

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar

Környezettudományi Doktori Iskola

Környezetbiológia Program

VÍRUSMONITORING KÖRNYEZETI VIZEKBEN –
ÚJ UTAKON A JÁRVÁNYTANBAN

Doktori értekezés

Róka Eszter



Doktori Iskola vezetője: Dr. Turányi Tamás

Programvezető: Dr. Tóth Erika

Témavezető: Dr. Vargha Márta

Nemzeti Népegészségügyi Központ

Közegészségügyi Laboratóriumi Főosztály, Budapest

2022

Tartalom

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Bevezetés	5
3.	Irodalmi áttekintés	7
3.1	Vízzel terjedő kórokozó vírusok.....	7
3.1.1	Calicivírusok.....	9
3.1.2	Hepatitis A.....	10
3.2	Szennyvíz alapú epidemiológia	11
3.3	A 2020-ban kezdődött koronavírus világjárvány	14
3.3.1	Koronavírusok, korábbi járványok	14
3.3.2	COVID-19	15
4.	Célkitűzések.....	25
5.	Anyag és módszer.....	26
5.1	Enterális járványok kivizsgálása	26
5.1.1	Mintavételi helyek	26
5.1.2	Víruskoncentráció	27
5.1.3	Nukleinsav-kivonás	28
5.1.4	Folyamatkontrollok	28
5.1.5	Polimeráz láncreakció.....	28
5.1.6	Járványügyi adatok	32
5.2	Országos COVID-19 előrejelző rendszer	32
5.2.1	Mintavételi helyek	32
5.2.2	Víruskoncentráció	35
5.2.3	Folyamatkontrollok	38
5.2.4	Nukleinsav-kivonás	38
5.2.5	Mennyiségi RT-PCR	39
5.2.6	Digitális droplet PCR (ddPCR)	40

5.2.7 Járványügyi adatok	41
5.2.8 A szennyvíz minőségi jellemzői, normalizálási módszerek.....	41
5.2.9 Statisztikai értékelés	42
6. Eredmények és értékelésük	43
6.1 Enterális járványok kivizsgálása	43
6.1.1 Calicivírus járványok kivizsgálása	43
6.1.2 Hepatitis A halmozódás kivizsgálása	46
6.1 Az alkalmazott SARS-CoV-2-kimutatási módszerek összehasonlító értékelése .	46
6.1.1. Víruskoncentrálási módszerek.....	46
6.1.2 Nukleinsav-kivonási módszerek összehasonlítása	54
6.1.3 A SARS-CoV-2 RT-qPCR módszer jellemzői.....	56
6.1.4 A kiválasztott módszerek jellemzői.....	56
6.4 COVID-19 előrejelző rendszer eredményei	58
6.4.1 Normalizálási módszerek összehasonlítása	58
6.4.2 Összefüggés a klinikai adatokkal	61
6.4.3 Az országos átlag előrejelző képessége.....	68
6.4.4 Előrejelzés hatékonysága az egyes járványhullámokban	71
6.5 SARS-CoV-2 mutációs vizsgálatok eredményei.....	76
6.6 A szennyvíz alapú COVID-19 előrejelző rendszer eredményeinek gyakorlati hasznosulása a járványkezelésben.....	82
7. Következtetések.....	85
8. Összefoglalás	87
9. Summary.....	89
10 . Köszönetnyilvánítás.....	90
11. Irodalomjegyzék	91
12. Függelék	100

1. Rövidítések jegyzéke

ACE-2	angiotenzin-konvertáló enzim (angiotensin-converting enzyme)
bp	bázispár
CDC	az Amerikai Egyesült Államok járványügyi hatósága (Centers for Disease Control and Prevantion)
COVID-19	koronavírusos megbetegedés 2019 (coronaviral disease 2019)
Ct	a fluoreszcencia küszöbértéke (cycle treshold)
ddPCR	digitális cseppecske polimeráz láncreakció (digital droplet polimerase chain reaction)
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
E	burok (envelope)
GC	genom kópia (genime copy)
H1N1	haemagglutinin 1 és neuraminidáz 1 szerotípus (influenza)
HAV	hepatitis A vírus
kb	kilobázis
MERS-CoV	közel-keleti légzőszervi szindróma koronavírus (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus)
MPN	legvalószínűbb szám (most probable number)
N	nukleokapszid
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
PEG	polietilén-glikol
PMMoV	a paprika enyhe foltosodását okozó vírus (pepper mild mottle virus)
q-PCR	kvantitatív polimeráz láncreakció (quantitative polimerase chain reaction)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
RT-qPCR	reverz transzkripció és polimeráz láncreakció (reverse transcription, polimerase chain reaction)
S	tüske fehérje (spike)
SARS-CoV-2	súlyos légzőszervi tünet együttest okozó koronavírus 2 (severe acut respiratory syndrome coronavirus 2)
VTM	vírus transzport médium
VOC	aggodalomra okot adó variánsok (variants of concern)
VOI	érdeklődésre számot tartóvariánsok (variants of interest)
VUM	megfigyelés alatt álló variánsok (variants under monitoring)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation)

2. Bevezetés

A járványok már a kezdetektől végigkísérték az emberi történelmet, az egyre fejlettebb társadalmakban, nagyobb népesség együttélésével pedig fokozódó problémát jelentenek. Egy helyi járvány (pl. az ivóvízhálózat szennyeződése révén) is akár milliós populációt érinthet, míg a közelmúltban megtapasztalhattuk, hogy a globalizáció következtében egy új kórokozó nagyon hamar, mindössze egy-két hónap alatt képes világjárványt okozni.

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 már a mikrobiológiai vizsgálatok is segítséget nyújtanak: a kórokozó kimutatása a környezeti közegből döntő bizonyítéknak számít. Korábban ez a vírusok esetében az alacsony környezeti koncentráció és a tenyésztés nehézségei miatt komoly kihívást jelentett, az első módszerek akár több ezer liternyi minta feldolgozását igényelték. A vizekből történő víruskimutatás így nem tudott a napi járványügyi munkában alkalmazott gyakorlattá válni; megmaradt néhány mintára kiterjedő alapkutatásnak. A molekuláris biológiai módszerek megjelenése azonban ezen a téren is robbanásszerű fejlődést indított be, hiszen nagyon érzékeny és specifikus kimutatást tesznek lehetővé, jelentős háttérszennyezettség mellett is. A nukleinsav-alapú kimutatási módszerek fejlődése mellett a másik fontos tényező a víruskoncentrálási módszerek fejlődése. Utóbbi döntő jelentőségét az adja, hogy a vírusok többsége esetén alacsony fertőzési dózissal kell számolni, így már kevés víruspartikulum jelenléte is jelentőséggel bír. Az utóbbi évtizedekben számos módszer kidolgozásra került, így lehetőség van az adott víztípushoz, kórokozóhoz és laboratóriumi igényekhez legjobban megfelelő módszer kiválasztására.

A ma elérhető, korszerű vizsgálati módszerek segítségével a környezeti vizekből történő víruskimutatás már a járványügyi munka részévé válhat, egy esetleges járvány gyanúja esetében lehetőség van a fertőzőforrás gyors azonosítására.

A fejlett világban ugyan a víz eredetű megbetegedések a fejlett ivóvízellátás, a szennyvízkezelés egyre szélesebb körű terjedése és a rekreációs célokat szolgáló vizek lehetőség szerinti kezelése következtében egyre ritkábban fordulnak elő, jelentőségük azonban így sem elhanyagolható. Hazánkban az utóbbi években is több olyan esetről szerzett tudomást a népegészségügyi hatóság, ahol felmerült a víz, mint terjesztő közeg szerepe.

Ilyen esetekben a járványügyi kivizsgálás részét képezi a potenciális fertőzőforrást jelentő víz vizsgálata a megbetegedésekért felelős kórokozó(k)ra.

Egy járvány esetében azonban akkor is hasznos lehet a víz vizsgálata, ha nem elsődlegesen víz által közvetített fertőzés felderítéséről van szó. A kommunális szennyvíz minden, a szennyvíztelep által ellátott területen élő lakos mintáját összegyűjti, így bármilyen széklettel, vizelettel vagy egyéb módon a csatornába kerülő kórokozó (vagy kémiai ágens) előfordulásáról képet kaphatunk a szennyvíz vizsgálatával. A módszer előnye, hogy kevés minta vizsgálatával nagyszámú populációról kaphatunk reprezentatív képet, a mintavétel aránylag könnyen megszervezhető, és nem torzítják olyan hatások, mint pl. az egészségügyi ellátórendszer fejlettsége az adott területen vagy a lakosság részvételi hajlandósága a klinikai diagnosztikai vizsgálatokban.

A 2019-ben kezdődött COVID-19 világjárvány régóta nem látott kihívások elé állította az egészségügyet. A járványügyi korlátozások elrendezéséhez vagy lazításához, illetve az egészségügyi kapacitások tervezéséhez szükséges volt a megbetegedésszámok pontos előrejelzése. A matematikai modellek ugyan hosszútávú előrejelzésekre is alkalmasak lehetnek, megbízhatóságuk azonban – különösen a járvány kezdetén – a hiányos információk miatt limitált volt. A szennyvíz alapú epidemiológia rövidebb távú, de pontosabb, mérés alapú előrejelzést képes nyújtani az esetszám alakulásáról. Bevezetése ezért hazánkban is szükséges volt, eredményei pedig szinte azonnal felhasználásra kerülhettek a járványügyi intézkedésekben.

2020. második felétől a SARS-CoV-2 új, aggodalomra okot adó variánsai kerültek a figyelem középpontjába, mivel a járvány újabb hullámai ekkor már elsősorban az újabb variánsok felbukkanásához kötődtek. Az új fertőzöttek azonosítása jelentős szervezést igényel, a keringő vírusvariánsok nyomon követése azonban ennél is nagyobb kihívást jelent, a szennyvíz alapú epidemiológia azonban az új variánsok kimutatásában is segítségére lehet a járványügynek.

A megfelelően szervezett és kivitelezett szennyvíz alapú epidemiológiai vizsgálatok része az eredmények hatékony és gyors közlése a járványügyi hatósággal és a lakossággal. Így a keletkezett adatok hozzájárulhatnak a járványügyi döntések meghozatalához, valamint a lakosság tudatossága is növelhető.

Doktori dolgozatom fókuszában olyan vizsgálati módszerek kidolgozása és alkalmazása áll, amelyek segítségével különböző kórokozó vírusok mutathatóak ki vizes közegből (ívó- fürdő- vagy szennyvízből) járványok felderítése vagy terjedési dinamikájuk jellemzése céljából.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Vízrel terjedő kórokozó vírusok

Az emberiség történetének nagy részében a széklet-száj útján terjedő fertőzések rendkívül súlyos problémát jelentettek. A fejlődő országokban több mint 770 millió ember továbbra sem jut megfelelő, biztonságos ivóvízhez, a víz által terjesztett fertőzésekről pedig még a fejlett országokban sem felejtkezhetünk el teljesen (World Health Organization és United Nations Children's Fund (UNICEF) 2021).

Az Európai Járványügyi Központ (ECDC) definíciója szerint vízjárványról beszélhetünk, ha két vagy több személy azonos forrásból származó ivóvíz elfogyasztását vagy azonos vízzel (pl. rekreáció vagy munkavégzés közben) érintkezve betegedik meg. Akkor is vízjárványra van gyanú, ha a meghatározott tünetekkel jelentkező esetek száma meghaladja az adott helyen és időszakban várható és a megbetegedések víz eredetű expozícióval összefüggésbe hozhatók. A járvány felderítéséhez nélkülözhetetlen az anamnézis felvétele: a megbetegedettek kikérdezése a fogyasztott vízről vagy élelmiszerekről, valamint a tünetek kezdetének dokumentálása. Vízjárvány esetében jellemzően nagyszámú, közel egy időben kezdődő megbetegedés jelentkezik. A legerősebb (de önmagában nem elégséges) bizonyíték, ha egyazon kórokozó a betegekben és az általuk fogyasztott vagy felhasznált vízben is megtalálható, emellett leíró vagy számszerű epidemiológiai vizsgálatok eredményét, valamint az esetleges vízkezelési hiányosságok meglétét is figyelembe kell venni (ECDC 2012).

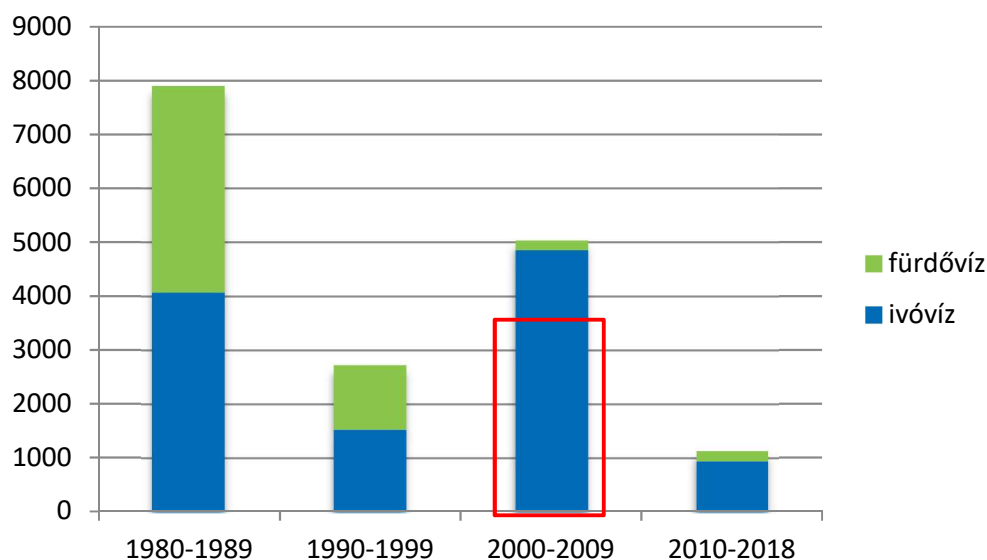
Az Amerikai Egyesült Államokban működő CDC (Centers for Disease Control and Prevention) jelentése szerint még 2013-2014-ben is 42 ivóvíz okozta járványt jelentettek az ország területén, amely több mint 1000 megbetegedést okozott, ebből 124-en szorultak kórházi kezelésre, 13 beteg pedig elhunyt. Az egyértelműen hálózati ivóvíz okozta megbetegedések nagy részét az egysejtű *Cryptosporidium*, illetve *Giardia* (29%), illetve a *Legionella* baktérium okozta (13%) (Benedict és mtsai. 2017).

A WHO páneurópai régiójáról készült jelentés (a régió Európa mellett Közép-Ázsiát és a kaukázusi régiót is tartalmazza) a bizonyítottan vízeredetű megbetegedések mellett minden olyan megbetegedésről beszámol, ahol a víz is szerepet játszhatott a terjedésben (Kulinkina és mtsai. 2016). Ennek oka, hogy az egyes országokban az egyes fertőzések és járványok kivizsgálása eltérő hatékonysággal zajlik. A jelentés szerint a vírusos gasztroenteritiszek és a hepatitis A leggyakoribb, potenciálisan vízzel terjedő megbetegedések, ugyanakkor a bakteriális (*E. coli*, *Shigella* vagy *Campylobacter* okozta megbetegedések) vagy egysejtű

(*Cryptosporidium* és *Giardia*) okozta fertőzések is előfordulnak a régió valamennyi országában. A WHO becslése szerint ezen megbetegedések kb. 18%-a köthető ivó- vagy fürdővíz eredetű, bár az arány természetesen országonként változhat.

Bár a vízjárványokkal kapcsolatban az ivóvízhálózatok által közvetített fertőzésekre gondolunk elsősorban, emellett nem elhanyagolhatóak a nem megfelelő hozzáférésekből eredő kockázatok sem. Hazánkban becslések szerint a lakosság 99%-a hozzáfér ellenőrzött hálózati ivóvízhez, ebbe a számba azonban a közkifolyókból vagy egyéb módon ivóvízhez jutók is beletartoznak, a lakáson belül a népesség kb. 95%-a fér hozzá vezetékes vízhez. Emellett nehéz felmérni azok arányát, akik a kiépített vízhálózatra nem kötnek rá, hanem saját kút vizét használják, elsősorban szociális okokból (NNK, 2021).

Magyarországon a bizonyítottan ivóvíz eredetű megbetegedések száma évtizedek óta alacsony (1. ábra). Az utolsó, nagy valószínűséggel ivóvíz eredetű járványt 2018-ban azonosították a Heves megyei Domoszló és Kiskanána településeken, a két településen összesen 200 lakosnál fordultak elő enterális panaszok. A vízhálózatról enterális kórokozó *Campylobacter* jelenlétét mutatták ki az észlelt megbetegedések után vett mintában, kórokozó vírusok irányában azonban nem történt vizsgálat (NNK, 2020).



1. ábra: a bizonyítottan víz eredetű megbetegedések számának alakulása hazánkban 1980-tól, évtizedenkénti bontásban. A 2000-es évek kiugrását egyetlen járvány, a miskolci ivóvízjárvány okozta (piros kerettel jelölve). Forrás: Nemzeti Népegészségügyi Központ, Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály

Az utóbbi évek legnagyobb és részletesen vizsgált hazai vízjárványa a 2006-os miskolci ivóvízjárvány volt. A járvány során összesen 3 673 megbetegedést jegyeztek fel, a fertőzöttek közül 161 fő szorult kórházi ellátásra. A vizsgálatok az egysejtű *Cryptosporidium* sp. és *Giardia* sp. jelenlétét mutatták ki a vízmintákból, emellett vírusok jelenlétét is vizsgálták. Adenovírus és norovírus jelenlétét ELISA módszerrel sikerült kimutatni, az RT-

PCR módszer azonban nem erősítette meg a norovírus I vagy II genocsoportjának jelenlétét, valamint hepatitis A-t sem mutatott ki. (Dura és mtsai. 2010).

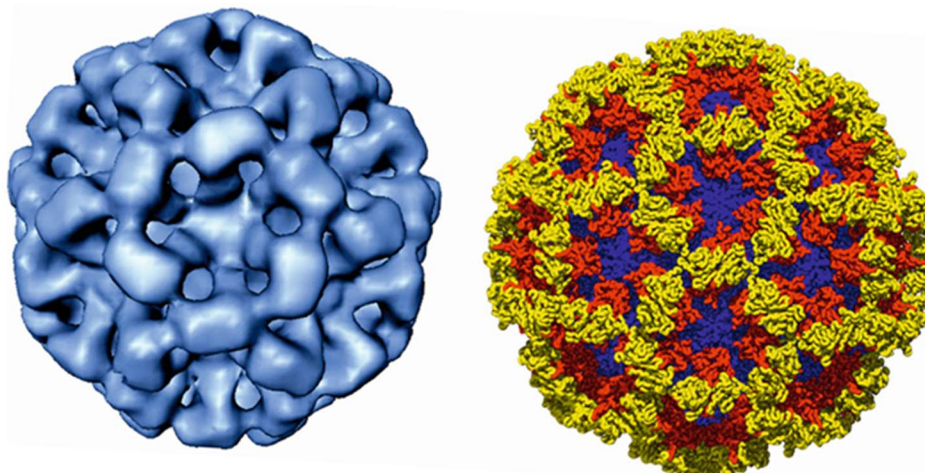
A környezeti vizsgálatok rendkívül fontosak a járványok víz eredetének megerősítése vagy kizárása szempontjából. A továbbiakban a leggyakoribb, víz által is terjedő kórokozók, a calicivírusok és a hepatitis A tulajdonságait tekintem át.

3.1.1 Calicivírusok

A *Caliciviridae* családba jelenleg hét emlősöket, két madarakat és két halakat fertőző nemzetség tartozik. A csoport tagjai fajspecifikus megbetegedést okoznak, emberi kórokozók a *Norovirus* és *Sapovirus* nemzetségben találhatóak (Vinjé és mtsai. 2019) Világszerte a calicivírusok okozzák a hányásos-hasmenéses megbetegedések legnagyobb részét (Patel és mtsai. 2009). A sapovirusok elsősorban 5 évnél fiatalabb gyermekek körében okoznak megbetegedést, míg a norovírusok jóval gyakoribbak, és minden korosztályban fertőznek. Bár a betegség lefolyása általában enyhe, a magas esetszám miatt mégis jelentős egészségügyi terhet jelentenek (Rockx és mtsai. 2002).

A család tagjai pozitív, egyszálú, nem fragmentált RNS genommal rendelkeznek, a genom mérete 6,4 – 8,5 kilobázis (kb) között mozog az egyes csoportokban. A virion burok nélküli, 27–40 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriát mutat (2. ábra). A gasztroenterális úton terjedő calicivírusok a környezetben hosszú ideig fertőzőképesek maradnak és ellenállnak a gyomorsavnak (Vinjé és mtsai. 2019)

A norovírus fertőzések a mérsékelt éghajlaton elsősorban téli szezonaritást mutatnak. A megbetegedés jellemző tünetei 24-48 órás lappangási idő után jelentkeznek hányással és hasmenéssel, 2-3 nap után jellemzően spontán gyógyulnak (Patel és mtsai. 2009).



2. ábra: egy calicivírus virion (*Norwalk virus*) felépítése. A kis méretű (27–40 nm átmérőjű), burok nélküli vírus ikozahedrális szimmetriát mutat (Vinjé és mtsai. 2019)

A norovírusokat a virális gastroenteritisz járványok leggyakoribb okaként tartják számon, így előfordulásukkal kapcsolatban sok adat áll rendelkezésre. Nyers szennyvízben magas kópiaszámban fordulnak elő, átlagosan a $10^4 - 10^5$ GC/L (genom kópia/liter) tartományban. Az I. genocsoportba tartozó norovírusok átlagos kópiaszáma valamivel kisebb, mint a II. genocsoporté, de mindkettő magasabb koncentrációt mutat a téli/tavaszi szezonban (Eftim és mtsai. 2017).

