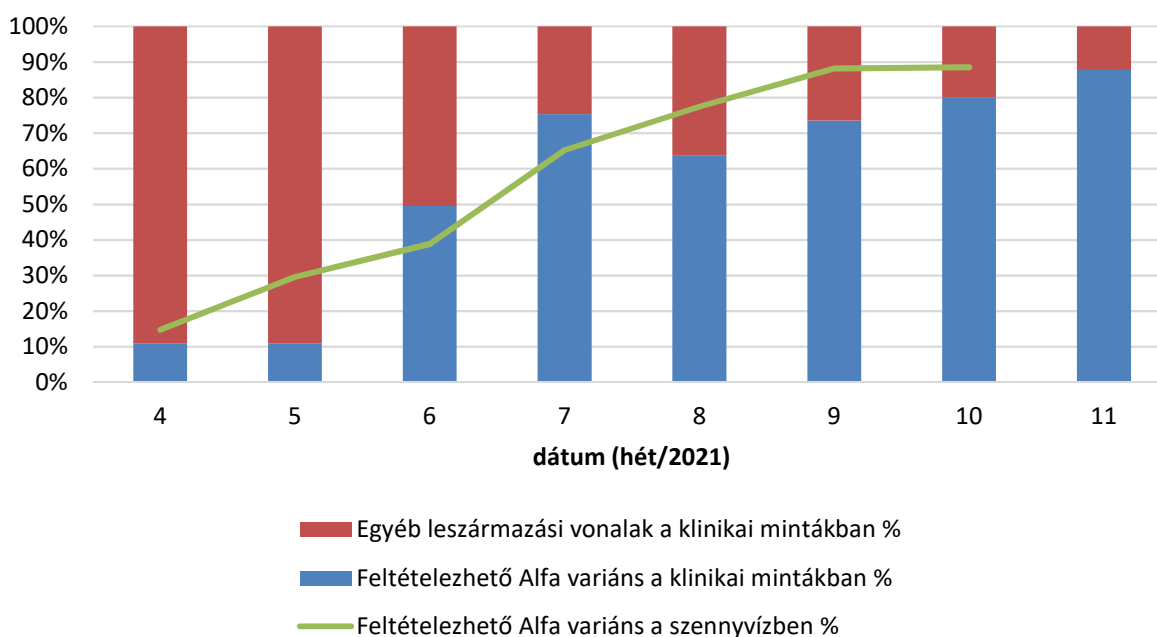
1. ábra: Szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények lakosságarányos súlyozott átlaga (*Enterococcusra* normalizálva, 3 pontos simítást alkalmazva), valamint az új és kórházi kezelést igénylő COVID-19 esetszám alakulása 2020. 08. 01. és 2021. 10. 31. között

d. Annak ellenére, hogy a szennyvíz és a humán adatok hasonló időközökkel követték egymást az egyes járványhullámokban, a szennyvizek azonos SARS-CoV-2 kópiaszámához a különböző járványhullámokban jelentősen különböző ismert esetszám értékek tartoztak. Így a szennyvíz eredmények önmagukban sem az új fertőzöttek, sem a kórházi kezelésre szoruló pontos számának meghatározására nem elégségesek, mivel ezeket a mutatókat a járvány egyéb tényezői (pl. a megbetegedettek átlagéletkora, a jellemző vírusvariánsok és a lakosság immunitása) is jelentősen módosítják.

5. A keringő vírusvariánsok azonosítását ddPCR módszerrel végeztük a szennyvízből. A módszer előnye, hogy gyors, számszerű eredményeket ad a vizsgált variánsok legjellemzőbb mutációiról. A vizsgálatokat az alfa variáns esetében végeztük el, a budapesti minták esetében 2020. december elejétől, míg a többi megyeszékhely esetében 2021. január közepétől 2021. március közepéig (az első ismert hazai esetet 2021. január közepén azonosították). A 2020-ban vett minták egy része gyengén pozitívnak bizonyult a vizsgált mutációkra (N501Y és delH69/V70), azonban ezek a mutációk más leszármazási vonalakban is megtalálhatóak