A vírusok a szennyvízből a felszíni vízbe, majd az ivóvizet szolgáltató vízbázisokba is bejuthatnak. Világszerte a vízbázisok 32%-ában találtak norovírusokat, az eredmények természetesen vízadó típusonként jelentősen eltértek: felszíni vízadók közül leggyakrabban a folyóvizekben fordul elő (44%), míg tavakból csupán 2,2%-ban írták le. Az alacsony és közepes jövedelmű országok esetében jóval nagyobb arányban mutatható ki a vízadókban, mint a magas jövedelmű országok esetében (Ekundayo és mtsai. 2021), ami feltehetően a jobb szanitációval magyarázható.

A norovírusok számos víz és élelmiszer eredetű járvány esetében bizonyultak kóroki ágensnek. 2012-ben Hollandiában legalább 100 megbetegedést hoztak összefüggésbe egy tóban való fürdözéssel, a norovírus I genocsoportját később a tóparti homokos talajban is kimutatták, a vízből azonban nem sikerült azonosítani a vírust (Schets és mtsai. 2018). 2016-ban Spanyolországban palackozott ásványvíz okozott jelentős kiterjedésű járványt (Guix és mtsai. 2019). Élelmiszerek közül tengerparton tenyésztett, a szennyezett vízből vírust akumuláló kagylók jelentenek gyakori közvetítő közeget (Chenar és Deng 2018).

A fertőző dózis pontos megállapítása a vírus szövettenyésztésen való szaporításának nehézségei és az állati modell hiánya miatt nehézkes. Feltételezhető azonban, hogy már 10 és 100 közötti víruspartikulum is képes fertőzést kiváltani (Yezli és Otter 2011). Egy '90-es években végzett kutatás szerint 50 fő, 48 – 48 000 GC norovírusnak kitett önkéntes 82%-ánál alakult ki fertőzés (ebből 68% tünetes, míg 32% tünetmentes), a fertőzés kialakulását a korábbi fertőzésből szerzett szeropozitivitás nem befolyásolta érdemben (Graham és mtsai. 1994).

3.1.2 Hepatitis A

Vírusos májgyulladást több, egymástól filogenetikailag és terjedési módban is jelentősen eltérő vírus okoz. Gastroenterális úton a hepatitis A és E vírus fertőz, az akut virális hepatitisek leggyakoribb okozója a hepatitis A vírus (HAV) (Shin és Jeong 2018).

A hepatitis A vírus a *Picornaviridae* család *Hepatovirus* nemzetségébe tartozik. A nemzetség élesen elkülönül a család többi képviselőjétől, kizárólag az emberi HAV és

néhány közel rokon emlős hepatitisz vírus tartozik ide. A vírus örökítőanyaga pozitív, egyszálú RNS, a genom mérete 7,5 kb. Az apró, burok nélküli, ikozahedrális szimmetriát mutató virion átmérője 27 nm (Lemon és mtsai. 2018).

A gyermekek a fertőzést az esetek többségében (>70%) tünetmentesen vészelik át, míg felnőttek 70%-nál magasabb arányban alakulnak ki tünetek a fertőződést követően. A HAV okozta hepatitisz tünetei általában lázzal, rossz közérzettel, hányingerrel, hányással, sötét színű vizelettel és alhasi fájdalommal kezdődnek, a betegség általában 2-8 hétig tart. A parenterális úton terjedő hepatitisz vírusok okozta megbetegedéssel ellentétben krónikus megbetegedés nem alakul ki. A norovírusokkal ellentétben a fertőzés után hosszan tartó és hatékony immunitásra lehet számítani. (Shin és Jeong 2018).

A vírus ugyan magas kópiaszámban ürül széklettel, a tanulmányok azonban a fejlett országokban nem minden szennyvízmintában volt jelen kimutatható mennyiségben. Franciaországban végzett vizsgálatok alapján az egy év alatt vett nyers szennyvíz minták felében volt jelen HAV mérés határ feletti koncentrációban (Bisseux és mtsai. 2018), míg az Egyesült Királyságban vett szennyvíz minták közül mindegyik negatívnak bizonyult (Farkas és mtsai. 2018). Egy a Közel-Kelet és Észak-Afrika országait vizsgáló metaanalízis eredménye arra utalhat, hogy a fertőzés nem elsősorban ivóvízzel terjed: a vizsgált országokban a vezetékes ivóvízhez és a szanitációhoz való hozzáférés nem volt szignifikáns kapcsolatban a HAV szeropozitivitáshoz, ellenben szocio-ökonómiai tényezők (pl. GDP) igen (Koroglu és mtsai. 2017).

A norovírusokhoz hasonlóan a HAV is igen ellenálló a környezeti hatásokkal szemben jól bírja a viszonylag magas (60-80°C) hőmérsékletet és a kiszáradást is. Környezeti vizekben, talajban és kagylókban hónapokig fertőzőképes maradhat. A fertőző dózisiról ennek a vírusnak az esetében is kevés konkrét ismeretünk van, 10 és 100 fertőző vírusrészecske közötti értékre becslik (Yezli és Otter 2011).

3.2 Szennyvíz alapú epidemiológia

A korábbiakban áttekintettük, hogy a víz hogyan játszhat szerepet terjesztő közegként bizonyos kórokozó vírusok esetében. A víz azonban nem csak, terjesztő közegként lehet releváns a különböző megbetegedésekkel összefüggésben. A szennyvíztelepekre befolyó szennyvíz nagyszámú lakos mintáját gyűjt össze, így számos olyan anyag megjelenik benne, amely széklettel, vizelettel vagy egyéb módon (pl. fürdéskor, mosás közben ruhákról) a csatornába juthat (Sims és Kasprzyk-Hordern 2020).

Számos módszer létezik annak feltérképezésére, hogy egy adott betegség milyen arányban fordul elő egy közösségben. A hagyományos módszerek (pl. a regisztrált megbetegedések esetszámának nyomon követése, klinikai surveillance) erősen függenek az adott területen jellemző egészségügyi ellátási rendszertől. Az influenzajárvány nyomon követésére hazánkban is régóta használt sentinel rendszer, amelyben az orvosok egy része mintát küld be laboratóriumi vizsgálatra minden gyanús betegről, sem független ettől a hatástól. További probléma, hogy ritka, újonnan terjedő betegségek esetében csak nagy késéssel alkalmazható. A szennyvíz alapú epidemiológia ezeket a problémákat igyekszik áthidalni (Sims és Kasprzyk-Hordern 2020).

A szennyvíz alapú epidemiológia (angolul: wastewater-based epidemiology, WBE) kezdeteit a legtöbbször egy 2001-es tanulmánytól (Daughton 2001) számítják, ahol a szennyvízben kimutatható illegális kábítószer-maradványokat vizsgálták abból a célból, hogy feltérképezzék a területen jellemző kábítószer-fogyasztási trendeket. A következő húsz évben a drogfogyasztási trendek vizsgálata mellett számos egyéb célra is használták a módszert, pl. antibiotikum-rezisztencia elterjedésének vizsgálatára, stresszmarkerek szintjének, valamint kórokozók elterjedésének ellenőrzésére (Sims és Kasprzyk-Hordern 2020).

A COVID-19 járvány előtt a legkiterjedtebb környezeti kórokozó-kimutatási projekt a WHO által létrehozott Globális polio-mentesítési kezdeményezés (Global Polio Eradication Initiative) keretében zajlott (Asghar és mtsai. 2014). A járványos gyermekbénulást okozó vírus a világ számos pontján (pl. Közel-Kelet, India) továbbra is előfordul, elsősorban fejlődő országokat érint. A megbetegedések nagy része tünetmentesen vagy nem-specifikus enterális tünetekkel zajlik, így a megbetegedések pontos követése még fejlett egészségüggyel rendelkező országokban is kihívást jelent. Széklettel nagy mennyiségben ürül, ezért ideális és fontos célpontja a szennyvíz alapú epidemiológiának (Asghar és mtsai. 2014). A poliomentesnek tudott országokban a szennyvízben megjelenő vírus lehet az első jelzés a fertőzés újbóli felbukkanására.

A szennyvíz vizsgálatokra elsősorban a széklet-száj útján terjedő kórokozókval kapcsolatban szokás gondolni, ugyanakkor légúti vírusok nyomon követésére is több mint egy évtizede használják. Az influenza vírus szintén ürül széklettel is, az esetek egy részében gastrointesztinális tüneteket is okoz. A H1N1 járvánnyal kapcsolatban egy Hollandiában végzett vizsgálat során a pandémiát okozó influenzavírust ugyan nem tudták kimutatni, egyéb influenza A típus jelenlétét azonban igen (Heijnen és Medema 2011).

A szennyvíz minősége akár egy napon belül is jelentős változásokat mutathat, emiatt – különösen, ha nemcsak a vizsgált marker jelenlétének, hanem a mennyiségének is jelentősége van a vizsgálatban – fontos a mért érték normalizálása (Medema, Been, és mtsai. 2020). Ehhez a szennyvíz bizonyos (mennyiségi vagy minőségi) tulajdonságok változásait veszik figyelembe annak meghatározására, hogy mekkora lehet a cél-frakció aránya (pl. humám széklet). A hígulás mértékének meghatározásával pontosabban összehasonlíthatóak az egymást követő adatpontok, és meghatározható, hogy a megfigyelt különbség mögött valós változás áll, vagy csak a szennyvíz minőségének ingadozása. A legegyszerűbb normalizálási módszer a szennyvíztelepre beérkező napi vízmennyiség, és az ellátott lakosságszám figyelembevétele. Itt a vizsgált ágens mért koncentrációját a teljes napi szennyvíz térfogatra vonatkoztatható, majd meghatározható az egy lakosra eső kibocsátás. Ezen módszer hátránya, hogy a vizsgált mintát teljesen reprezentatívnak tekinti az adott napra, holott ez még automata mintavétel esetében sem valósul meg tökéletesen.

Széklettel ürülő kórokozók esetében célszerű lehet fekális indikátor mikroorganizmusok használata a hígulás mértékének meghatározásához. Ennek előnye, hogy a vizsgálat ugyanabból a mintamennyiségből történhet, mint a célzott marker, így pontminta esetében is megfelelő képet adhat a szennyvíz minőségéről. Kórokozó vírusok vizsgálata esetében gyakran olyan vírusokat használnak, amelyeket nagy mennyiségben ürítenek egészséges emberek is. A legismertebbek ezek közül a PMMoV és a CrAssphage.

A PMMoV (pepper mild mottle virus – a paprika enyhe foltosodását okozó vírus) az emberi székletben a legnagyobb mennyiségben megtalálható RNS vírus, míg állatok székletében csak ritkán és jóval kisebb mennyiségben mutatható ki. A vírus hosszúság pálca alakú (kb. 312 nm hosszú), burok nélküli, az örökítőanyagát pozitív egyszálú RNS alkotja. A dohány mozaikvírúshoz hasonlóan a *Virgoviridae* család *Tobamovirus* nemzetségébe tartozik. A PMMoV a paprika kórokozó vírusa, élelmiszerekben is megtalálták (Kitajima, Sassi, és Torrey 2018), azonban ez önmagában még nem magyarázza az emberi székletben való, nagy kópiaszámú és szinte kizárólagos előfordulását. A biológiájáról tehát még messze nem tudunk eleget, vízminőségi indikátorként azonban nagy figyelem övezi.

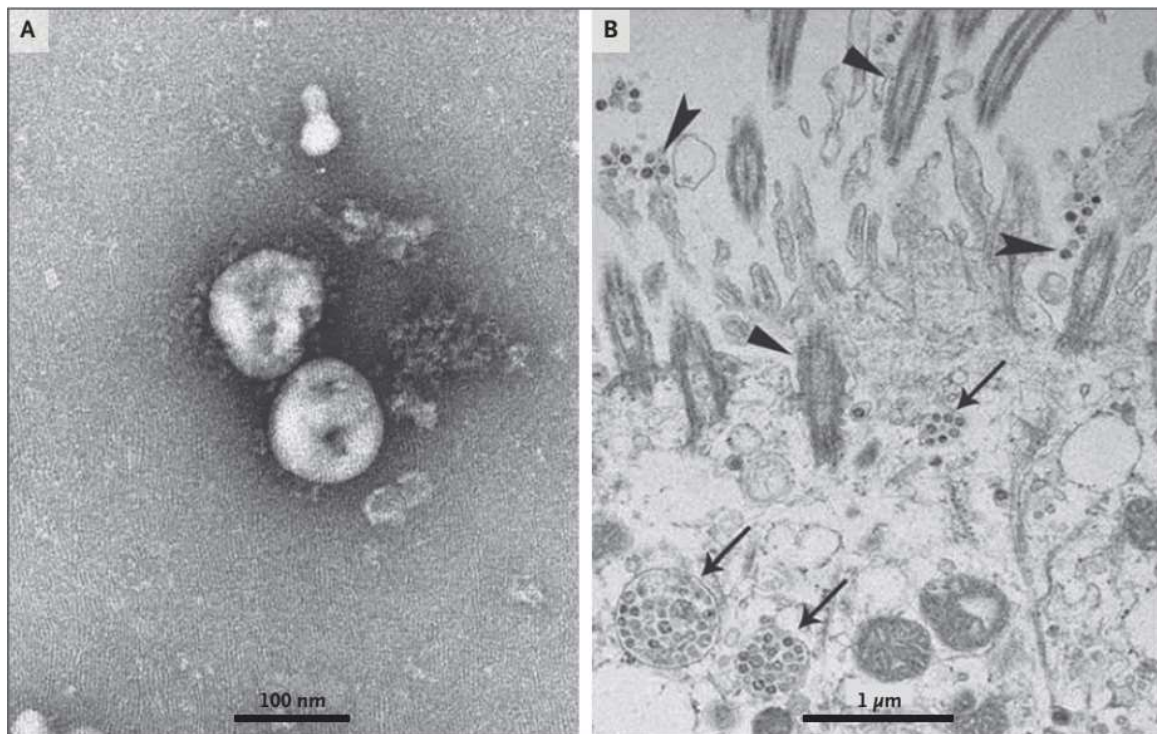
A CrAssphage-ról (cross-assembly phage – kereszt-összeálló fág) még ennél is kevesebb ismeret áll rendelkezésre, bár szintén intenzív kutatás zajlik a vízhygiénében történő felhasználhatóságával kapcsolatban. Egy 2017-ben leírt víruseszalád tagja, az eddig tenyésztésbe vont képviselője a *Bacteroides intestinalis* baktériumot, az emberi bélmikrobióta egyik gyakori tagját fertőzi. Maga a vírus szintén az emberi mikrobiom gyakori és jellegzetes tagja, szennyvízben és fekáliával szennyezett vizekben magas

kópiaszámban fordul elő, így alkalmasnak tűnik a fekális szennyezés biomarkerének (Farkas és mtsai. 2019).

3.3 A 2020-ban kezdődött koronavírus világjárvány

3.3.1 Koronavírusok, korábbi járványok

A koronavírusok (*Coronaviridae*) népes családjába számos állati és emberi megbetegedést okozó vírus tartozik. Nevüket a napkorona-szerű tüske fehérjékről kapták (3. ábra). Burkos, pozitív egyszálú RNS genommal rendelkező vírusok, génkészletük az egyik legnagyobb az RNS vírusok között (30–32 kb.). Az állati koronavírusok rendkívül változatos kórképeket okozhatnak a tüdőgyulladástól a gasztrointesztinális tünetekig, az általuk előidézett betegség gyakran magas elhullási aránnyal jár. Az egyik legismertebb állati megbetegedést okozó koronavírus az egér hepatitis vírus (Weiss és Leibowitz 2011).



3. ábra: A SARS-CoV-2 elektronmikroszkópos képe (A), valamint a vírus megjelenése emberi légzőhám sejtekben (B) (Zhu és mtsai. 2020)

Az emberi megbetegedést okozó koronavírusok közül négy törzs (229E, OC43, NL63, és HKU1) szezonális náthát okoz, és összességében az ilyen tünetekkel járó esetek mintegy 25%-áért felelősek (Cavanagh 2005; Weiss és Leibowitz 2011). Az enyhe megfázást okozó koronavírusok mellett már korábban is ismert volt, hogy a víruscsalád tagjai az emberek között is képesek súlyos megbetegedéseket okozni. Bizonyos elméletek szerint a XIX. század végén világjárványt okozó „orosz náthát” szintén koronavírus törzs, talán az OC43

okozhatta (Brüssow és Brüssow 2021). Emellett közvetlen bizonyítékunk is volt már korábban is arra, hogy súlyos emberi megbetegedést okozó koronavírusok bukkanhatnak fel.

2002-ben és 2003-ban a SARS (severe acute respiratory syndrome – súlyos akut légzőszervi tünet együttes) okozott több országra kiterjedő járványt, több mint 8000 igazolt megbetegedéssel és 750 halálesettel. A betegség magas lázzal és tüdőgyulladással járt, a halálozási arány 3 és 12% között mozgott. Hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a járványt egy új koronavírus törzs, a SARS-koronavírus (SARS-CoV) okozza (Sampathkumar és mtsai. 2003). Az utolsó megbetegedéseket 2004-ben jelentették, azóta nem történt újabb eset.

A MERS-koronavírus (MERS-CoV, middle-east respiratory syndrome coronavirus – közel-keleti légzőszervi szindróma koronavírus) 2012-ben bukkant fel először, elsősorban Szaúd-Arábiában és a környező országokban azonosították. A SARS-hoz hasonlóan a MERS esetében is elsősorban az alsó légúti tünetek dominálnak, a halálozási arány nagyon magas (30-40%). 2016-ig mintegy 1600 esetet igazoltak világszerte (Rabaan és mtsai. 2021; Shapiro és mtsai. 2016).

3.3.2 COVID-19

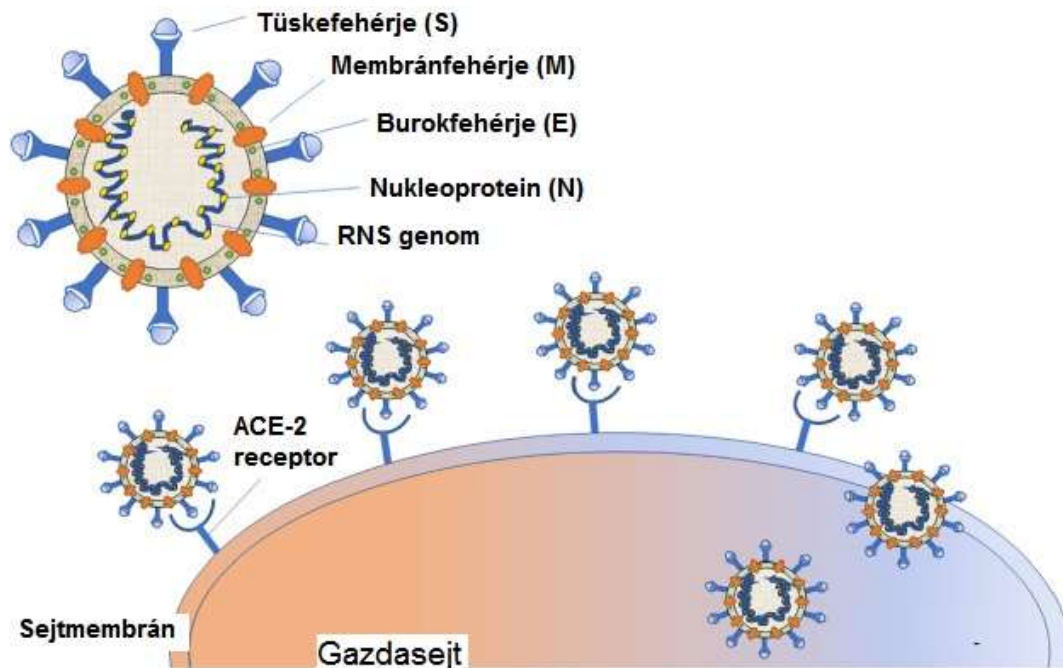
Kína 2019. utolsó napjaiban jelentette be, hogy az országban új típusú tüdőgyulladásos esetek halmozódását figyelték meg, és nyilvánvalóvá vált, hogy az új betegség emberről embere terjed. A betegséget egy új koronavírus törzs okozta, amelyet később SARS-CoV-2-nek (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – súlyos akut légzőszervi tünet együttes koronavírus 2) neveztek el, míg az általa okozott megbetegedést COVID-19-nek (coronaviral disease 2019 – koronavírusos megbetegedés 2019). A megbetegedést a WHO 2020. 03. 11-én nyilvánította pandémiának, ekkor a megbetegedettek száma 118 000, míg a halottak száma több mint 4 000 fő volt világszerte, és a megbetegedés 114 országot érintett (WHO, 2020).

3.3.2.1 SARS-CoV-2

Az új vírus a *Coronaviridae* család *Betacoronavirus* csoportjába tartozik, hasonlóan a SARS-koronavírushoz, azonban attól filogenetikailag elkülöníthető. A virionok átmérője 60 – 140 nm között változik, általában gömb alakúak, bár némi pleomorfia (alaki változatosság) megfigyelhető. Elektronmikroszkópos képen jól kivehetőek a koronavírusokra jellemző, napkorona-alakban elrendeződő tüske fehérjék (Zhu és mtsai. 2020).

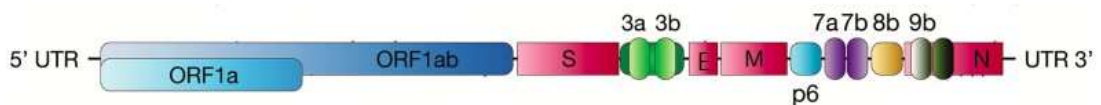
A vírus a többi koronavírushoz hasonlóan külső burokból (envelop, E), tüske fehérjékből (spike, S), valamint a belső egyszálú RNS genomából áll. Az emberi szervezetben a vírus az ACE-2 (angiotensin-converting enzyme – angiotenzin-konvertáló enzim) receptorokon

keresztül jut be a sejtbe (Naqvi és mtsai. 2020). A virion felépítése és a fertőzés folyamata a 4. ábrán látható.



4. ábra: A SARS-CoV-2 felépítése és a fertőzés folyamata (Naqvi és mtsai. 2020) nyomán

A genom a vírusoknál megszokott módon kompakt felépítésű, több mint 90%-ban strukturális fehérjéket és enzimeket kódol. Az 5' végről indulva a genom két nagy nem strukturális poliproteint kódoló szakasszal kezdődik (ORF1a és ORF1ab), melyekről összesen három poliprotein íródik át (a pp1ab riboszómális átíródási eltolódással (frameshifttel) képződik az ORF1b-ből). A genom ezek után 16 strukturális fehérjét kódoló szakasszal folytatódik (Naqvi és mtsai. 2020). A genom felépítését az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra: A SARS-CoV-2 genomszerkezete. S: tűskefehérje génje, E: burokfehérje génje, M: membránfehérje génje, N: nukleoprotein génje (Ortiz-Prado és mtsai. 2020)

3.3.2.2 A COVID-19 megbetegedés tünetei, kórlefordása

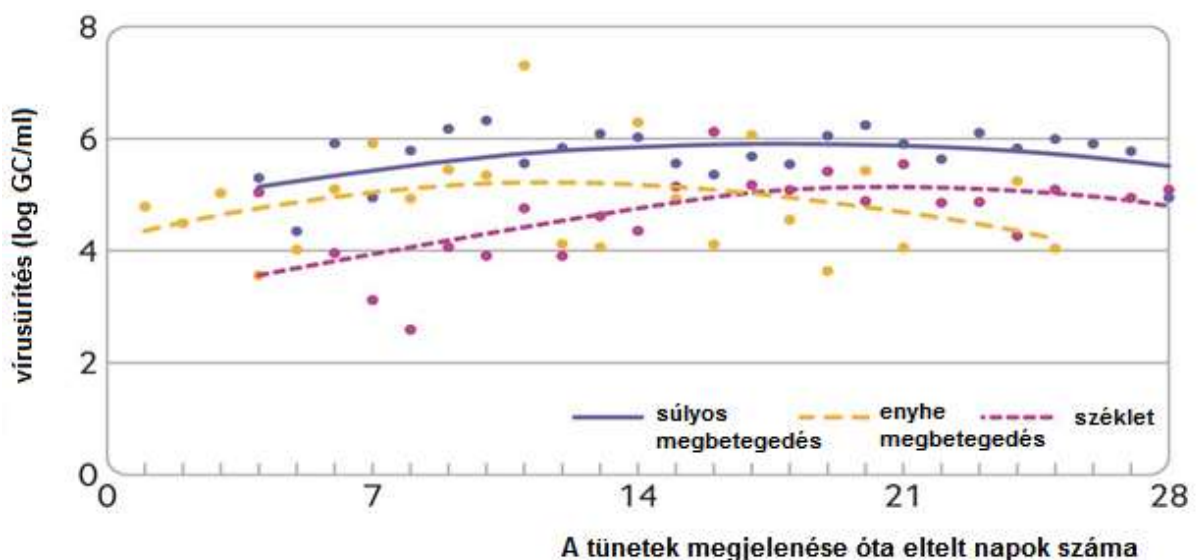
A betegség lefordása egyénenként nagyon változó lehet, a tünetmentes fertőzéstől a halálos kimenetelű megbetegedésig széles skálán mozog. A járvány kezdeti fázisában, Wuhanban végzett vizsgálatok szerint a fertőzöttek fele nem mutatott tüneteket, bár a vizsgálatkor tünetmentesek 2,5%-ánál később kialakult a betegség. Az inkubációs periódus

általában 4-6 nap. A betegek kb. 80%-a enyhe tünetekkel vészeli át a betegséget, míg 15%-nak súlyos, 5%-nak pedig kritikus tünetei alakulnak ki (Ortiz-Prado és mtsai. 2020).

A betegség leggyakoribb tünetei közé tartozik a láz, a fáradtság és a száraz köhögés, de idegrendszeri tünetek (fejfájás, íz- és szaglászvesztés), valamint gasztrintesztinális tünetek (hasmenés, hányás) is kialakulhatnak. Súlyos szövődményként akut légzőszervi distressz szindróma jelentkezik a betegek közel 20%-ánál. A fertőzés lefolyását befolyásolja társbetegségek jelenléte, a legfontosabb kockázatot növelő tényező az idős kor (>65 év), a cukorbetegség és a magas vérnyomás (Ortiz-Prado és mtsai. 2020).

3.3.2.3 A COVID-19 betegek vírusürítése

A SARS-CoV-2 elsősorban légúti vírus, a fertőzés is elsősorban cseppfertőzéssel, közvetlen kontaktussal, illetve fertőzött aeroszol belégzésével történik, a dolgozat témája szempontjából mégis a széklettel történő vírusürítésnek van nagyobb jelentősége, így ezzel foglalkozom részletesebben.



6. ábra: A vírusürítés időbeli alakulása enyhe és súlyos tünetekkel rendelkező COVID-19 megbetegedések esetében, valamint a vírus mennyisége a székletben (Zheng és mtsai. 2020) nyomán

A légúti minták mellett a SARS-CoV-2 az esetek egy részében szérumból (41%), székletből (69%) és vizeletből (kb. 1%) is kimutatható. A vírusürítés mértéke függ a megbetegedés súlyosságától is (súlyosabb megbetegedés esetén magasabb kópiaszám ürül), székletben azonban hosszabb ideig kimutatható (6. ábra) (Zheng és mtsai. 2020). Nagyobb esetszámú metaanalízis során azt találták, hogy a székletben a vírus átlagosan 26 napig mutatható ki (az esetek 95%-ában 21,7 és 34,9 nap között). A vírus mennyiségi változásait molekuláris alapon a genom kópiák (GC) számának változásával követik. Egy átlagos beteg a teljes megbetegedés alatt 3,4 log (GC/g) nagyságrendben üríti a vírust széklettel. A

vírusürítés a székletben a tünetek megjelenésekor tetőzik (maximális kópiaszáma 6,5 log [GC/g]), majd a megbetegedés előrehaladtával folyamatosan csökken (Miura, Kitajima, és Omori 2021).

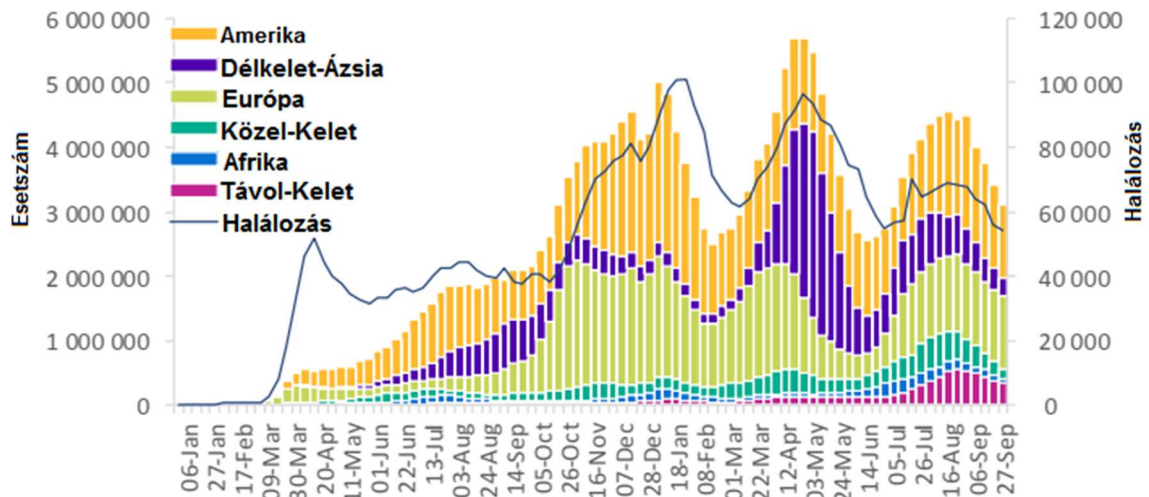
Egy másik metaanalízis nem talált szignifikáns különbséget a tünetes és a (még) tünetmentes fertőzöttek légúti vírusürítése között, néhány tanulmány esetében azonban úgy találták, hogy az idősebb és súlyosabb betegségben szenvedők nagyobb kópiaszámban üríthetik a vírust (Walsh és mtsai. 2020).

Bár a szennyvíz alapú epidemiológiai vizsgálatok esetében a kórokozó kimutatást nem az esetleges szennyvíz eredetű fertőzések megelőzése érdekében végzik, gyakran felmerülő kérdés, hogy fertőzhet-e ilyen módon a SARS-CoV-2, kell-e aggódni az ivóvíz-szolgáltatóknak vagy a felszíni vizekben fürdőzőknek a (tisztított) szennyvízzel kibocsátott koronavírus miatt, esetleg jelent-e kockázatot a szennyvíztelepen dolgozók számára.

Korábbi tapasztalat, hogy az állati koronavírusok között előfordulnak széklet-száj útján fertőzést okozó vírusok is. A 2002/2003-as SARS járványban leírtak egy esetet, ahol bizonyítottan szennyvíz közvetítette a fertőzést egy társasházon belül. Tekintve, hogy a megbetegedettek nagy része üríti széklettel a vírust, és egyes tanulmányok fertőzőképes vírusrészecskéket is kimutattak székletben, teljesen továbbra sem lehet kizárni ezt a fertőzési utat sem (Guo és mtsai. 2021). Összességében azonban a teljes fertőzöttszámot tekintve minden valószínűség szerint elhanyagolható jelentősége van ennek a fertőzési útvonalnak. Szennyvízben még egyetlen kutatócsoport sem igazolta fertőzőképes virion jelenlétét.

3.3.2.4 A pandémia alakulása világszerte és hazánkban

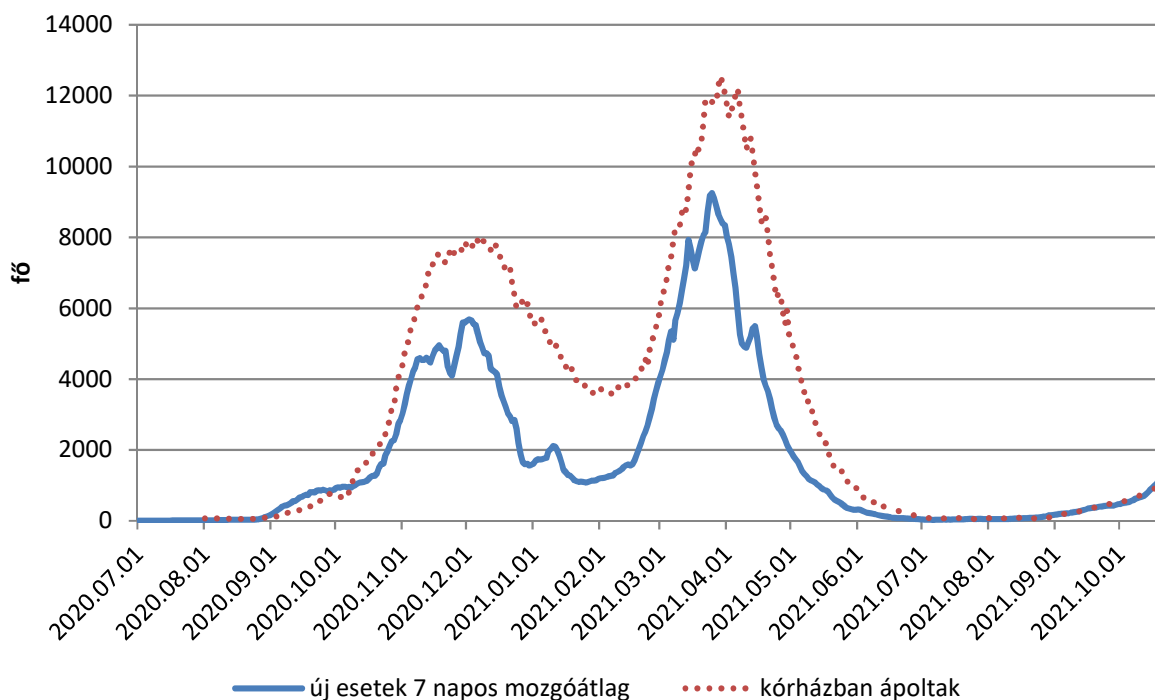
A COVID-19 a legtöbb országban több hullámban jelentkezett, bár az egyes országokban ezek a járványhullámok eltérő időben kezdődtek (7. ábra).



7. ábra: a COVID-19 járvány alakulása globálisan 2020. január – 2021. szeptember között (WHO 2021a)

A járványt először a kínai Hupei tartományban mutatták ki, azonban világszerte elterjedt. A 2020 tavaszán jelentkező első hullámban súlyos egészségügyi helyzet alakult ki Dél- és Nyugat-Európában. Magyarországra ezekhez az országokhoz képest pár hét késéssel érkezett meg a betegség, az első hazai esetet 2020. 03. 04-én igazolták. A néhány hét haladék alatt hazánkban volt idő reagálni, a többi országhoz hasonlóan szigorú korlátozásokat vezettek be (kijárási korlátozás, iskolák bezárása, távmunka bevezetése, ahol lehetséges volt). Ennek következtében Magyarországon az esetszám is alacsony maradt, a legmagasabb aktív esetszám 21 eset volt 100 000 lakosra vetítve (2020. május 4-én). A halálesetek száma az első hullámban nem érte el a 600-at (NNK OSZIR adatbázis).

2020 közepétől kezdte ismét növekedő tendencia volt világszinten megfigyelhető, gyakorlatilag minden kontinensen emelkedett a fertőzöttek száma (WHO 2021a). Magyarországon az esetszámok emelkedése már augusztus folyamán elkezdődött, igazán szembetűnővé azonban csak szeptemberre vált (8. ábra). Szeptember második felében és október első felében a napi új esetszámok növekedése egy ideig megállt, majd október második fele és november között nagyon magas értékeket ért el. Jelentősebb szigorításokat 2020. november 11-én rendeltek el (kijárási korlátozás, távoktatás 9. osztálytól felfelé, éttermek, szállodák bezárása). Az esetszám november második felétől csökkenni kezdett, ez a tendencia egy. az év végi ünnepek utáni kiugrást leszámítva január közepéig tartott.



8. ábra: Az COVID-19 esetszámok 7 napos mozgóátlagának alakulása 2020. 07. 01 – 2021. 10. 20. között a fertőzés igazolásának dátuma alapján (NNK OSZIR adatbázis) és a kórházban kezelték számának alakulása (koronavirus.gov.hk-n közölt adatok)

A járvány következő hullámát egy új leszármazási vonal megjelenése (ld. később) okozta. Világszinten nehezen különíthető el az előző hullámtól, hiszen míg Magyarországon a második hullám lecsengése zajlott, Nyugat-Európában már emelkedő tendencia volt megfigyelhető. Hazánkban a korábbinál fertőzőbb variáns megjelenése úgy okozott egyre magasabb esetszámokat 2021. január közepétől, hogy közben a korlátozó intézkedéseken nem történt lazítás. A harmadik hullám során mind az új esetszám, mind a kórházi kezelésre szorulóknak száma elérte az eddigi maximumot (8. ábra). 2021. március 8-tól további járványügyi korlátozásokat kellett bevezetni, az óvodák és általános iskolák, valamint az üzletek többsége is bezárt, a maszkviselési kötelezettséget a közterületekre is kiterjesztették.

A járvány harmadik hulláma Magyarországon 2021. nyár elejére lecsengett, a világban azonban a nyár folyamán ismét emelkedő tendencia volt megfigyelhető. Hazánkban a negyedik hullám kezdetét az esetszámok enyhe emelkedése jelezte 2021. július közepétől, majd október folyamán ismét magasabb napi esetszámokat lehetett tapasztalni.

3.3.2.5 A SARS-CoV-2 jelentős variánsai

Minden szervezet genomjában megfigyelhetünk mutációkat, egy RNS vírus esetében azonban emberi mértékkel rövid idő alatt is számos, akár jelentős változás halmozódhat fel. Egy vírusvariánsra számos ilyen jelentős változás kombinációja jellemző, a mutációk döntő többség a receptorkötésért felelős nagy felszíni fehérjében (S) található.

A SARS-CoV-2-nek számos variánsát ismeri a tudomány, a sajtóban is rendszeresen hírt adtak egy-egy újabb típus felbukkanásáról, azonban ezek járványtani jelentősége nem egyforma. A Világegészségügyi Szervezet (WHO) három csoportba sorolja a jelentősebb variánsokat (WHO 2021b):

- Aggudalomra okot adó variánsok (variants of concern, VOC): ezen variánsok esetében már bebizonyosodott, hogy megváltoztatják a vírus fertőzőképességét, virulenciáját, a betegség lefolyását, a korábbi fertőzésekre vagy oltásra adott immunválasz kevésbé hatékony ellene, vagy más diagnosztikát, terápiát igényelnek. 2021 októberében négy variánst sorol ide a WHO:
 - Alfa (B.1.1.7): Nagy-Britanniában kialakult leszármazási vonal, jelentősebb tulajdonságait később részletezzük
 - Béta (B.1.351): Dél-Afrikában leírt leszármazási vonal, jelentőségét elsősorban az adja, hogy az E484K mutáció révén képes kikerülni a vakcinákkal kialakuló immunválaszt (Wang, Nair, és mtsai. 2021)
 - Gamma (P.1): elsőként Brazíliában leírt leszármazási vonal, a béta variánshoz hasonlóan vakcina-kikerülő (vaccine escape) variánsként tartják nyilván (Wang, Casner, és mtsai. 2021)
 - Delta (B.1.617.2): Indiában leírt leszármazási vonal, jelentősebb tulajdonságait később részletezzük
- Érdeklődésre számot tartó variánsok (variants of interest, VOI): ezek a leszármazási vonalak olyan mutációkat tartalmaznak, amelyekről bebizonyosodott vagy feltételezhető, hogy jelentős hatásuk van a vírus fertőzőképességére, a betegség lefolyására, diagnosztikára, kezelésre vagy az immunválaszra. 2021 októberében a Peruban leírt lambda (C.37) és a Columbiában leírt mü (B.1.621) vonalakat sorolja ide a WHO.
- Megfigyelés alatt álló variánsok (variants under monitoring, VUM): ezek a leszármazási vonalak olyan mutációkat hordoznak, amelyek alapján feltételezhető, hogy a későbbiekben kockázatot jelenthetnek, azonban a bizonyítékok még nem egyértelműek, további megfigyelés szükséges. 2021 októberében 15 különböző leszármazási vonalat sorol ebbe a kategóriába a WHO.

Az első aggudalomra okot adó variáns, amely Európában elterjedt, az alfa variáns volt. A leszármazási vonal 2020 szeptemberében jelenhetett meg az Egyesült Királyságban, majd 2020 decembere során az egész kontinensen elterjedt, és újabb járványhullámot indított

(Davies, Abbott, és mtsai. 2021). A variáns 17 nem-szinonim mutációval jellemezhető, ezek közül a legjelentősebbek az S gén N501Y mutációja (az 501. aminosav, az aszparagin tirozinra cserélődik; az ACE2 receptorhoz való erősebb kötődésért felel) és 69H/70V deléciója (a 69. és 70. aminosav, egy hisztidin és egy valin kiesése) (Rambaut és mtsai 2020). A variáns nagyobb fertőzőképessége és az általa okozott betegség súlyosabb lefolyása szintén bebizonyosodott (Davies, CMMID COVID-19 Working Group, és mtsai. 2021).

Az alfa variánst hazánkban először 2021. január 13-án mutatták ki, jelenléte március közepére szinte kizárólagossá vált. (Ebből az időszakból országosan reprezentatív, az egyes variánsok elterjedésére vonatkozó vizsgálat nem áll rendelkezésre, a humán megbetegedések adatait az NNK COVID laboratóriumában szekvenált, az ország területének nagy részéről származó minták eredményei alapján becsültük).

Miközben az alfa variáns február közepére egész Európában dominánssá vált, a vele közel egy időben felbukkanó béta és gamma variánsok sem Magyarországon, sem Európa más országaiban nem tudtak jelentősen terjedni (ECDC 2021).

A delta variánst 2020 végén azonosították Indiában. Legjelentősebb mutációja az L452R aminosav-csere a tüskefehérje receptor-kötő doménjében. Ez a variáns még a korábbi alfa variánsnál is nagyobb kópiaszámban képes szaporodni a légutakban, ezáltal fertőzőképesebb; emellett képes kikerülni a korábbi megbetegedések során kialakult immunitást is (Mlcochova és mtsai. 2021). Magyarországon 2021 nyarán jelent meg, és nagyon hamar szinte kizárólagossá vált a mintákban. A 2021 nyarán megfigyelt esetszám-emelkedést ennek a variánsnak a megjelenése okozta. 2021 októberére minden, ilyen jellegű adatot jelentő európai országban dominánssá vált (ECDC 2021).

3.3.2.6 SARS-CoV-2 megjelenése a szennyvízben

Már 2020 első heteiben nyilvánvalóvá vált, hogy az új megbetegedés jelentős kihívások elé fogja állítani a világ országainak egészségügyi rendszerét. A járvány kezdetén sem kiforrott klinikai laboratóriumi vizsgálati protokoll, sem a tesztek elvégzéséhez szükséges eszközök és alapanyagok nem álltak rendelkezésre megfelelő mennyiségben, így hamar felismerték a szennyvíz alapú epidemiológiai megközelítés kiemelt jelentőségét.

Azok a kutatócsoportok, amelyek már korábban foglalkoztak szennyvízből történő víruskimutatással, már a járvány első hónapjaiban el tudták kezdeni az ilyen típusú vizsgálatokat. Hollandiában már 2020 februárjában elvégezték az első szennyvízvizsgálatokat, az első pozitív mintákat mindössze nagyjából egy héttel az első igazolt COVID-19 eset után találták (Medema, Heijnen, és mtsai. 2020).