lehetnek, így nem tekinthetők egyértelmű bizonyítéknak az alfa variáns előfordulására. 2021 januárjától kezdődően az eredmények szoros korrelációt mutattak a variánsok klinikai mintákban megfigyelt arányával (Pearson-korreláció,  $R=0,921$ ,  $p<0,05$ ; 2. ábra). A ddPCR módszer hátránya azonban, hogy csak ismert mutációk kimutatására alkalmas és az újabb variánsok kimutatásához az új, jellemző mutációk kimutatására tervezett oligonukleotidok kellenek; ezek beszerzése pedig időigényes. A variánsok azonosításának legmegbízhatóbb módszere az újgenerációs szekvenálás, ez azonban komplex környezeti minták esetében további módszerfejlesztést igényel.



2. ábra: Két mutáció (N501Y és del H69/V70) jelenléte alapján feltételezhető SARS-CoV-2 alfa variáns előfordulásának változása 2021. 4. és 11. hete között (január közepe – március második fele) a szennyvíz mintákban és az NNK COVID laboratórium által vizsgált klinikai mintákban

6. A gyakorlati hasznosítása szempontjából elengedhetetlen a szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények hatékony kommunikációja a döntéshozók és a lakosság felé. A hazai adatokat elsősorban az egészségügyi ellátórendszer várható terhelésének előrejelzésére használtuk, a heti két adatközlés a pandémia súlyosabb hullámaiban rendkívül fontos információnak számított. A nyilvános kommunikáció széles közönséghez eljutott, a sajtóban is gyakran idézték, így fontos szerepet játszott a lakosság figyelmének felkeltésében.

## Publikációk

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

- Róka, Eszter, Bernadett Khayer, Zoltán Kis, Luca Bella Kovács, Eszter Schuler, Nóra Magyar, Tibor Málnási, és mtsai. 2021. „Ahead of the Second Wave: Early Warning for COVID-19 by Wastewater Surveillance in Hungary”. *Science of The Total Environment* 786 (szeptember): 147398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147398>.
- Róka, Eszter, Dániel Déri, Bernadett Khayer, Zoltán Kis, Eszter Schuler, Nóra Magyar, Bernadett Pályi, Tamás Pándics, és Márta Vargha. 2022. „SARS-CoV-2 Variant Detection from Wastewater: Rapid Spread of B.1.1.7 Lineage in Hungary”. *Journal of Water and Health*, január, jwh2022179. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.179>.
- Róka Eszter, Khayer Bernadett, Kis Zoltán, Kovács Luca Bella, Magyar Nóra, Málnási Tibor, Oravecz Orsolya, Pályi Bernadett, Pándics Tamás, Schuler Eszter, Vargha Márta. 2021. „A járványkezelés új eszköze: a szennyvíz alapú epidemiológia”. *Vízügyi Közlemények* 103 (2) 187-206.
- Navarro, Anna, Livia Gómez, Isabella Sanseverino, Magdalena Niegowska, Eszter Roka, Rosalba Pedraccini, Marta Vargha, és Teresa Lettieri. 2021. „SARS-CoV-2 Detection in Wastewater Using Multiplex Quantitative PCR”. *Science of The Total Environment* 797 (november): 148890. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148890>.
- Pándics, Tamás, Eszter Róka, Bernadett Khayer, Zoltán Kis, Luca Bella Kovács, Nóra Magyar, Tibor Málnási, és mtsai. 2021. „A szennyvíz alapú epidemiológia jelentősége a COVID-19 járványban és azon túl”. *Scientia et Securitas* 2 (1): 30–37. <https://doi.org/10.1556/112.2021.00005>.
- Pándics Tamás, Róka Eszter, Henczkó Judit, Khayer Bernadett, Kis Zoltán, Málnási Tibor, Pályi Bernadett, Schuler Eszter, Vargha Márta. „A hazai szennyvíz alapú COVID-19 előrejelző rendszer - másfél év tanulságai” *Közlésre elfogadva: Népegészségügy*