A későbbiekben számos munkacsoport végzett hasonló vizsgálatokat. A szennyvízmintákban jellemző SARS-CoV-2 koncentráció a kimutatási határ körüli értéktől (jellemzően 10^3 GC/L) a 10^7 GC/L értékig változik az egyes vizsgálatokban (Peccia és mtsai. 2020; Wu és mtsai. 2021; Wurtzer és mtsai. 2020). A tanulmányok többsége az új és összes aktív esetszámot, kórházi ápolásra szorulókat és halottak számát vizsgálva azt találta, hogy a szennyvíz adatok 4-6 nappal jelzik előre a klinikai adatok alakulását (Medema, Been, és mtsai. 2020; Peccia és mtsai. 2020; Wu és mtsai. 2021). Wu és munkatársai nagyszámú, az USA különböző részeiből származó szennyvízminta elemzésével úgy becsülték, hogy a módszer érzékenysége kb. 13 pozitív eset/100 000 lakos (Wu és mtsai. 2021). Nem minden tanulmányban találtak azonban összefüggést a szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények és a megbetegedések száma között: Westhaus és mtsai. (2021) Észak-Rajna-Vesztfáliai adatok elemzése során nem talált korrelációt.

A vizsgálati módszerek tekintetében a nukleinsav-kimutatást viszonylag egységes módszer szerint végzik a kutatócsoportok (általában az N gén egyes szakaszai, ritkábban az ORF1ab vagy az E gén alapján történik a kimutatás), míg a folyamat kulcslépése, a víruskoncentrációs módszer jelentősen különbözik az egyes tanulmányokban. Általában, különösen a legkorábbi tanulmányokban az ultraszűrési módszerek domináltak, azonban előfordultak PEG precipitációs és elektronegatív membrán filtrációs módszerek is (Kitajima és mtsai. 2020).

Miután egyre több bizonyíték gyűlt össze a szennyvíz alapú epidemiológiai megközelítés hasznáról a COVID-19 járványban, a világ számos országában bevezették a módszert. Az egyik első, ilyen jellegű adatokat gyűjtő COVIDPoops oldal (<https://www.covid19wbec.org/covidpoops19>) szerint 2021 októberében már 58 országban, majdnem 3 000 mintavételi helyen vizsgálják a szennyvízben a SARS-CoV-2 jelenlétét.

A számos helyen sikeresen futó programot az Európai Unió is felkarolta, már 2020 második felében megkezdődtek az egyeztetések az egységes mintavételi és vizsgálati módszer kidolgozása érdekében. Az Európai Bizottság C (2021) 1925 ajánlása 2021 októberétől írja elő a tagállamok számára SARS-CoV-2 kimutatását és a variánsok azonosítását szennyvízből (Európai Bizottság 2021). Az ajánlás a 150 000 főnél nagyobb településekre vonatkozik, ezek Magyarországon az egyes szennyvíztelepek teljes ellátási területén élő állandó lakosság szám alapján (KSH 2019) Budapest, Miskolc, Debrecen, Szeged és Pécs (a győri szennyvíztelep által ellátott állandó lakosság néhány ezerrel marad el a 150 000 főtől).

3.3.2.7 SARS-CoV-2 variánsok nyomon követése szennyvízből

Miután 2020 végétől a SARS-CoV-2 új, aggodalomra okot adó variánsai a figyelem középpontjába kerültek, felmerült, hogy hogyan lehetne az addigra számos országban bevezetett szennyvíz alapú epidemiológia módszerét a variánsok nyomon követésére használni.

A humán fertőzéseket okozó variánsok azonosításának elfogadott módszere a teljes genom szekvenálás, azonban ez igen költséges és hosszadalmas eljárás. Szennyvíz esetében további problémát jelent, hogy a mintában található SARS-CoV-2 koncentráció jóval alacsonyabb a klinikai minták többségénél, víruskoncentráció után is. Számos fertőzöttől származó, kevert minta lévén nem tudható biztosan, hogy az egymástól távol levő mutációk esetében az azonosított mutációk ugyanabban a genomban vannak-e.

A nehézségek ellenére bebizonyosodott, hogy a módszer szennyvízben is alkalmazható. Egy svájci síközpont szennyvizét vizsgálva újgenerációs szekvenálással sikerült kimutatni a SARS-CoV-2 alfa variánsára jellemző mutációk közül 10-et már az első bizonyított svájci eset előtt egy nappal vett mintában (Jahn és mtsai. 2021). Az Egyesült Államokban szintén azonosítottak olyan variánsokat is szennyvízből, amelyek humán mintákban még ismeretlenek voltak a vizsgált régióban (Crits-Christoph és mtsai. 2021). Az európai ajánlás (Európai Bizottság 2021) szintén az újgenerációs szekvenálás módszerét javasolja a variánsok nyomon követésére a szennyvízből.

A szekvenálás mellett használnak olcsóbb, gyorsabb és célzottabb (bár kevésbé általánosan alkalmazható) módszereket is a variánsok kimutatására. A legfőbb mutációs helyekre történő PCR alapú szűrést a klinikai gyakorlatban is használják, számos tanulmány mutatott arra, hogy ez a módszer szennyvizek esetében is eredményes lehet. Hollandiában digitális droplet PCR alapú módszerrel vizsgálták az alfa, béta és gamma variánsra egyaránt jellemző N501Y mutáció jelenlétét (Heijnen és mtsai. 2021). A módszerrel mind a mutáns, mind a vad típust szelektíven számszerűsíteni lehet a mintában, az eredmények szoros összefüggést mutattak a klinikai eredményekkel. A digitális droplet PCR mellett RT-qPCR alapú módszereket (Lee és mtsai. 2021) és beágyazott (nested) RT-PCR alapú módszereket (La Rosa és mtsai. 2021) is sikeresen használtak az egyes SARS-CoV-2 variánsok szennyvízből történő nyomon követésére.

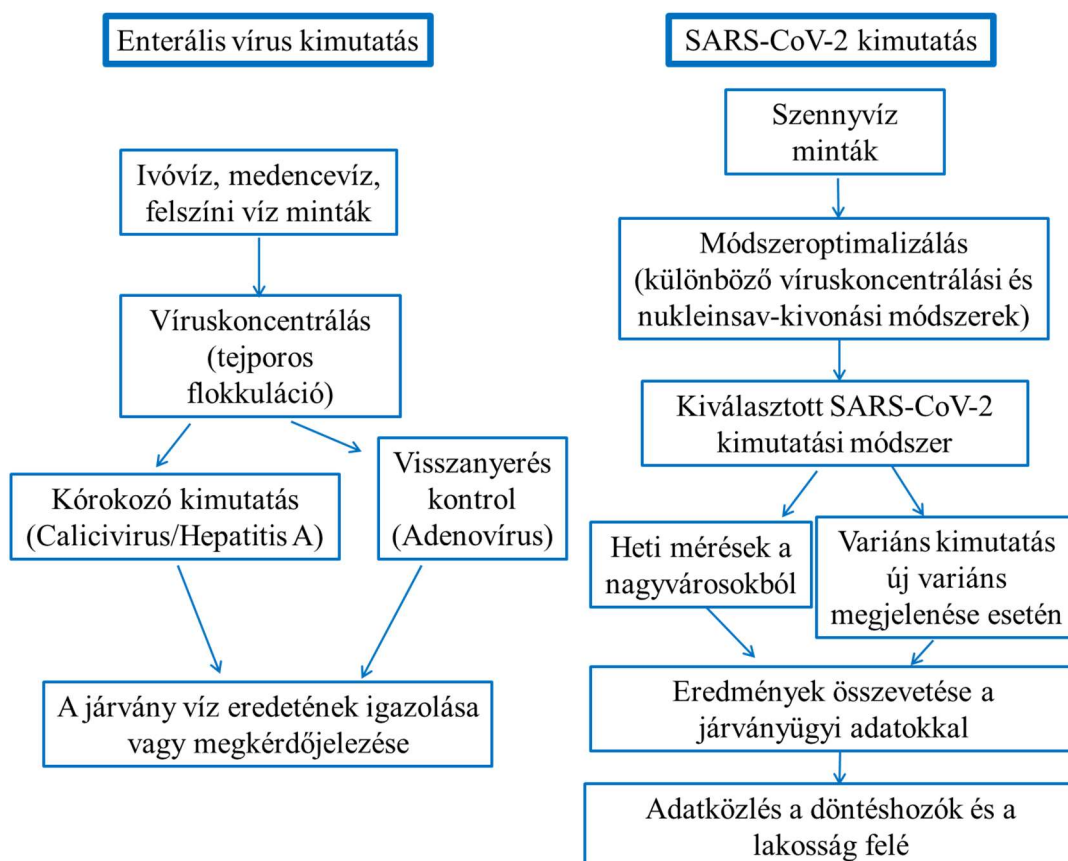
4. Célkitűzések

A vizsgálatok során céljaink 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

5. Anyag és módszer

Vizsgálataink során az ivó-vagy fürdővízből történő enterális vírus kimutatáshoz és a szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatáshoz eltérő módszereket használtunk. Emellett a vizsgálatok célja is némileg különbözött, bár végsősoron mindkét vizsgálat a járványügyi biztonság növelésére irányult. A kétféle vizsgálat során alkalmazott munkafolyamatokat a 9. ábra foglalja össze.



9. ábra: A dolgozatban bemutatott munkafolyamatok összefoglalása

5.1 Enterális járványok kivizsgálása

5.1.1 Mintavételi helyek

A vízből történő víruskimutatás fontos szerepet játszik azokban az esetekben, ahol víz által közvetítve (is) terjedő vírusok tömeges előfordulásáról értesül a járványügyi hatóság.

A 2015-2021. közötti időszakban négy esetben kért a népegészségügyi hatóság ilyen jellegű vizsgálatot az NNK-tól az alábbi mintavételi helyeken:

- 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 vizsgálatok mindegyikében 10-10 liter minta érkezett a laboratóriumba, a mintavételeket az illetékes népegészségügyi hatóság végezte.

5.1.2 Víruskoncentráció

A megfelelő érzékenység eléréséhez környezeti minták esetében szükség van a vírusok koncentrálására. Az enterális úton terjedő vírusok kimutatására munkacsoporthunk már rendelkezett korábban alkalmazott módszerrel (Kern és mtsai. 2013), így vizsgálataink során a tejpontos flokkuláció módszerét alkalmaztuk.

A flokkulációs módszerek lényege, hogy a vírusrészecskéket megfelelő pH és ionerő alkalmazása mellett tejpontos felületére kötjük, majd üleptítjük, és az üledékből koncentráltan visszanyerjük a vírust. A tejpontos flokkulációt Calgua és mtsai. (2008) módszere szerint végeztük.

A feldolgozott mintamennyiség ivóvíz, felszíni víz és medencés fürdővíz esetén 10 L volt. Az előkészítés során a vízminta vezetőképességét szükség szerinti mennyiségű szintetikus tengeri só (Sigma, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) hozzáadásával legalább 1200 μ S-re állítottuk be. Ezt követte a pH beállítása (1 N HCl oldattal történt 3,5-re), majd 1:100 térfogatarányban tejpontos szuszpenzió hozzáadása (1 L oldathoz 10 g sovány tejpontos és 33,33 g szintetikus tengeri só (Sigma, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok)), az oldat pH-ját 1 N HCl oldattal 3,5-re állítjuk és felhasználásig kevertetjük). Az ilyen módon előkészített mintát szobahőmérsékleten kevertettük mágnesen keverő segítségével, majd 8 óráig keresztül üleptítettük.

Az üleptítést követően perisztaltikus pumpa segítségével eltávolítottuk a felülúszót, addig, hogy a mintából kb. 500 ml maradjon. A mintát ezt követően centrifugálással üleptítettük (8000 \times g, 30 perc, 4°C), eltávolítottuk a felülúszót, majd a pelletet 10 ml foszfát pufferben felfuszpendáltuk. Az így keletkezett koncentrátumokat a nukleinsav-kivonásig -20°C-on tároltuk.

5.1.3 Nukleinsav-kivonás

A calici- és hepatitis A vírus kimutatásra irányuló vizsgálatok esetében a virális nukleinsav tisztítása Qiagen Viral Mini kittel (Qiagen, Hilden, Németország) történt a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztítás során 140 µl koncentrátumból 100 µl nukleinsav keletkezett.

5.1.4 Folyamatkontrollok

A vizsgálatok során elengedhetetlen, hogy a víruskoncentrálnálási lépések hatékonyságát ellenőrizzük. A calici- és hepatitis A vírus kimutatás vizsgálatok során folyamatkontrollként humán 2-es típusú adenovírus izolátumot (forrás: Dr. Jane Sellwood, Reading University, Egyesült Királyság) alkalmaztunk. Az izolátum 1 ml-ét 10 liter, lehetőleg a vizsgált mintákkal azonos helyről származó vízmintához adtuk, amelyet a többi mintával azonos módon dolgoztunk fel.

Negatív kontrollként felforralt csapvizet használtunk az esetleges keresztszennyezések kizárása érdekében.

5.1.5 Polimeráz láncreakció

A calicivírus és hepatitis A vírus kimutatás esetében jelenlét/hiány kimutatása történt PCR-rel. Calicivírusok esetében a norovírusok II genocsoportjának kimutatása történt RT-seminested-PCR segítségével, a vírus RNS függő RNS polimerázát kódoló szakasz szelektív felszaporításával (Vennema, de Bruin, és Koopmans 2002). Ezzel a módszerrel nem mutatható ki az összes humán megbetegedést okozó calicivírus, csupán a csoport leggyakoribb tagjai.

Mivel a calicivírusok RNS genommal rendelkeznek, a módszer első lépése a reverz transzkripció, amelyet az első PCR ciklus követ. A seminested reakcióban a második PCR ciklusban a reakcióban alkalmazott egyik primer azonos, míg a másik különbözik az első reakcióban alkalmazott primertől.

A reakcióelegy összetétele:

Norovírus GII		
<i>Összetevő</i>	<i>végkoncentráció</i>	<i>μl/reakció</i>
RNáz mentes víz		4,25
Verso 1-step master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)	1x	12,5
JV12Y 5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'	1 pmol	0,5
JV13i 5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3'	1 pmol	0,5
RT enhancer (Thermo Fisher Scientific)		1,25
BSA (Thermo Fisher Scientific)	0,4 mg/ml	0,5
Verso 1-step Enzim mix (Thermo Fisher Scientific)		0,5
Nukleinsav		5
Végtérfogat		25

Hőprofil					
reverz transzkripció		denaturáció	anelláció	extenzió	végső extenzió
30 p	15 p	30 s	30 s	1 p	5 p
50 °C	95 °C	95 °C	37°C	72 °C	72 °C
1x		45x			1x

A PCR termék mérete: 326 bp

Norovírus GII (Calici) II		
<i>Összetevő</i>	<i>végkoncentráció</i>	<i>μl/reakció</i>
RNáz mentes víz		15,4
Platinum taq puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)	1x	2,5
MgCl ₂ (Invitrogen, Waltham, MA USA)	1,5 mM	1,5
dNTP (Invitrogen)	0,2 mM	2
JV12Y 5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'	0,4 mM	1
Ni-R 5'-AGCCAGTGGGCGATGGAATTC-3'	0,4 mM	1
Platinum taq (Invitrogen)	1 U/μl	0,1
BSA (Thermo Fisher Scientific)	0,4 mg/ml	0,5
PCR termék		1
Végtérfogat		25

Hőprofil				
kezdeti denaturáció	denaturáció	anelláció	extenzió	végső extenzió
3 p	30 s	30 s	1 p	5 p
96 °C	95 °C	40°C	72 °C	72 °C
1x	45x			1x

A PCR termék mérete: 236 bp

A hepatitis A vírus kimutatása a burok régióra tervezett RT-nested PCR reakcióval történt (Paula, Villar, és Gaspar 2003).

Hepatitis A I		
<i>Összetevő</i>	<i>végkoncentráció</i>	<i>μl/reakció</i>
RNáz mentes víz		4,25
Verso 1-step master mix (Thermo Fisher Scientific)	1x	12,5
"+2897" 5'-CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT-3'	1 pmol	0,5
"-3288" 5'-AAYTTCATY ATTCATGCTCCT-3'	1 pmol	0,5
RT enhancer (Thermo Fisher Scientific)		1,25
BSA (Thermo Fisher Scientific)	0,4 mg/ml	0,5
Verso 1-step Enzim mix (Thermo Fisher Scientific)		0,5
Nukleinsav		5
Végtérfogat		25

Hőprofil					
reverz transzkripció		denaturáció	anelláció	extenzió	végső extenzió
30 p	15 p	30 s	30 s	1 p	2 p
50 °C	95 °C	95 °C	40 °C	72 °C	72 °C
1x		40x			1x

Hepatitis A II		
<i>Összetevő</i>	<i>végkoncentráció</i>	<i>μl/reakció</i>
Platinum Taq puffer (Invitrogen)	1x	2,5
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM	1,5
RNáz mentes víz		16,6
dNTP (Invitrogen)	200 μM	2
BSA (Thermo Fisher Scientific)	0,4 mg/ml	0,5
"+2949" 5'-TATTTGTCTGTYACAGAACAATCAG-3'	0,2 μM	0,5
"-3192" 5'-AGGRGGTGAAGYAC TTCATTTGA-3'	0,2 μM	0,5
Platinum Taq (Invitrogen)	2 U	0,4
PCR termék		0,5
Végtérfogat		25

Hőprofil				
kezdeti denaturáció	denaturáció	anelláció	extenzió	végső extenzió
4 p	1 p	30 s	1 p	7 p
94 °C	92 °C	48 °C	72 °C	72 °C
1x	30x			1x

A PCR termék mérete: 244 bp

A víruskoncentráció hatékonyságának ellenőrzésére a pozitív és negatív kontroll mintából Adenovírus kimutatás történt (Allard, Albinsson, és Wadell 2001). Az Adenovírusok DNS vírusok, így ebben az esetben reverz transzkripcióra nincs szükség. A kimutatás nested PCR reakcióval történt.

Adenovírus I		
Összetevő	végkoncentráció	μl/reakció
RNáz mentes víz		10,65
Platinum taq puffer (Invitrogen)	1x	2,5
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM	1,5
dNTP (Invitrogen)	0,25 mM	2,5
hex1deg 5'-GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC-3'	0,5 μM	1,25
hex2deg 5'-CAGCACSCCICGRATGTCAAA-3'	0,5 μM	1,25
Platinum taq (Invitrogen)	1U/μl	0,1
BSA (Thermo Fisher Scientific)	0,2 mg/ml	0,25
Nukleinsav		5
Végtérfog		25

Hőprofil				
kezdeti denaturáció	denaturáció	anelláció	extenzió	végső extenzió
2 p	30 s	30 s	1 p	5 p
95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C
1x	45x			1x

A PCR termék mérete: 301 bp

Adenovírus II		
<i>Összetevő</i>	<i>végkoncentráció</i>	<i>μl/reakció</i>
RNáz mentes víz		16,15
Platinum taq puffer (Invitrogen)	1x	2,5
MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 mM	1,5
dNTP (Invitrogen)	0,1 mM	1
nehex3deg 5'-GCCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC-3'	0,5 μM	1,25
nehex4deg 5'-CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA-3'	0,5 μM	1,25
Platinum taq (Invitrogen)	1U/μl	0,1
BSA (Thermo Fisher Scientific)	0,2 mg/ml	0,25
PCR termék		1
Végtérfogát		25

A reakció hőprofilja megegyezik az 1. PCR körben alkalmazottal, a termék 171 bp hosszúságú.

A PCR termékek kimutatása mindhárom vírus esetében agaróz gélelektroforézissel történt (2% agaróz gél, 0,5x TBE, 100 V).

5.1.6 Járványügyi adatok

Az enterális megbetegedésekre vonatkozó adatok a területi kormányhivatalok Népegészségügyi Osztályaitól származtak.

5.2 Országos COVID-19 előrejelző rendszer

5.2.1 Mintavételi helyek

A rendszeres, epidemiológia célból végzett szennyvíz mintavételek 2020. 06. 04-én kezdődtek, a teljes országot lefedő szisztematikus monitoring rendszer 2020. július elejére állt össze. A minatvételek minden esetben a szennyvíztelepeken, a nyers szennyvízből történt, a nagyobb darabos szennyeződéseket eltávolító rácsszűrő után. A mintavételi helyeket és az ellátott lakosság számát a 1. táblázat foglalja össze.

Megye	Mintavételi pont	Ellátási terület	Ellátott lakosság (fő)	Ellátott lakosság aránya a megye lakosságához képest
Békés	Békéscsaba	Békéscsaba, Gerla, Fényes, Mezőmgyer	59 542	18%
Budapest	Budapest Észak	Pest északi része, a III. kerület északi része, Budakalász, Dunakeszi, Üröm, Csömör, Kerepes, Kistarcsa, Nagytarcsa	1 831 372	Budapest teljes lakossága
	Budapest Dél	Pest déli része, Vecsés, Gyál, Üllő		
	Budapest Központi Telep	Buda, Csepel, Pest központi kerületei, Nagykovácsi, Remeteszőlős, Budaörs		
Pest	Budapest agglomeráció*	Tököl, Biatorbágy, Szigetszentmiklós, Budakeszi, Százhalombatta	97 709	8%
Hajdú-Bihar	Debrecen	Debrecen, Ebes, Mikepércs, Sáránd	214 426	41%
Heves	Eger	Eger, Felsőtárkány, Egerszólát, Egerszalók, Egerbakta	60 741	21%
Győr-Moson-Sopron	Győr	Győr, Gyórszentiván, Győrújbarát (részben), Gyirmót, Kisbajcs, Nagybjacs, Szőnye, Vének, Vámoszabadi, Győrújfalú, Abda, Börcs, Rábapatonna, Ménfőcsanak	146 559	31%
Somogy	Kaposvár	Kaposvár, Kaposszerdahely, Magyaratád, Magyaregres, Mernye, Orci, Patalom, Sántos, Simonfa, Somogyaszaló, Somogyjád, Szentbalázs, Taszár, Várda, Zimány, Zselickislak, Zselicszentpál	75 343	25%
Bács-Kiskun	Kecskemét	Kecskemét, Kerekegyháza, Hetényegyháza, Városföld, Matkópuszta, Méntelek, Ballószög, Helvécia	128 266	26%
Borsod-Abaúj-Zemplén	Miskolc	Miskolc, Felsőzsolca, Arnót, Szirmabesenyő, Alsózsolca, Mályi, Nyékládháza, Kistokaj, Bükk-szentkereszt	191 352	30%
Szabolcs-Szatmár-Bereg	Nyíregyháza (1. telep)**	Kótaj, Nyírpazony, Sóstó, Sóstó-1, Sóstófürdő, Nyírszőlős, Kertváros, Belváros	128 062	23%
Baranya	Pécs	Pécs, Vasas, Hird, Bogárd, Romonya, Nagykozár, Boda, Bakonya, Kővágóötös, Kővágószőlős, Cserkút, Pellérd, Keszü, Gyód, Kozármisleny	156 107	44%
Nógrád	Salgótarján	Salgótarján, Kazár, Mátraszele, Somoskőújfalu, Vizslás	41 656	22%

Megye	Mintavételi pont	Ellátási terület	Ellátott lakosság (fő)	Ellátott lakosság aránya a megye lakosságához képest
Csongrád-Csanád	Szeged	Szeged, Tiszasziget, Újszentiván, Kübekháza, Deszk	172 171	43%
Fejér	Székesfehérvár	Székesfehérvár, Kisfalud, Csala, Börgönd városrészek, Pákozd, Pátka, Seregélyes, Seregélyes Szőlőhegy, Jánosmajor, Jenő, Nádasdladány, Sárkeszi, Sárszentmihály, Sárpentele, Úrhida	113 601	27%
Tolna	Szekszárd	Szekszárd	32 488	15%
Jász-Nagykun-Szolnok	Szolnok	Szolnok, Rákóczifalva, Rákócziújfalú, Szászberek, Újszász, Zagyvarékas, Tószeg, Vezseny, Tiszavárkony, Tiszajenő, Besenyszög, Jászsalsószentgyörgy, Szajol, Tiszapüspöki	109 838	30%
Vas	Szombathely	Szombathely, Balogunyom, Bozsok, Bucsú, Cák, Dozmat, Gencsapáti, Gyöngyösfalu, Kisunyom, Kőszeg, Kőszegdoroszló, Kőszegpaty, Kőszegszerdahely, Lukácsháza, Nárai, Nemesbőd, Nemescsó, Perenye, Pusztacsó, Salköveskút, Sé, Sorokpolány, Söpte, Tanakajd, Táplánszentkereszt, Torony, Vasasszonyfa, Vassurány, Vasszécseny, Velem, Vép	115 112	45%
Komárom-Esztergom	Tatabánya	Tatabánya, Vértesszőlős, Környe, Vértessomló, Várgesztes, Szárliget	81 332	27%
Veszprém	Veszprém	Veszprém, Szentkirályszabadja, Nemesvámos, Veszprémfajsz, Kádárta, Gyulafirátót, Hajmáskér	62 238	18%
Zala	Zalaegerszeg	Zalaegerszeg, Alibánfa, Alsónemesapáti, Babosdöbréte, Bagod, Bak, Bocföldre, Boncodföldre, Böde, Búcsúszentlászló, Csatár, Csonkahegyhát, Dobronhegy, Egervár, Gósfá, Hagyárosbörönd, Hottó, Kávás, Kemendollár, Keménfa, Kisbucsa, Kiskutas, Kispáli, Lakhegy, Nagykutas, Nagypáli, Nemesapáti, Nemeshetés, Nemessándorháza, Nemesszentandrás, Németsfalva, Ozmánbük, Pethőhenye, Pókaszepetk, Pusztaszentlászló, Salomvár, Sárhida, Söjtör, Teskánd, Vasboldogasszony, Vaspör, Vöckönd, Zalaboldogfa, Zalacséb, Zalaistvánd, Zalaszentgyörgy, Zalaszentiván, Zalaszentlőrinc	82 414	31%

1. táblázat: A vizsgált szennyvíztisztítók által ellátott települések

*5 település összesített mintája

**Az NNK az 1-es telepre érkező szennyvizet vizsgálta. A város két telepe által ellátott lakosságról nincs adat, a lakosságszám a teljes város lakosságát jelenti.

Forrás: <https://nyilvantarto.hu/hu/statisztikak> Magyarország állandó lakosságának száma az év első napján megyei és települési bontásban 2019.

A mintavételi helyek többségénél nem állt rendelkezésre automata átlag mintavevő. Az ilyen berendezések lényege, hogy meghatározott időnként (időarányos átlagminta) vagy adott térfogat átfolyása után (térfogatarányos átlagminta) automatikusan mintát vesz az átfolyó szennyvízből, majd a különböző részminták összekeveréséből reprezentatív minta készíthető, amely jól jellemzi a teljes napi szennyvíz mennyiségét. Az adatelemzés készítésekor időarányos automata mintavevő Budapest központi szennyvíztisztítóban, Kaposváron, Miskolcon, Nyíregyházán, Székesfehérváron és Szombathelyen állt rendelkezésre, a többi mintavételi hely esetében pontminta vételére került sor a reggeli csúcsterhelés idején.

A mintavételhez szükséges steril, 250 ml-es boroszilikát mintavételi üveget a Nemzeti Népegészségügyi Központ biztosította, a mintákat a szennyvíztelepek munkatársai vették, majd a kormányhivatalok a mintavételtől számított 24 órán belül, hűtve szállították az NNK laboratóriumába, ahol jellemzően azonnal megkezdődött a feldolgozásuk. A budapesti és a Budapest környéki agglomerációból származó minták szállítását a Fővárosi Csatornázási Művek végezte.

5.2.2 Víruskoncentráció

A megfelelő érzékenység elérése a SARS-CoV-2 kimutatás esetében is kulcskérdés volt. Mivel a SARS-CoV-2 tulajdonságai lényegesen eltértek a korábban vizsgált enterális vírusoktól, így ebben az esetben első lépésként egy alkalmas és hozzáférhető módszer kidolgozására volt szükség, amihez számos eljárás tesztelésre került.

5.2.2.1 Tejporos flokkuláció

Az első tesztelt módszer a már korábban is alkalmazott tejporos flokkuláció módszere volt (5.1.2. fejezet). A protokoll szennyvizek esetében kisebb eltéréseket tartalmaz, itt a kiindulási mintamennyiség 50 ml volt. A szennyvízminták feldolgozását a nagyfokú szennyezettség miatt megelőzte egy plusz előkezelési lépés is: a mintákat 1:2 térfogatarányban 0,05 M glicin oldattal elegyítettük és 30 percen át jégen kevertettük. Ezt követően centrifugálással ($8000 \times g$, 30 perc, 4°C) eltávolítottuk a lebegőanyagot, és a továbbiakban a felülúszóval dolgoztunk. A további lépések megegyeztek a korábban tárgyalt módszerrel, azonban a végső centrifugálás után keletkező pelletet 2 M foszfát pufferben szuszpendáltuk fel. Az így keletkezett koncentrátumokat a nukleinsav-kivonásig -20°C -on tároltuk.

5.2.2.2 Ultraszűrés centrifuga membránnal

Az ultraszűrési módszerek esetében szükséges a lebegő szennyeződések előzetes eltávolítása, mert a membránok eltömődéséhez vezetnének. Ennek érdekében a szennyvíz

mintákból 50 ml-t 4500 × g -n, 4°C-on 30 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót átöntöttük egy tiszta centrifugacsőbe, és a továbbiakban ezzel dolgoztunk.

A vizsgálatok során kétféle kereskedelmi forgalomban kapható ultraszűrő eszközt próbáltunk ki, a Thermo Pierce™ Protein Concentrator PES, 10K MWCO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) és a Merck Centriprep Centrifugal Filter Unit 50,000 NMWL (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) termékeket. Az egyszer használatos eszközökbe az előzetesen ülepitett mintából 5-20 ml-t lehet egyszerre betölteni, majd a beépített ultraszűrő membránon a centrifugális erő hajtja át a folyadékot. A Pierce koncentrátor esetében 4700 × g-n, míg a Centriprep esetében 1500 × g-n történt a centrifugálás szobahőmérsékleten, annyi ideig, amíg a minta nagy része átszűrődött a membránon. A megfelelő kimutatási határ elérése miatt szükség volt 50 ml minta koncentrálására, amit mindkét eszköz esetében több részletben történő feldolgozással lehetett elérni. Ebben az esetben a szűrletet eltávolítottuk az eszközből, a koncentrátumot pedig kiegészítettük a minta további részével. A teljes folyamat akár 4 órán keresztül is eltarthatott, ennek során a különböző mintákból 36-50 ml-t sikerült feldolgozni, a koncentrátum végső térfogata 0,6-12,6 ml lett.

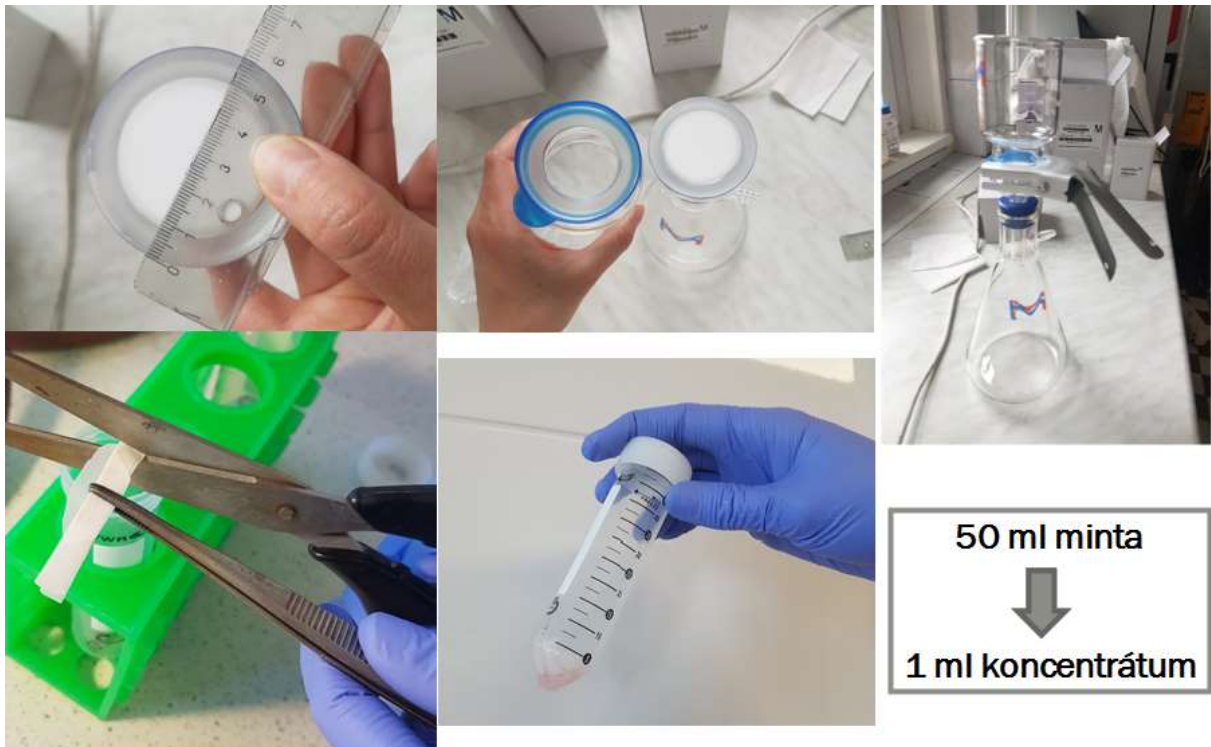
5.2.2.3 Ultraszűrés lapmembránnal

Az egyedi fejlesztésű módszer során egy eredetileg ipari, szennyvíztisztítási célra fejlesztett, polivinilidén-difluorid-alapú ultraszűrő membránt használtunk, 30 nm-es átlagos pórusátmérővel és 270 kDa visszatartási mérethattárral (SUEZ Water Technologies and Solutions Hungary, Tatabánya, Magyarország). A membránok vékony, 5*5 cm-es lapokban, nátrium-hipoklorit tartósítószer oldatban érkeztek a laboratóriumba. Felhasználás előtt a tartósítószer legalább két órán keresztül, 37°C-on, steril foszfát pufferben történő áztatással távolítottuk el. A folyamat során a membránokat folyamatosan nedvesen kellett tartani, mert a kiszáradás következtében roncsolódott volna a szerkezetük.

A minta előkészítése a kereskedelmi forgalomban kapható eszközökhöz hasonlóan az ülepedő szennyeződések eltávolításával kezdődött (50 ml minta centrifugálása 4500 g-n, 30 percig, 4°C-on), majd a felülúszót egy üveg szűrőberendezésbe helyezett ultraszűrő membránra öntöttük. A szűrés negatív nyomáson (kb. 400 mBar) történt, szobahőmérsékleten, időigénye kb. 30-90 perc mintánként. Amikor a minta átszűrődött a membránon, a membránt égetéssel sterilizált olló és csipesz segítségével apró darabokra vágtuk, és 1 ml vírus transzport médiumban (VTM) 1 perc vortexeléssel lemostuk róla a vírusrészecskéket. A folyamatot a 10. ábra szemlélteti. Az így nyert koncentrátumot -80°C-on tároltuk.

Az ultraszűréshez szükséges szűrőberendezés üvegből készült, amely megnehezíti az egymást követő minták között szükséges sterilizációt. Ehhez a szűrőfejet és a szűrőtölcséreket 10

percig áztattuk kb. 3%-os nátrium-hipokorit oldatban, steril desztillált vízzel előblítettük, majd 10 percig UV-boxban sterilizáltuk. A negatív kontroll minták eredményei igazolták a módszer hatékonyságát.



10. ábra: vírushminták feldolgozása lapmembránnal

5.2.2.4 Koncentráció elektronégatív membránon

Az elektronégatív membránon történő koncentrációt Ahmed és mtsai. (2020) módszere alapján végeztük. Mivel a nagyobb pórusátmérőjű membrán kevésbé tömődik el a szennyvíztől, a módszert előkészítés nélkül és előkészítő centrifugálással ($4500 \times g$, 30 perc, $4^\circ C$) is kipróbáltuk. A minták egy részét $MgCl_2$ oldat hozzáadásával (végkoncentráció: 25 mM) is előkezeltük a szűrés előtt. A szűréshez $0,45 \mu m$ pórusátmérőjű kevert cellulóz-észter membránt (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) használtunk.

A minta átszűrése után a membránokat az ultraszűrő membránnál alkalmazott módszerhez hasonlóan apró darabokra vágtuk, 1 ml VTM-et (vírus transzport médium) mértünk rá, majd 1 percig vortexeltük. Az így keletkezett koncentrátumot pipettával leszívtuk a membrándarabokról és a nukleinsav-kivonásig $-20^\circ C$ -on tároltuk.

5.2.2.5 Vírusvisszanyerés a szennyvíz üledékből

Az eddig felsorolt minta-előkészítési módszerek többségében a vírus nukleinsavának kimutatása a lebegőanyagok eltávolítása után történt. Ismert ugyanakkor, hogy a vírusrészecskék a lebegőanyagokhoz kötve is előfordulhatnak a szennyvízben, így a

legegyszerűbb víruskoncentrálni a módszert, hogy a centrifugálással nyert pelletből nyerjük vissza a vírust.

A lebegő részecskék ülepedéséhez a mintát centrifugáltuk ($4500 \times g$, 30 perc, $4^{\circ}C$), majd a felülúszót leöntöttük. A pelletből azonnal elkezdtük a nukleinsav-kivonást.

5.2.2.6 Egyéb kereskedelmi forgalomban kapható rendszerek

A pandémia során bebizonyosodott, hogy a szennyvíz alapú epidemiológia kiemelten fontos eszköz a járvány kontrolljában. Miután egyre több laboratórium kezdett víruskoncentrálni, kereskedelmi forgalomban is megjelentek célzottan szennyvízből történő víruskoncentrálni vagy nagyobb térfogatú mintából történő nukleinsav-kivonást kínáló kitek. A vizsgálatok során egy ilyen rendszert is kipróbáltunk.

A Zymo Environ Water RNA kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) esetében a koncentrálni lépés egy puffer hozzáadásával kezdődik (Water Concentrating Buffer™). Az eredeti protokoll 5 ml szennyvíz minta koncentrálniát ajánlja, de arányosan több puffer hozzáadásával nagyobb térfogat is használható. A vizsgálatok során 5 – 50 ml szennyvíz minta koncentrálniája történt. 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után centrifugáltuk az elegyet ($3000 \times g$, 15 perc, szobahőmérséklet), a felülúszót eltávolítottuk és a pellettel dolgoztunk tovább a gyártó utasításainak megfelelően. A kit sok egymást követő tisztítási lépést tartalmaz, sejtalmos feltárás után három különböző oszlopon történik a nukleinsav tisztítása. Az RNS eluátum végső térfogata 6 μ l. Az RNS-t a tisztítás után $-70^{\circ}C$ -on tároltuk.

5.2.3 Folyamatkontrollok

A SARS-CoV-2 vizsgálatokhoz alkalmazott folyamatkontrollokhoz egy hazai, 2020 első felében izolált humán törzset (SZ-16) használunk. A törzs izolálása, fenntartása és hővel történő inaktiválása az NNK Nemzeti Biztonsági laboratóriumában történt. Inokulum készítéséhez az izolátumot kezdetben töményen használtuk, 2020. június közepétől kezdve pedig 100x-os hígításban adtuk a szennyvíz mintához. Mindkét esetben 50 μ l inokulumot adtunk 50 ml mintához, a várt koncentrálni (hígított inokulum hozzáadásása esetében) a 10^6 GC/L tartományba esett.

Negatív kontrollként felforralt csapvizet használtunk az esetleges keresztszennyezések kizárása érdekében.

5.2.4 Nukleinsav-kivonás

A SARS-CoV-2 kimutatása esetében a nukleinsav-kivonó készletekből szintén hiány mutatkozott 2020 első felében, ezért a vizsgálatok korai szakaszában (2020 tavasz – nyár)

számos kereskedelmi forgalomban kapható kitet kipróbáltunk. A módszerek legfontosabb tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze.

Nukleinsav-kivonó kit	ajánlott minta	kiindulási térfogat (µl)	elúciós térfogat (µl)	12 minta feldolgozásához szükséges idő
Zymo Quick-RNA Fecal/Soil Microbe Microprep	széklet, talaj	< 250	15	kb. 2,5 óra
MN NucleoSpin RNA Stool	széklet	180–220	100 – 60	kb. 2,5 óra
Qiagen QIAamp Viral RNA	plazma, vérsavó, sajtmentes testfolyadékok, sejtkultúra felülúszó	140	100 – 30	kb. 1 óra
Omega Biotech E.Z.N.A Viral RNA	sejtmentes folyadékok	150	50 – 20	kb. 1 óra

2. táblázat: a szennyvízből történő RNS kivonásra tesztelt nukleinsav-kivonó készletek legfontosabb jellemzőinek összehasonlítása

A nukleinsav-kivonást a kereskedelmi forgalomban kapható kitek esetén a gyártó utasításai szerint végeztük. Elúciós térfogatra minden esetben a kit által ajánlott legkisebb térfogatot választottuk, a minél töményebb RNS kivonat előállítására, ezáltal minél alacsonyabb alsó méréshatár elérése érdekében.

A rendszeres vizsgálatokhoz 2020. 37. hetétől (09. 07.) kizárólag a Qiagen QIAamp Viral RNA mini kitet használjuk. A kittel történő előkészítés viszonylag kevés lépésből áll: a minta líziséhez 10 perc inkubáció szükséges, ezt az RNS szilika oszlopra kötése követi, majd két mosási lépést követően kaphatjuk meg a tisztított nukleinsavat. A kit az RNS degradálódását csökkentő hordozó RNS-t (carrier RNA) is tartalmaz. A Omega Biotech E.Z.N.A Viral RNA kit (Omega Biotech Ltd. Kavi Nagar, India) minimális eltéréssel ugyanezekkel a lépésekkel dolgozik. Ezzel szemben a székletre ajánlott kitek 3 különböző szilika oszlopot tartalmaznak az inhibitorok tökéletesebb eltávolítása érdekében, a nukleinsav tisztítása pedig jóval több lépésből áll.

5.2.5 Mennyiségi RT-PCR

A SARS-CoV-2 kimutatás esetében az enterális vírusokkal ellentétben a vírus mennyiségének meghatározása is megtörtént RT-qPCR segítségével. A kvantitatív PCR LightCycler 480 Instrument II platform készülékben történt LightCycler Multiplex RNA Virus Master kittel (Hoffmann-La Roche, Basel, Svájc). A reakcióhoz használt primereket és

próbákat a CDC ajánlása alapján választottuk, a vírus nukleokapszid N 1 (N1) génjére tervezett szekvenciákkal (2019-nCoV-N1-F, GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT; 2019-nCoV-N1-R: TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG; 2019-nCoV-N1-P: FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG ACC-BHQ1) (CDC, Atlanta, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>).

A vírus kópiaszámát egy kereskedelmi forgalomban kapható kópia kontrol (EURM-019, European Commission Joint Research Center, Geel, Belgium) standard görbéje alapján állítottuk be, automatikus küszöbérték-meghatározással.

5.2.6 Digitális droplet PCR (ddPCR)

A ddPCR módszer nagyon érzékeny és pontos kópiaszám meghatározást tesz lehetővé. A kópiaszám meghatározásához nem szükséges külső standard koncentrációhoz viszonyítani a mennyiséget, így számos hiba kizárható (pl. standard degradációja vagy nem megfelelő hígítása), és olyan célgének koncentrációja is pontosan és egyszerűen mérhető, amihez nem kapható kereskedelmi forgalomban standard. Az alapelve nem tér el a hagyományos PCR reakcióktól, a vizsgálathoz az előző alfejezetben tárgyalthoz hasonló próbás qPCR reakciókhoz ajánlott primerek és próbák is használhatóak.

Az előkészített, mintát is tartalmazó, alaposan homogenizált reakcióelegyből olajos emulziót készítünk, a PCR pedig ezekben a különálló cseppecskékben zajlik. A reakció végén a PCR terméket egy detektorba vezetjük, amely az egyes cseppecskéket külön-külön vizsgálja, hogy képződött-e bennük fluoreszcens termék. A pozitív cseppecskék számából statisztikai értékeléssel számolható ki a célgén kópiaszáma.

5.2.6.1 Mutációk kimutatása ddPCR-rel

A SARS-CoV-2 alfa variáns jellemző mutációinak (N501Y, delH69/V70) és azok vad változatainak egyidejű, kvantitatív kimutatása a Bio-Rad (Hercules, CA, USA) dd-RT PCR mutáció detektáló próbáit használtuk (N501Y assay ID: dMDS731762551, delH69/V70 assay ID: dMDS284738817).

A 22 µl-es reakcióelegy (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes, Bio-Rad Hercules, CA, USA) 5,5 µl one-step RT-ddPCR Supermixet, 2,2 µl reverse transzkriptázt, 1,1 µl 300 mM DTT-t, 1 µl mutáció kimutató próbát, 7,2 µl vizet és 5,0 µl tisztított RNS kivonatot tartalmazott.

A reakcióelegyből az olajos emulziót (dropletet) Automated Droplet Generator (Bio-Rad, CA, USA) segítségével állítottuk elő, az RT-ddPCR-t a BioRad T100 Thermal Cycler platformon (Bio-Rad, Hercules CA, USA) végeztük (25°C 30 perc pre-inkubáció, 50°C 60 perc reverz transzkripció, 95°C 10 perc enzim aktiváció, 40 ciklus a következőkből: 95°C 30 s

denaturáció, 55°C 60 s anelláció/extenzió; 98°C 10 majd enzim deaktiváció (2°C/s hőmérséklet-változás minden lépés esetében). A PCR-t egy éjszakán át, 4°C-on történő droplet stabilizáció követte.

A keletkezett termék leolvasása QX200 system (Bio-Rad, Hercules CA, USA) készülékben történt, az adatok értékelésére a QuantaSoft™ Analysis Pro 1.0.596 programot használtuk (Bio-Rad, Hercules CA, USA).

5.2.7 Járványügyi adatok

A COVID-19 esetszám adatok (a fertőzés igazolásának dátuma, tartózkodási hely település, illetve Budapest esetében kerület szinten, az esetleges elhalálozás dátuma) a Nemzeti Népegészségügyi Központ által működtetett Járványügyi Szakrendszer (OSZIR – Országos Szakmai Információs rendszer) adatbázisából származnak.

A COVID-19 miatt kórházi kezelésre szorulóknak számára vonatkozó adatokat a COVID-19 járvánnyal kapcsolatos ügyekkel megbízott Operatív Törzs hivatalos jelentéseiből gyűjtöttük le.

A SARS-CoV-2 variánsok előfordulására vonatkozóan az NNK Nemzeti Biztonság Laboratórium COVID laboratóriumában megvizsgált klinikai minták adatait használtuk fel.

5.2.8 A szennyvíz minőségi jellemzői, normalizálási módszerek

Az egyes szennyvíztelepekre naponta beérkező nyers szennyvíz mennyiségéről a szennyvíztelepek üzemeltetői szolgáltatott adatot. A napi összesített vírusterhelést a beérkező szennyvíz mintavétel napján mért térfogata (L) és a SARS-CoV-2 eredmény (GC/L) szorzataként állapítottam meg. Negatív eredmény esetében a SARS-CoV-2 kimutatás elvi alsó kimutatási határával számoltuk.). Az elvi alsó méréshatár kalkulációjához az 1 genom kópia/PCR reakció értéket vettük alapul, ebből kalkuláltuk az eredeti szennyvízminta egy literére vonatkoztatott eredményt a nukleinsav-kivonás és a minta koncentráció lépéseit figyelembe véve. Az alsó méréshatár így vizsgálati módszerenként változik, a statisztikai értékelésben felhasznált eredmények esetében 1710 GC/L.

A pontmintavételek esetében a hígulás mértéke fekális indikátorok mérésével pontosabban meghatározható. Erre a fekális enterococcusok kimutatásának módszerét használtunk, amelyet a laboratórium már korábban rutinszerűen végzett, a kimutatást és számszerűsítést az MSZ EN ISO 7899-1:2000 szabvány szennyvizekre vonatkozó része szerint végeztük. A tenyésztési módszer lényege, hogy a minta különböző hígításait (2x – 200 000x) előkészített mikrotiter lemez zsebeibe töltjük, így hígításonként 16 párhuzamos zseb keletkezik. A fekális

enterococcusokat tartalmazó zsebek elbontják a tápfolyadékban található MUD-ot (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside), így fluoreszcens festék és meggypiros csapadék keletkezik. A koncentráció a pozitív zsebek száma alapján MPN módszerrel (most probable number – legvalószínűbb szám) számítható. A vizsgálatokhoz a BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, California, USA) által gyártott MUD/SF mikropléteket használtuk.

A normalizálás során úgy tekintettem, hogy a szennyvíz fekális *Enterococcus* tartalma egyenesen arányos a fekális frakció arányával. Feltételezve, hogy az egy megbetegedetre eső átagos SARS-CoV-2 ürítés állandó (azonos variáns esetén), a SARS-CoV-2 kópiaszám és a fekális *Enterococcus* csíraszám arányából megállapítható a szennyvíztelep ellátási területén élő COVID-19 betegek számának alakulása.

5.2.9 Statisztikai értékelés

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 (Almon 1965). Utóbbi modell alkalmazása során kiküszöbölhető az a probléma, hogy az egymás után következő adatok nem tekinthetően egymástól független pontnak, hiszen az adott heti fertőzöttszám hatással van a következő heti fertőzöttszámra. A módszer ennek a jelenségnek a torzítását igyekszik csökkenteni, emellett megmutatja, hogy különböző késleltetési idők esetében az egyes időpontokban jelentkező hatások (pl. azonos időben, egy héttel, két héttel stb. később) milyen hatással vannak egy függő változóra. Ez alapján becsülhető, hogy egy adott hatás eredménye milyen eltolási idővel jelentkezik legerősebben.

6. Eredmények és értékelésük

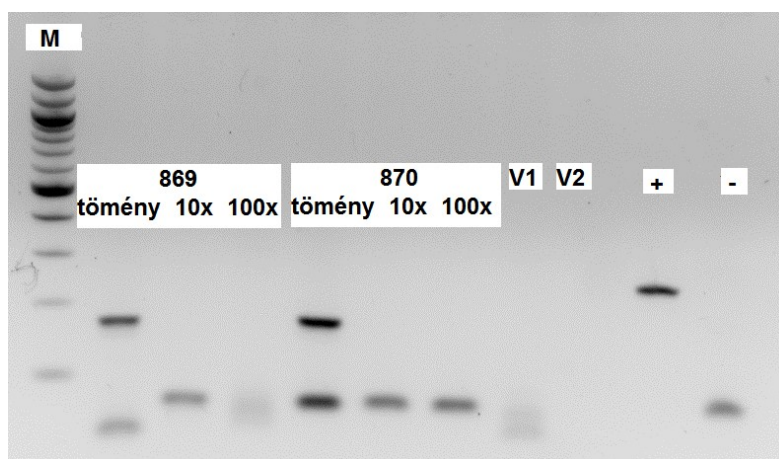
6.1 Enterális járványok kivizsgálása

6.1.1 Calicivírus járványok kivizsgálása

A II. genocsoportba tartozó norovírusok vizsgálatára három esetben került sor az adatgyűjtés ideje alatt:

- 2015 júliusában egy területi calicivírus járványról értesült a népegészségügyi hatóság. Az érintettek egy alföldi, kis kiterjedésű tónál kijelölt strandon fürödtek, ezért felmerült, hogy a járványt a tó vize terjeszthette (Tó1)
- Egy kórház területén 2016 júliusában calicivírus járvány zajlott, aminek a forrásaként az epidemiológiai kivizsgálás során a kórház közelében található gyógyvíz ivókutakat azonosították (K1, K2, K3)
- Egy vidéki kisvárosban egy 13 hónapos gyermek a család a helyi gyógyfürdőben tett látogatása után calicivírus fertőzést kapott. Az apa elmondása alapján egy ismerős család négy tagja korábban hasonló lappangási idővel hasonló tüneteket észlelt a fürdő látogatását követően. A család az ott tartózkodásuk ideje alatt kizárólag a fürdő gyermek pancsolóját és csúszda fogadó medencéjét használta, ezért a mintavételek is ezekből a medencékből történtek 3 nappal az eset után (M1, M2) 2017. 02. 15-én.

A vízminták norovírus irányú vizsgálata során a Tó1 minta esetében nem képződött PCR termék, míg a másik öt minta esetében jól kimutatható termék jelent meg, azonban nem a pozitív kontrollal azonos magasságban, hanem attól kb. 50 bp. eltéréssel (11. ábra).



11. ábra: Az M1 (labor azonosító: 869) és M2 (labor azonosító: 870) minták norovírus GII nested PCR eredményei. A mintákat az esetleges gátló hatások csökkentése érdekében 10x-es és 100x-os hígításban is vizsgáltuk. A PCR reakció mindkét köre tartalmazott vak mintát (V1, V2), valamint pozitív és negatív kontrollt. A tömény mintákban PCR termék keletkezése figyelhető meg, amely azonban a pozitív kontrollban keletkező terméknél kb. 50 bp.-al rövidebb. M: 100 bp molekulásúly marker

A PCR termék a medencevíz minták mellett a K1-3 minták több hígításában is azonos magasságban jelent meg, az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

Minta	hígítás	PCR termék
M1	tömény	+
	10x	-
	100x	-
M2	tömény	+
	10x	-
	100x	-
K1	tömény	+
	10x	+
	100x	-
K2	tömény	+
	10x	+
	100x	+
K3	tömény	+
	10x	-
	100x	-

3. táblázat: A norovírus GII nested PCR eredmények összefoglalása. Minden mintából három különböző hígítás készült az esetleges gátló anyagok hatásának csökkentése, valamint hozzávetőleges koncentráció meghatározása érdekében. A vizsgálat minőségi meghatározást tett lehetővé a PCR termék jelenlétének (+) vagy hiányának (-) kimutatásával.

Mivel a minták többségéből megközelítőleg azonos hosszúságú termék keletkezett, némely minták esetében több hígításban is, ezért feltételeztük, hogy a vízben jelen levő vírus a gén egy rövidebb mutációját tartalmazta. Az M1 és M2 minták esetében ezért a PCR termékből Sanger-szekvenálás történt, ez azonban nem járt értékelhető eredménnyel, feltételezhetően a kevert vírustörzset tartalmazó környezeti minta miatt. Az eredmények alapján a hamis PCR termék keletkezését sem lehetne kizárni, ebben az esetben is további vizsgálatot igényelne, hogy miért képződött több, egymástól térben és időben független minta esetében is megközelítően azonos hosszúságú termék.

A mintákat minden esetben több nappal a feltételezett expozíció után vették, így nem kizárható, hogy az adott víztest vírustartalma változhatott, adott esetben jelentősen csökkenhetett a mintavétel idejére. Így teljes mértékben a Tó1 (nem képződött PCR termék) esetében sem zárható ki teljes mértékben, hogy a fürdővíz okozta a fertőzést. Felszíni vizek esetében a vízminőség különösen gyorsan változhat, a fertőződés és a mintavétel időpontjában megfigyelt időjárásról nem állnak rendelkezésre információk. Calicivírusok jelenléte természetes vizekben nem számít ritkának (Boehm, Graham, és Jennings 2018), nagyszámú fertőzést okozó természetes fürdővíz okozta járvány is ismert (Schets és mtsai. 2018). A minta fekális indikátor paramétereiről sajnos nem állnak rendelkezésre adatok. A negatív eredmény

alapján azonban valószínűbbnek tűnik, hogy ebben az esetben nem a fürdővíz, hanem más forrás (pl. strandon árusított élelmiszer) okozhatta a fertőzéseket.

A kútvíz minták (K1-3) esetében a népegészségügyi hatóság epidemiológiai elemzése alapján a megbetegedések egyértelműen a gyógyvíz kutakból származó víz fogyasztásával voltak összefüggésbe hozhatóak (a területileg illetékes kormányhivatal Népegészségügyi Főosztályának szóbeli közlése alapján). Irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a norovírusok képesek ivóvízbázisokba (Ekundayo és mtsai. 2021), valamint természetes ásványvizet adó rétegekbe is eljutni, ezzel összefüggésben már palackozott ásványvíz okozta járványt is leírtak (Guix és mtsai. 2019). A vizsgált esetben a kétes PCR eredményekkel együtt is erősen feltételezhető, hogy a kútvíz közvetítette a fertőzéseket.

A medencevíz minták (M1, M2) esetében az eredmények megítélése kétesebb, hiszen ebben az esetben epidemiológiai bizonyítékok korlátozottan állnak rendelkezésre. Megerősített esetnek csupán egy család tagjai tekinthetőek, a másik család esetében nem történtek laboratóriumi vizsgálatok a fertőzés kórokozójának kimutatásra. Mindkét medencéből 4 nappal a feltételezett expozíció után történt mintavétel. Ez a többi esethez képest gyorsnak mondható, azonban a medencék fertőtlenített, szűrő-forgató technológiája miatt a kórokozók így is könnyen inaktiválódhattak, vagy kihígulhattak a fürdővízből. norovírus fertőzéseket többször is leírtak már fertőtlenített medencevizekkel kapcsolatban is (Maunula és mtsai. 2004; Paranthaman és mtsai. 2018). Ezzel együtt az adott esetben a fertőzések kapcsolatát a medencevízhez sem megerősíteni, sem cáfolni nem lehetett egyértelműen.

A jövőben szükség van az alkalmazott vizsgálati módszer fejlesztésére a megbízhatóbb eredmények érdekében. Mivel az itt használt PCR módszer esetében gyakran volt megfigyelhető nem várt méretű PCR termék képződése, érdemes lehet egyéb protokollokat tesztelni. A próbás qPCR reakciók szintén csökkentik a hamis pozitív termékek detektálásának esélyét, növelik az eredmény megbízhatóságát, megfelelő standardok használatával mennyiségi információt is adhatnak. A minden minta esetében alkalmazott RNS vírus visszanyerés kontrollal (pl. MS2) a hamis negatív eredmények kockázata is csökkenthető lenne. A megbízható és folyamatosan rendelkezésre álló, környezeti minták esetében alkalmazható norovírus kimutatási módszer kidolgozása és fenntartása epidemiológiai szempontból mindenképpen fontos lenne. Ez azonban csak abban az esetben lehet valóban hatékony, ha a feltételezett járványok esetében minden gyanús esetben és a lehető leggyorsabban érkezik minta a laboratóriumba.

6.1.2 Hepatitis A halmozódás kivizsgálása

A hepatitis A kimutatás egy minta esetében történt meg, egy család ivóvíznyerésre használt kútja (K4 esetében. A családban magánkút vizét fogyasztotta, és többen hepatitis A fertőzést kaptak 2016 nyarán, így lehetséges fertőzőforrásként felmerült a kút vize is. A mintából a beágyazott (nested) PCR reakció során nem képződött PCR termék, míg a vírusvisszanyerés ellenőrzésére használt adenovírus kimutatás pozitív eredményt adott.

Mivel a mintavétel ebben az esetben is hetekkel a feltételezett expozíció után történt, így itt sem lehet teljes mértékben kizárni, hogy a vírus az eltelt idő alatt kihígulhatott a kútból. A fertőzés azonban ebben az esetben csupán egy család tagjait érintette, akik számos egyéb módon is átadhatták egymásnak a fertőzést (használati tárgyakkal, közös étel fogyasztása, szoros kontaktus). A hepatitis A esetében azt találták, hogy a szocio-ökonómiai státusz jobban összefügg a fertőzés valószínűségével, mint a hálózati vízhez való hozzáférés (Koroglu és mtsai. 2017), így valószínű, hogy a fertőzés az esetek többségében nem ivóvízzel történik. Az adott esetben sem zárható ki egyértelműen a kútvíz által közvetített fertőzés, de az esélye nagyon kicsi, feltételezhető, hogy az érintett család egyéb forrásból fertőződött.

A hepatitis A vízből történő kimutatása a fenti okokból a norovírusokénál kisebb jelentőségű, azonban a vizsgálati módszer fenntartása ebben az esetben is indokolt.

6.1 Az alkalmazott SARS-CoV-2-kimutatási módszerek összehasonlító értékelése

Az emberi megbetegedést okozó kórokozó vírusok előfordulása környezeti vizekben alacsony koncentrációban is közegészségügyi jelentőséggel bírhat. Mennyiségük jellemzően jóval alacsonyabb, mint az általánosan használt indikátor szervezeteké, így a kimutatáshoz nagy mennyiségű minta feldolgozása szükséges. Emiatt a környezeti mintákból történő víruskimutatás kulcskérdése a megfelelő koncentrálnálási módszer megtalálása. Az ideális módszer azonban egyrészt a vírus tulajdonságaitól függ (rendelkezik-e lipid burokkal, mérettartomány), másrészt befolyásolja a naponta feldolgozandó minták száma és a mintaszállítás ütemezése is. Míg burokkal nem rendelkező enterális vírusok esetében korábban már rendelkezett a laboratórium bevált módszerrel, a SARS-CoV-2 kimutatás esetében a megfelelően érzékeny és nagy mintaszámra is kivitelezhető módszer megtalálása komoly kihívást jelentett.

6.1.1. Víruskoncentrálnálási módszerek

Mivel a tejpóros flokkuláció módszere már ismert volt, és a hozzá szükséges anyagok és eszközök rendelkezésre álltak a laboratóriumban, a SARS-CoV-2 szennyvízből történő kimutatása esetén is kipróbálásra került az eljárás. Csúpan két párhuzamos mérés készült ezzel

a módszerrel, ezek esetében 0,8, illetve 12% visszanyerést mértünk az azonos mennyiségű, koncentráció után inokulált kontroll mintához képest.

Szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatás esetében a tejporos flokkulációs módszer további hátránya, hogy nagy az időigénye (minta-előkészítés, 8 óra kevertetés, 8 óra üleptetés), és nehezen kezelhető vele az országos monitoring működtetéséhez szükséges nagyobb mintaszám. Ennek oka, hogy a kevertetés mintánként külön mágneses keverőkön történik, ami napi 8-12 minta feldolgozásakor nehezen kivitelezhető.

A szakirodalomban a tejporos flokkuláció módszerének használatára is találni példát SARS-CoV-2 esetében (Philo és mtsai. 2021), ebben a tanulmányban hasonlóan alacsony, 10% körüli visszanyerést tapasztaltak átlagosan. A hasonló elven működő PEG (polietilén-glikol) vagy alumíniumsókkal történő koncentráció azonban gyakoribb a szakirodalomban (Wu és mtsai. 2021; Salvo és mtsai. 2021; Farkas és mtsai. 2021).

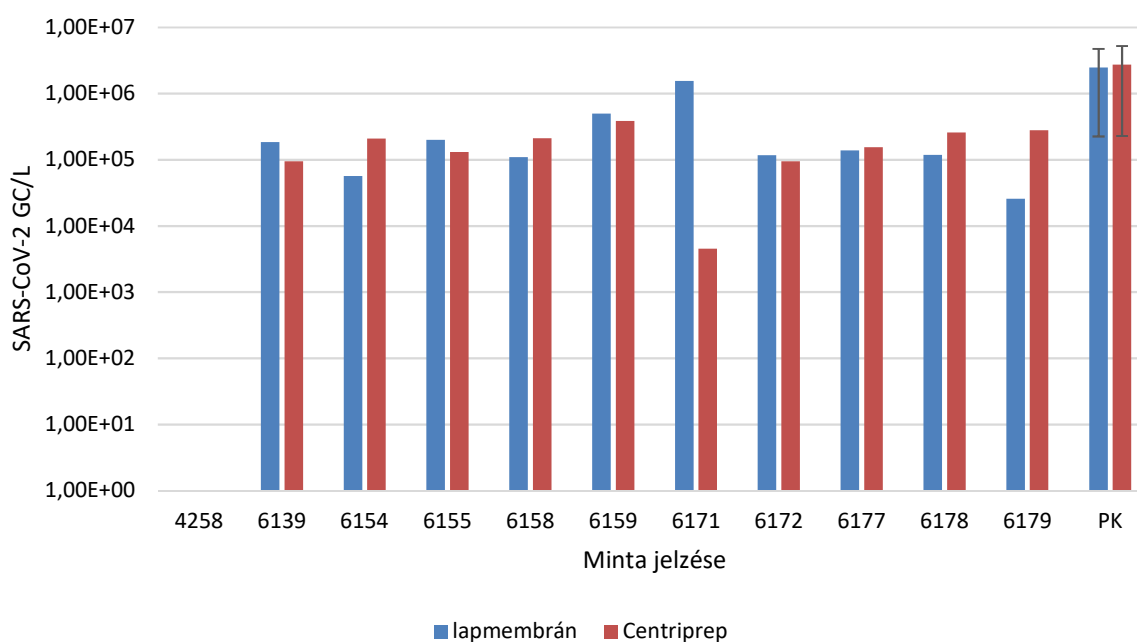
A további módszereket kizárólag a SARS-CoV-2 szennyvízből történő kimutatása esetén próbáltuk ki. A visszanyerés számítása mindegyik esetben úgy történt, hogy a hővel inaktivált SARS-CoV-2-t tartalmazó kontroll vízminta eredményét olyan minta eredményéhez hasonlítottuk, ahol az azonos mennyiségű izolátumot a koncentráció lépést követően adtuk a mintához, és a továbbiakban azonos módon dolgoztuk fel a mintákat.

A flokkulációs módszerekkel ellentétben a különböző ultraszűrő membránok esetében nem a részecskék kémiai tulajdonságai alapján történik az elválasztás, hanem méret alapján. A kereskedelmi forgalomban kapható eszközöket eredetileg fehérjék dialízisére fejlesztették ki, azonban régóta ismert, hogy vírusok koncentrációjára is alkalmasak lehetnek (Heijnen és Medema 2011). A szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatással kapcsolatos első közlemények esetében is ilyen eszközöket használtak (Medema, Been, és mtsai. 2020; Wurtzer és mtsai. 2020), emiatt az általunk kipróbált első módszerek között is szerepeltek.

2020-ban, a COVID-19 első hullámában a molekuláris diagnosztikai fogyóanyagok nagy része hiányterméknek számított. A pandémia okán jelentősen megnőtt az érdeklődés a vizekből történő víruskimutatással kapcsolatban is, és az első biztató publikációk után hozzánk hasonlóan számos kutatócsoport igyekezett ultraszűrő eszközöket beszerezni. Ebből kifolyólag már a módszerfejlesztés korai szakaszában nyilvánvalóvá vált, hogy rendszeres, nagy mintaszámú felmérés nem tervezhető a kereskedelmi forgalomban kapható eszközökkel.

Egy biztos ellátási láncot ígérő módszer kidolgozása érdekében felvettük a kapcsolatot a SUEZ Water Technologies and Solutions Hungary tatabányai membrán fejlesztési központjával, mivel egy korábbi projekttel kapcsolatban már ismert volt, hogy képesek vírusvisszatartó ipari membránokat gyártani.

Az első ultraszűrő berendezés, amelyet sikerült beszerezni, a Thermo Scientific Pierce™ Protein Concentrator berendezése volt. A módszert 3 párhuzamos pozitív kontroll mintán próbáltuk ki, azonban SARS-CoV-2 egyik párhuzamosból sem volt visszanyerhető. Az ultraszűrő membránokat alkalmazó egyedi módszer esetében ezzel szemben átlagosan 96%-os visszanyerést mértünk (n=7), míg a Merck által forgalmazott Centriprep ultraszűrő berendezéssel átlagosan 80%-ot (n=3). Utóbbi két módszer esetében már lehetőség volt a mesterségesen inokulált minták mellett valós minták összehasonlító értékelésére is, az eredményeket a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra: 3 mesterségesen inokulált minta (PK) és 11 valós szennyvíz minta a SUEZ WTS által gyártott egyedi ultraszűrő membránnal és a Merck Centriprep centrifuga ultraszűrő berendezéssel koncentrálnva. Egy valós minta (4258) bizonyult negatívnak SARS-CoV-2-re mindkét módszerrel, az ábrán az elvi alsó kimutatási határ szerepel (1710 GC/L). A mesterségesen inokulált pozitív kontroll minták esetében az eredmények átlaga és szórása jelenik meg (n=3). Nukleinsav-kivonásra mindegyik módszer esetében a Qiagen QIAamp Viral RNA kitet használtuk.

A két módszer a mesterségesen inokulált minták esetében kivétel nélkül nagyságrendileg hasonló eredményt adott, míg a valós minták közül egy esetben (6171) találtunk jelentős különbséget a két érték között. A két adatsor statisztikai értékelése azt mutatta, hogy a két módszer között nincs szignifikáns különbség (párosított t-próba, t érték: 0,073; kritikus t érték kétszélű: 2,16; $p < 0,05$).

Az egyező visszanyerés mellett a két módszer kivitelezhetősége jelentősen különbözik egymástól. Míg az ultraszűrő membrán esetében a minta egyszerre a szűrőberendezésbe rögzített filterre önthető, és az élő munka igényt kizárólag a vákuum érték 5-10 percenként történő szabályozása jelenti, a centrifuga membránok ennél jóval nehezebben használhatóak. A

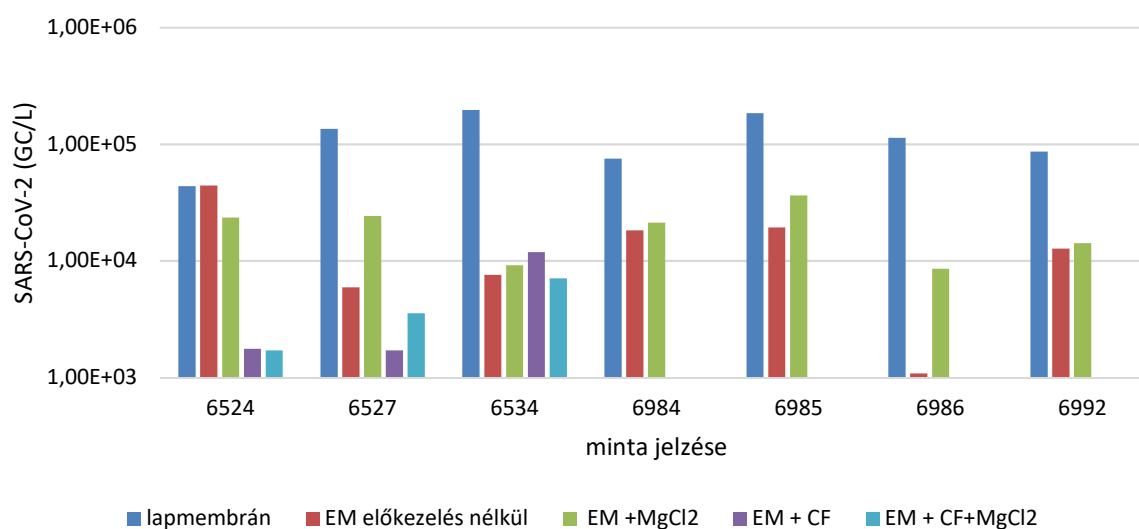
Centriprep ultraszűrő egyidejű befogadóképessége csupán 15 ml minta egyidejű befogadására alkalmas, így 50 ml minta koncentrációja esetében többször újra kell tölteni a berendezést, ami több minta egyidejű feldolgozása esetén hibalehetőséggel is jár, míg kisebb mintamennyiség feldolgozása esetében a kimutatási határ csökken. A különböző minták nem egyenletesen szűrődnek, emiatt a berendezések tömegét folyamatosan ellenőrizni kell a centrifuga kiegyensúlyozása érdekében.

A szűrés ideje mindkét ultraszűrési módszer esetében hosszú (akár több óra), azonban a flokkulációs módszereknél így is jelentősen rövidebb. A lapmembrán esetében 50 ml minta 0,5-3 óra alatt koncentrálnak 1 ml-re 400 mBar körüli vákuum értéken, míg a Centriprep esetében 2-4 órát vett igénybe 36-50 ml minta 0,6-12,6 ml-re koncentrációja. További hátrány tehát a Centriprep esetében, hogy az eltérő koncentrálnak mintamennyiség miatt a kimutatási határ is mintánként változhat.

Az ultraszűrő membránok használata elterjedt az irodalomban, az első hivatkozások a Merck Centricon berendezését használták (Medema, Heijnen, és mtsai. 2020). Ez anyagában megegyezik az általunk használt Centripreppel, azonban képes 50 ml minta egyidejű befogadására. A módszerbeállítás ideje alatt a berendezés nem volt beszerezhető, ezért nem került kipróbálásra. Később a hasonló elven működő Amicon ultraszűrő berendezés is több hivatkozásban megjelent (Westhaus és mtsai. 2021; LaTurner és mtsai. 2021), a vizsgálat ideje alatt ennek a kipróbálására sem volt lehetőség.

Annak érdekében, hogy a folyamatos alapanyag-ellátás minden esetben biztosított legyen, és megtaláljuk az áteresztőképesség szempontjából is optimális módszert, további koncentrálnak eljárásokkal is kísérleteztünk.

Az egyik legegyszerűbb eljárásnak az elektronegatív membránon történő koncentrálnak tűnt. Ennek során egy viszonylag nagy ($45\ \mu\text{m}$) pórusátmérőjű membránon abszorpcióval kötődnek meg a vírusrészecskék, majd onnan kisebb térfogatban lemoshatóak. A módszer további előnye, hogy a feldolgozáshoz használt kevert cellulóz észter membrán számos tenyésztési vízmikrobiológiai folyamatban használatos, így a laboratóriumban nagy mennyiségben rendelkezésre állt, és az utánpótlásával kapcsolatban sem merültek fel nehézségek. A szűréshez szükséges vákuumszűrő berendezés szintén rendelkezésre állt a laboratóriumban, és egyszerre akár 6 minta is feldolgozható rajta. A szűrőfejek gázlánggal sterilizálhatóak, a szűrőtölcsek pedig cserélhetőek és gőzsterilizálás után újrahasználatosak. Az elektronegatív membránon történő koncentrálnak különböző előkezelési módok alkalmazásával összesen 7 valós mintán teszteltük, az eredményeket a 13. ábra mutatja be.



13. ábra: Elektronegatív membránon történő koncentráció négy különböző módszerrel és lapmembránon történő ultraszűrési módszerek összehasonlítása 7 valós szennyvíz mintán. Rövidítések: EM: elektronegatív membránon történő koncentráció, +MgCl₂: a minta előkezelése szűrés előtt MgCl₂ oldattal (végkoncentráció: 25 mM), CF: szűrés előtt a minta ülepedő szennyeződéseinek eltávolítása centrifugálással. Minden minta esetében pozitív eredményt kaptunk, így az alsó kimutatási határ figyelembevételére itt nem volt szükség. Nukleinsav-kivonásra mindegyik módszer esetében a Qiagen QIAamp Viral RNA kítet használtuk.

Mind a négy elektronegatív membránon történő koncentrációsi módszert csupán három minta esetében próbáltuk ki tájékozódó jelleggel. Két minta esetében az eredmények hozzávetőleg egy nagyságrenddel alacsonyabbak lettek, mint az ekkorra rutin módszerként használt lapmembrános ultraszűrés esetében, a pellet eltávolítása a három mintából kettőnél tovább rontott az érzékenységen. Utóbbi nem meglepő, hiszen a víruspartikulumok egy része a lebegőanyaghoz köthet, ugyanakkor ezeket a lebegőanyagokat az ultraszűrési módszer esetében is eltávolítottuk.

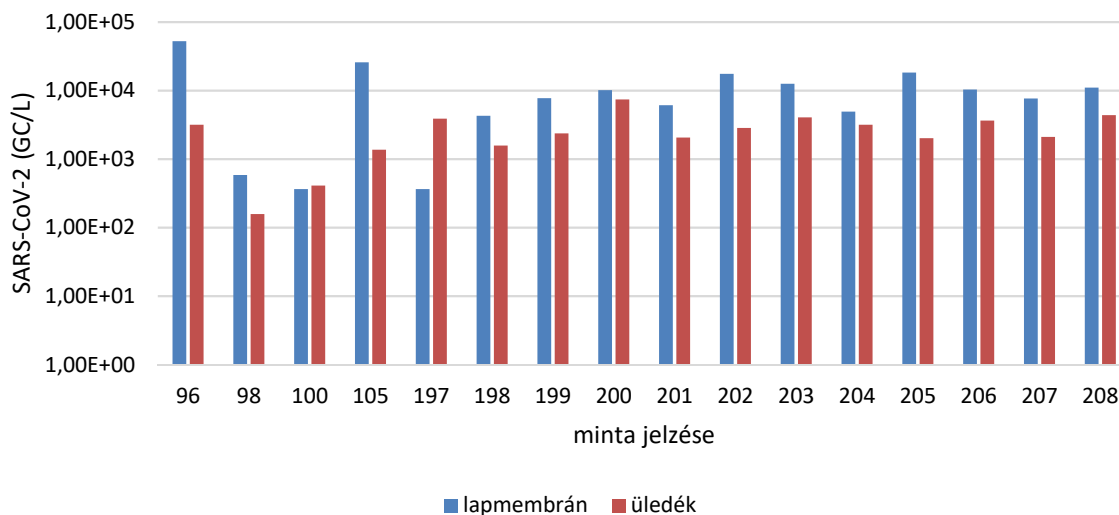
További négy minta esetében a centrifugálással előkészítés lépését már kihagytuk. Az eredmények azonban 7 minta esetében is azt mutatták, hogy a módszer az esetek többségében (6/7 minta) legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb eredményt adott, mint a referencia módszerként használt membrán ultraszűrés. Statisztikai értékelést itt az alacsony mintaszám miatt nem végeztünk, az eredmény azonban így is egyértelmű. A visszanyerés kiszámítása ezen módszer esetében nem történt meg, mivel ebben az időszakban a friss szennyvíz minták SARS-Cov-2 kópiaszáma jellemzően magas volt, a tájékozódó jellegű vizsgálathoz pedig a valós minták összehasonlító értékelését megfelelőbbnek tartottuk.

Az elektronegatív membránon történő koncentráció beállítása Ahmed és mtsai. (2020) módszere szerint történt. A kutatócsoport egy állati koronavírus (egér hepatitis vírus) visszanyerési hatékonyságát vizsgálta különböző módszerekkel, ők a MgCl₂ előkezelést követő elektronegatív membránon történő koncentrációt az ultraszűrésnél (Amicon) is hatékonyabbnak

találták átlagosan 65,7%-os visszanyeréssel, ami jobb, mint az általunk mért eredmények. Az eltérést okozhatta, hogy vizsgálataik során a membrán lemosásához sejtmalmsos feltárást is használtak.

A módszer időigénye és áteresztőképessége jobb, mint az ultraszűrési módszereké, az alacsony visszanyerés miatt azonban nem találtuk célszerűnek a módszer további vizsgálatát.

Legegyszerűbb módszernek a centrifugálással nyert üledékből történő vírusvisszanyerés tűnt. Ez a feldolgozási mód nagyon gyors, hiszen az egyéb módszerek esetében időigényes szűrés teljesen kikerülhet vele. Hátránya, hogy a nukleinsav-kivonási módszerek közül csak a szilárd mintákra is alkalmazható kitekkel használható, amelyek jóval időigényesebbek, mint a rutinszerűen használt módszer (ld. később). A módszert 16 valós minta esetében teszteltük, az eredmények a 14. ábrán láthatóak.



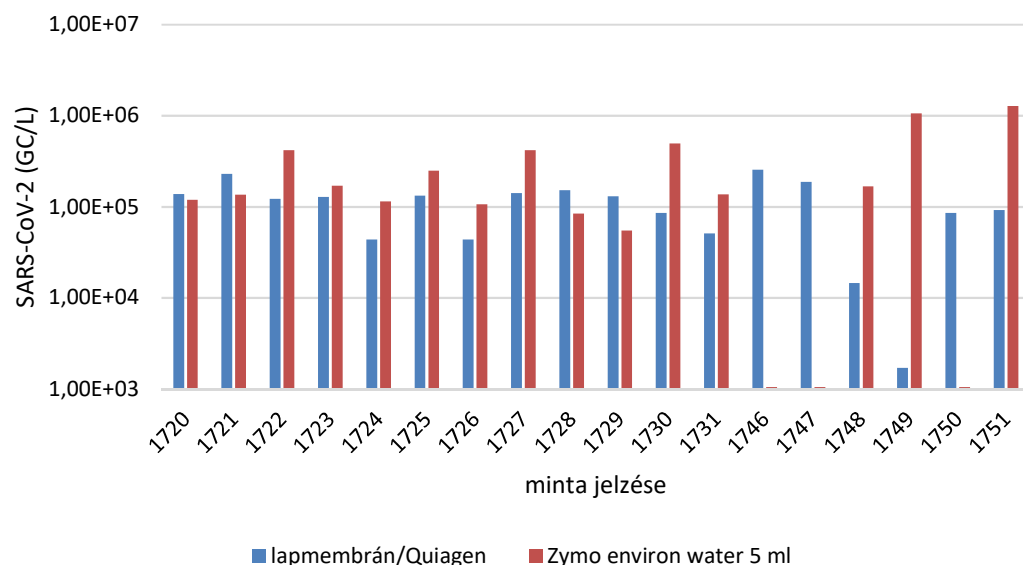
14. ábra: Az üledékből történő közvetlen nukleinsav-kivonás és az ultraszűrő membránon történő víruskoncentráció összehasonlítása. Minden minta esetében pozitív eredményt kaptunk, így az alsó kimutatósi határ figyelembevételére itt nem volt szükség. Nukleinsav-kivonásra az ultraszűrési módszer esetében a Qiagen QIAamp Viral RNA kitet használtuk, míg a pelletből történő nukleinsav-kivonásra a Zymo Quick-RNA Fecal/Soil Microbe Microprep kitet.

Annak ellenére, hogy munkaszervezés szempontjából ez a módszer mutatkozott a legjobbnak, a visszanyerése sajnos nem ideális. A minták többségében (14/16) alacsonyabb eredményt adott, mint az ultraszűrési módszer, bár kisebb az eltérés, mint az elektronegatív membránon történő koncentráció esetében. A statisztikai értékelés alapján a pelletből történő nukleinsav-kivonás módszere szignifikánsan különbözik a membrán ultraszűrési módszertől (párosított t-próba, t érték: 2,85; kritikus t érték kétszélű: 2,13; $p < 0,05$). Ugyan a szakirodalomban publikált módszerek többsége az ülepedő szennyeződések eltávolításával kezdődik, előfordulnak üledékből történő vizsgálatok is. Philo és mtsai. (2021) a szennyvíziszapból vettek mintát, ennek vizsgálatát érzékenyebbnek találták a vizsgált

szennyvíz koncentrációs módszereknél (PEG és tejporos precipitáció, ultraszűrés). Míg a vizsgált iszap minták hozzávetőleg 70%-a bizonyult pozitívnak az N1 génre, addig a többi vizsgált módszer esetében a pozitivitási arány 31,1 és 22,1% között változott ugyanerre a szakaszra. Más csoportok a szennyvízkezelés során leülepedő szennyvíziszapból történő mintavétellel és SARS-CoV-2 kimutatással a COVID-19 esetszámok előrejelzése is lehetségesnek találták (Peccia és mtsai. 2020; Balboa és mtsai. 2021). Az eltérő eredmények magyarázata feltehetően a módszerek közötti kisebb eltérések lehetnek (az iszap természetes ülepedése vagy centrifugával történő ülepítés, a centrifugálás eltérő sebessége). A szennyvíz összetétele, a szennyvíztisztítóban alkalmazott ülepítési mód, a tartózkodási idő, valamint a szennyvíz hőmérséklete szintén befolyásolhatja a módszer eredményességét.

A kereskedelmi forgalomban kapható kitek közül a Zymo Environ Water kitje került kipróbálásra. A módszer egy koncentráló puffer hozzáadásával, precipitációs elven alapul, magában foglalja a nukleinsav tisztítását is. Emiatt nagyon gyors a feldolgozás, mindössze néhány perces inkubálásra és centrifugára van szükség. Hátránya, hogy csupán 5 ml mintából indul ki, a kis térfogatú eluálás miatt azonban az elvi kimutatási határ (1050 GC/L) így is kissé alacsonyabb, mint a standard módszerként használt lapmembrános ultraszűrés és Qiagen QIAamp Viral RNA kittel történő nukleinsav-kivonás között (ld. később).

A módszert 18 valós szennyvíz minta esetében hasonlítottuk össze az addigra standard módszerként használt ultraszűréssel (15. ábra).



15. ábra: Zymo Environ Water kittel történő koncentráció - nukleinsav-kivonás és lapmembránnal történő koncentráció és Qiagen QIAamp Viral RNA kittel történő nukleinsav-kivonás összehasonlítása 18 valós minta esetében. A Zymo Environ Water kittel 3 minta, míg az ultraszűréssel 1 minta eredménye lett negatív, ezeket az elvi kimutatási határral helyettesítettük (1050, illetve 1710 GC/L)

A két módszer eredményeinek összehasonlítása nagyon vegyes képet ad: bár 12 minta eredménye nagyságrendileg megegyezik mindkét módszerrel, 6 minta eredménye azonban jelentős különbséget mutat. A Zymo Environ Water kittel 3 minta, míg az ultraszűréssel 1 minta negatív eredményt adott, azonban olyan minta nem volt, amely minkét módszerrel negatív lett volna SARS-CoV-2-re, a párhuzamos feldolgozás ezekben az esetekben magas eredménnyel zárult. Az eltérések okát nem sikerült tisztázni, bár szerepet játszhatott az is, hogy az egyes mintákból eltérő mennyiségű csapadék képződött a koncentráló puffer hozzáadása után Zymo Environ Water kit esetében. Az eredményeket a fentiek miatt nem találtuk elég megbízhatónak, így a továbbiakban nem használtuk a terméket. Hasonló módszerek alkalmazása az irodalomban egyelőre nem elterjedt, egy izraeli kutatócsoport azonban sikeresen alkalmazta az általunk is használt kitet (Yaniv és mtsai. 2021)

A kit esetében limitációt jelent, hogy a nukleinsav-kivonás után nem marad a későbbiekre eltárolható koncentrátum. Ez azért probléma, mert különböző okokból többször is szükségesnek bizonyult megismételni a nukleinsav-kivonás lépését. Ezen kitek esetében a teljes folyamat megismétlése lenne szükség, a nyers szennyvízből kiindulva, amelyet ugyan szintén eltárolunk, de így az ismétlés jóval hosszadalmasabb és költségesebb, és a fagyasztás-olvasztás során csökken az RNS koncentráció a mintákban.

A vizsgált víruskoncentrálnási módszerek tulajdonságait SARS-CoV-2 koncentrálnása esetében a 4. táblázat foglalja össze.

	Tejporos flokkuláció	Centrifuga ultraszűrő	Ultraszűrő membrán	Elektron-negatív membrán	Ülepítés (pellet)	Kereskedelmi kit (Zymo)
Visszanyerés	-	+++	+++	+	+	++
Időráfordítás	-	+	++	++	+++	+
Áteresztőképesség	+	+++	++	+++	+++	++
Beszerezhetőség	+++	-	+++	+++	+++	+
Ár	+++	+	+++	+++	+++	+

4. táblázat: az általunk tesztelt víruskimutatási módszerek előnyeinek és hátrányainak áttekintése SARS-CoV-2 kimutatásra. Vastag kerettel kiemelve a kiválasztott koncentrálnási módszer. -: nem megfelelő, +: elfogadható, ++: megfelelő, +++ kiváló

A kipróbált víruskoncentrálnási módszereket összehasonlítva az egyedi gyártású lapmembrán bizonyult a legalkalmasabbnak a hosszútávú, nagy mintaszámú vizsgálatokra. A tejporos flokkulációt, az elektronegatív membránt és az üledékből történő vírusvisszanyerést az ultraszűrésnél lényegesen alacsonyabb visszanyerés miatt vetettük el, míg a kereskedelmi

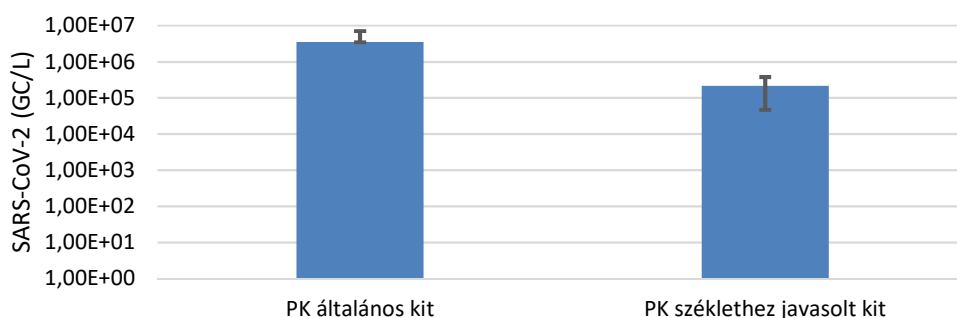
ultraszűrő berendezések az elsődleges probléma a beszerezhetőség volt. A vizsgálatok későbbi szakaszában utóbbi probléma már megoldódott, a lapmembrános szűrés azonban hosszútávon is jobban illeszkedett a laboratórium munkafolyamataiba. A kereskedelmi forgalomban kapható koncentráció kit nem adott a korábbi módszerrel kellően összehasonlítható eredményt, így a váltást nem találtuk célszerűnek.

6.1.2 Nukleinsav-kivonási módszerek összehasonlítása

Mivel a pandémia kezdetén a nukleinsav-kivonó kitek nagyon nehezen beszerezhetőnek bizonyultak, számos módszer kipróbálásra került. Az alapfeltevésünk az volt, hogy a szennyvíz mintához erősen szennyezett mátrixokhoz (széklethez vagy talajhoz) ajánlott nukleinsav-kivonó kitet érdemes alkalmazni.

Mivel a kitek nem minden esetben álltak rendelkezésre egy időben, ezért ebben az esetben az azonos módszerrel készített pozitív kontrollok eredményeit hasonlítottuk egymáshoz. A Zymo Quick-RNA Fecal/Soil Microbe Microprep kit és az MN NucleoSpin RNA Stool kit összehasonlítását 6-6 pozitív kontroll minta esetében végeztük el. A módszerek közötti különbség nem bizonyult szignifikánsnak (párosított t-próba, t érték: 2,13; kritikus t érték kétszélű: 2,57; $p < 0,05$). A kétféle általános (sejtmentes testfolyadékhoz javasolt) kit esetében lehetőség volt 52 valós és 6 kontroll (3 pozitív és 3 negatív) minta feldolgozására is. Ebben az esetben már előfordultak jelentős eltérések: 10 olyan valós minta is volt, amely a Qiagen QIAamp Viral RNA mini kittel pozitív, míg az Omega Biotech E.Z.N.A Viral RNA kittel negatív eredményt adott. Statisztikai értékelés során ennek ellenére nem bizonyult szignifikánsnak a különbség (párosított t-próba, t érték: 1,73; kritikus t érték kétszélű: 2,00; $p < 0,05$).

A két széklet mintához és a sejtmentes testfolyadékokhoz javasolt kitek között azonban már jelentős különbségeket találtunk (16. ábra).



16. ábra: Az általános (Qiagen QIAamp Viral RNA mini kit és Omega Biotech E.Z.N.A Viral RNA kit, $n=15$) és széklethez javasolt (Zymo Quick-RNA Fecal/Soil Microbe Microprep kit és az MN NucleoSpin RNA Stool kit, $n=12$) nukleinsav kivonó kitek eredményeinek átlaga és szórása azonos módon inokulált szennyvíz minták esetében. PK: pozitív kontroll

Az eltérő típusú kitek között egyértelmű különbséget tapasztaltunk, a várakozással szemben az általános kitek bizonyultak jobbnak. A különbség statisztikailag is szignifikáns (párosított t-próba, t érték: 3,12; kritikus t érték kétszélű: 2,06; $p < 0,05$). A várakozásunkkal ellentétes eredmény feltehetőleg abból adódik, hogy a széklethez javasolt kitek esetében – a PCR-t gátló anyagok eltávolítása érdekében – nagyon sok lépésből áll a nukleinsav tisztítása, amely lépések mind valamekkora mintaveszteséggel járnak. Az eredmények azt mutatják, hogy az így keletkezett veszteség nagyobb, mint a minta esetleges gátló anyagai miatt fellépő PCR hiba. Mivel a pozitív kontrollok is szennyvíz mintából készültek, a PCR gátlás ezek esetében is jelentkezett volna. A visszanyerési hatékonyság különbségei mellett említésre érdemes az is, hogy a széklethez javasolt kitek esetében a feldolgozási idő két-háromszorosa az általános kitekhez szükséges időhöz képest.

A különböző kutatócsoportok eltérő nukleinsav-kivonási módszereket használnak sikeresen. Széklet vagy talajmintákra optimalizált (Wurtzer és mtsai. 2020; Peccia és mtsai. 2020), általános klinikai mintákhoz ajánlott kitek (Westhaus és mtsai. 2021; Agrawal, Orschler, és Lackner 2021) használatára is találni példát, emellett hagyományos, kloroformos tisztítási módszert is alkalmaznak (Wu és mtsai. 2021). Egy, az Amerikai Egyesült Államokban szervezett laborközi összemérés során számos vizsgálati módszer (koncentrálás és nukleinsav-kivonás) összehasonlítása történt meg SARS-CoV-2 kimutatásra szennyvíz mintából (Pecson és mtsai. 2021). A vizsgálat során jelentős eltéréseket, akár két nagyságrend különbséget találtak a különböző módszerekkel dolgozó laboratóriumok között, azonban a vizsgálatban nem sikerült megállapítani, hogy az eltérést a koncentrálás, a nukleinsav-kivonás vagy a PCR reakcióban használt alapanyagok eltérése okozza. A tanulmány arra a következtetésre jutott, hogy számos módszer megfelelő lehet, azonban az eredmények összehasonlíthatósága miatt fontos, hogy egy laboratórium azonos módszerrel dolgozzon.

A tesztelt kitek tulajdonságait SARS-CoV-2 szennyvízből történő kimutatásra az 5. táblázat foglalja össze.

	Zymo Quick- RNA Fecal/Soil	MN NucleoSpin RNA Stool	Qiagen QIAamp Viral RNA	Omega Biotech E.Z.N.A Viral RNA
Visszanyerés	+	+	+++	+++
Időráfordítás	-	-	++	++
Ár	+	+	+++	++

5. táblázat: a tesztelt nukleinsav-kivonó kitek összehasonlítása szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatásra. Vastag kerettel kiemelve a kiválasztott módszer -: nem megfelelő, +: elfogadható, ++: megfelelő, +++ kiváló

A nukleinsav-kivonó kitek esetében a kiválasztott kit (Qiagen QIAamp Viral RNA) nem csak visszanyerés, de időráfordítás tekintetében is jobban bizonyult a széklethez vagy talajhoz ajánlott kiteknél. A másik, általános RNS kivonó kittel összehasonlítva kevésbé egyértelmű a különbség, azonban az intézetben egy másik beszerzésből több ilyen kit is rendelkezésre állt, így ezeket fel tudtuk használni a vizsgálatokhoz.

6.1.3 A SARS-CoV-2 RT-qPCR módszer jellemzői

A módszer beállítása során a qPCR protokollon érdemi változtatás nem történt, az Amerikai Egyesült Államok járványügyi hatósága által javasolt N1 primer-próba szettet használtuk. A kezdeti méréseknél (2020 nyarán) a reakcióelegyben belső kontrollt (internal control) is használtunk. Az eredmények egyik minta esetében sem mutattak jelentős gátlást egyik vizsgált nukleinsav-kivonási módszer esetében nem. A későbbiekben a belső kontroll használatát elvetettük, mivel csökkentheti a vizsgálat érzékenységét.

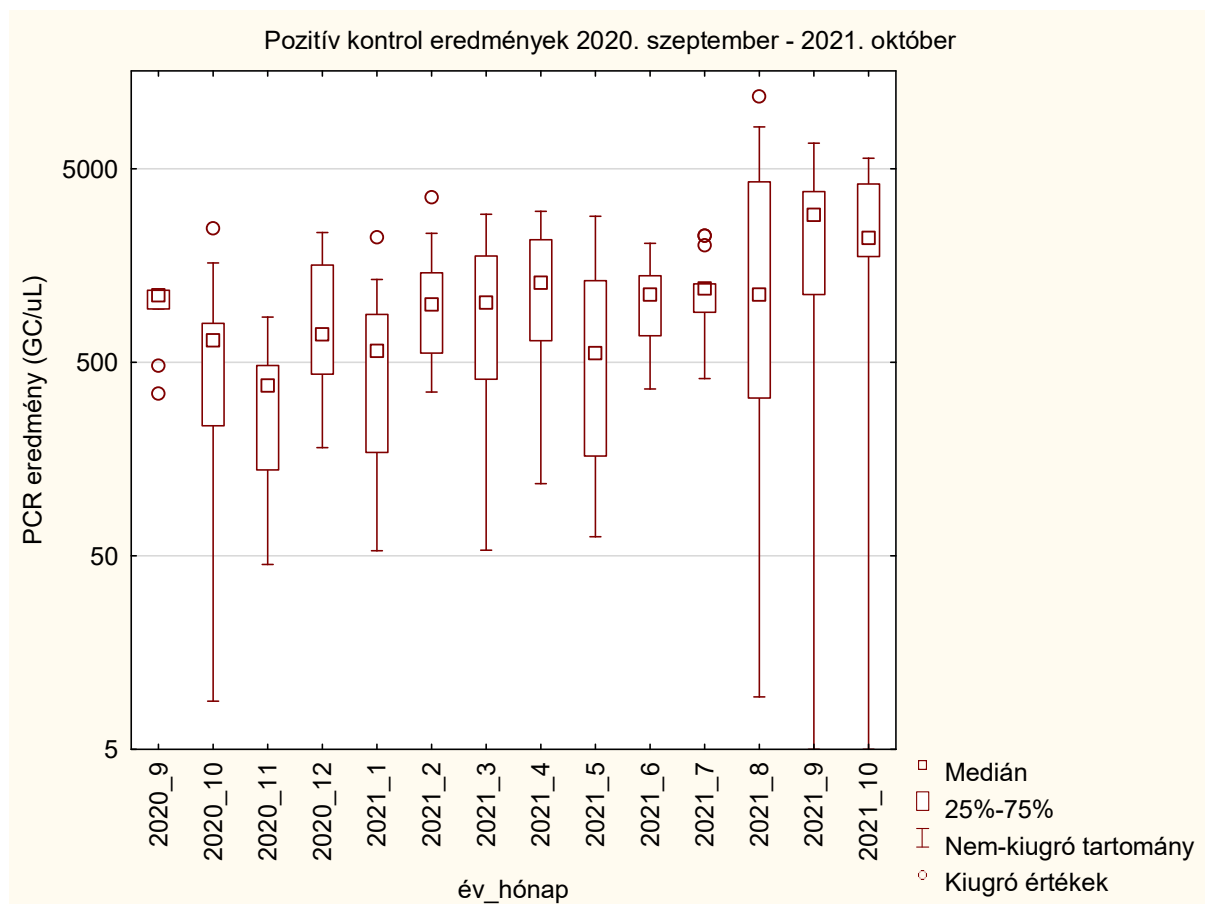
A módszer alsó méréshatárát az EURM-019 kópia kontroll (European Commission Joint Research Center, Geel) hígítási sorának mérésével ellenőriztük. Mind az alsó kimutatási határ (LoD), mind az alsó méréshatár (LoQ) 0,703 kópia/ μ l-nek adódott, amely (reakciótól függően) a 35. ciklus körül mutatja e legintenzívebb fluoreszcencia-növekedést (ciklus küszöbérték, cycle threshold – Ct). Az ennél magasabb Ct értékek a PCR reakció hibáját vagy hamis pozitív eredményt jelezhetnek. Az LoQ értékét az eredeti mintára visszaszámítva a teljes módszer elméleti alsó méréshatára 1710 GC/L. Az eredmények értékelése során minden Ct értéket pozitívnak tekintettünk, az elméleti alsó méréshatárnál alacsonyabb eredményeket azonban az elméleti alsó méréshatárral helyettesítettük. Azért választottuk ezt a módszert, mivel a szennyvízminták elemzésekor a méréshatár körüli eredményeket hasonlóan értelmeztük, függetlenül attól, hogy negatívnak vagy gyengén pozitívnak bizonyultak (hiszen ebben a koncentráció-tartományban az eredmény véletlenszerű lehet).

6.1.4 A kiválasztott módszerek jellemzői

Fentebb összefoglaltuk a tesztelt SARS-CoV-2 kimutatási módszerek előnyeit és hátrányait. A módszerek áteresztőképességét, érzékenységét és hozzáférhetőségét figyelembe véve a lapmembránon történő ultraszűrést, majd a QiaAmp Viral RNA mini kittel történő nukleinsav-kivonást választottuk. A SARS-CoV-2 specifikus RT-qPCR ezt követően a Roche LightCycler Multiplex RNA Virus Master kittel, a CDC által javasolt N1 primer szettel történt.

A módszer stabilitását jól jellemzi a mintafeldolgozási naponként készített pozitív folyamatkontrollok eredményei (17. ábra). A vizsgált időszakban összesen 183 eredmény

született azonos módszerrel (ultraszűrés lapmembránnal, nukleinsav-kivonás Qiagen QIAamp Viral RNA kittel). A pozitív kontroll mintákat az adott napon beérkező szennyvíz mintákból választottuk ki. A munkafolyamatok optimalizálása érdekében ez általában az adott napon elsőként beérkező minta, így a kiválasztása nem teljesen véletlenszerű, azonban az elemzett időszakban minden vizsgált mintavételi pontról érkező mintából készült pozitív kontroll. Az eredmények értékeléséhez a nyers PCR eredményeket vettem figyelembe, hogy az eredeti mintára történő átszámítás ne befolyásolja a szórást. A PCR eredmények mediánja $9,42 \cdot 10^2$ GC/ μ l-nek adódott. Az eredményeket a 18. ábra mutatja be. Bár előfordult néhány negatív eredmény is (ezt a kontroll minta alapját képező szennyvíz minta gátlása, esetleg feldolgozási hiba okozhatta), az eredmények többsége viszonylag szűk tartományban mozgott.



17. ábra: A kiválasztott referencia módszerrel készült pozitív kontroll minták PCR eredményei

6.4 COVID-19 előrejelző rendszer eredményei

Az országos felmérés eredményeit 2020. július elejétől (27. hét) mutatja be a dolgozat. Néhány eredmény már korábbról is rendelkezésre állt, az ország minden megyeszékhelyéről azonban ekkortól érkeztek rendszeresen minták.

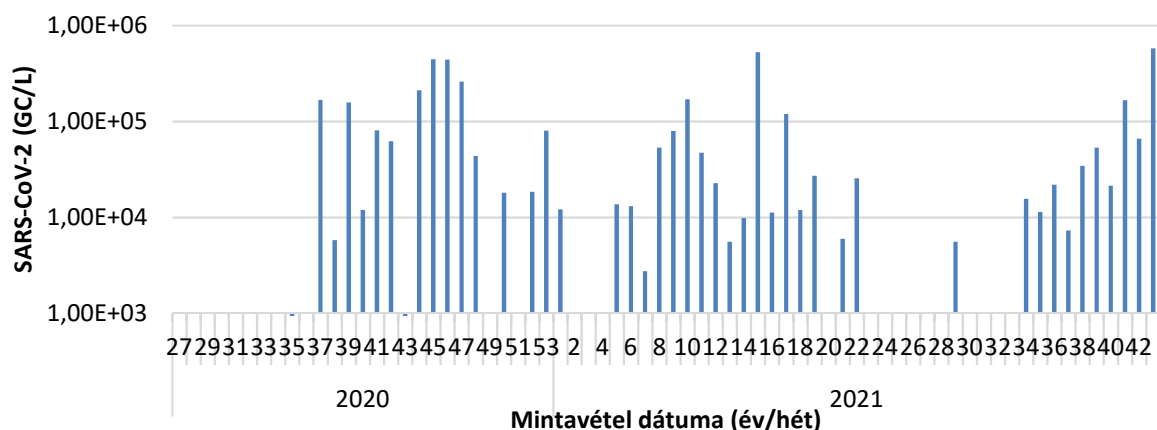
Az adatok záró dátuma 2021. október vége (43. hét). A vizsgált időszakban összesen 1738 nyers szennyvíz minta vizsgálata történt meg a laboratóriumban. A járványhullámok összehasonlításához az országos eredmények további néhány hetét figyelembe vettük 2021. 50. hetéig, annak érdekében, hogy a járvány teljes 4. hulláma elemzésre kerüljön. A heti rendszeres vizsgálatok természetesen ezt követően is folytatódtak.

6.4.1 Normalizálási módszerek összehasonlítása

A szennyvíz minősége (pl. közös rendszerek esetében a csapadékvízzel történő hígulás miatt) jelentős időbeli változásokat mutathat. A különböző városok esetében a jellemző értékek is eltérőek lehetnek, így elengedhetetlenül szükséges egy olyan korrekciós tényező, amellyel ezek az értékek összehasonlíthatóvá válnak.

A normalizálási módszerek hatását Miskolc példáján mutatjuk be. Azért erre a városra esett a választás, mert a szennyvíztelepének ellátási területén élő lakosság szám a harmadik legnagyobb, Budapesttel ellentétben egyetlen szennyvíztelep látja el, és rendelkezik automata mintavevővel (ellentétben Debrecennel, valamint Budapest északi és déli szennyvíztelepével).

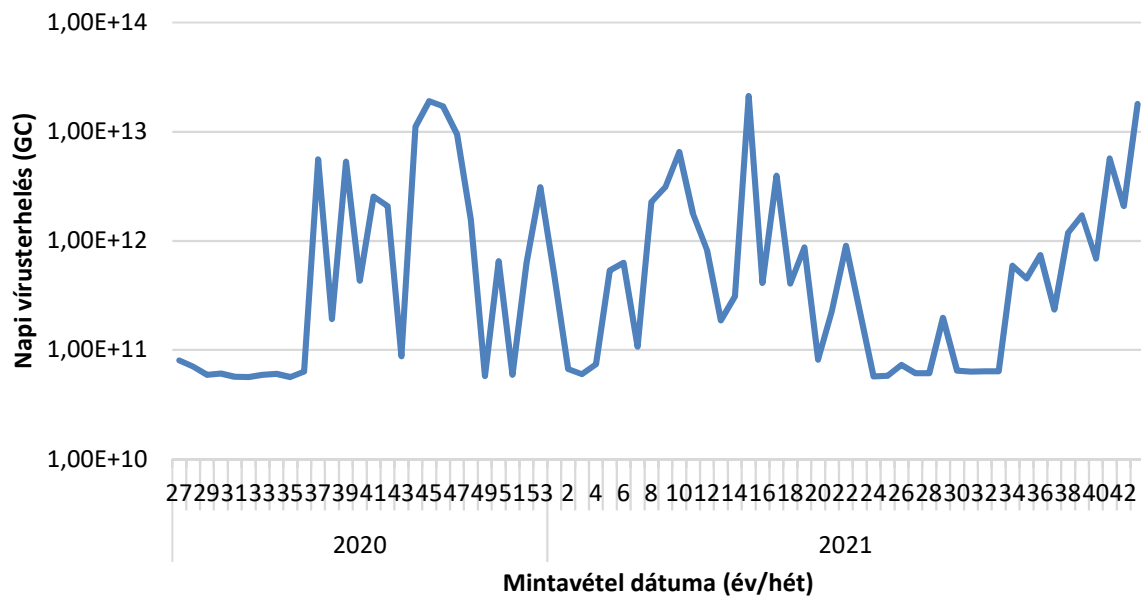
A város esetében a nyers SARS-CoV-2 kópiaszám eredményeket a 18. ábra szemlélteti.



18. ábra: A Miskolcra beérkező szennyvíz minták SARS-CoV-2 eredményei normalizálás nélkül 2020 július és 2021 október között. Miskolcra az Európai Bizottság 2021-es ajánlása értelmében 2021. szeptember elejétől (36. hét) heti két minta érkezett vizsgálatra, ebben az esetben a heti eredménynél a két minta átlagát tüntettem fel. A negatív és elvi kimutatási határ alatti eredmények 0-ként szerepelnek, a tengely azonban az elvi kimutatási határhoz (1710 GC/L) közel kezdődik.

Az eredmények normalizálásának egyik legegyszerűbb eszköze a szennyvíz mennyiség változásának figyelembevétele. Ebben az esetben a napi összesített vírusterhelés kiszámításához a literre vonatkoztatott SARS-CoV-2 eredményt a szennyvíztelepre beérkező

nyers szennyvíz térfogatával (L) szorozzuk össze. A módszer egyik hátránya, hogy a különböző méretű városok eredményei így nem hasonlíthatóak össze, ezt azonban kiküszöbölhetjük, ha a napi vírusterhelést egységes lakosságszámra (pl. 100 000 főre) vonatkoztatjuk. A normalizálási módszer hatását Miskolc esetében a 19. ábra szemlélteti.



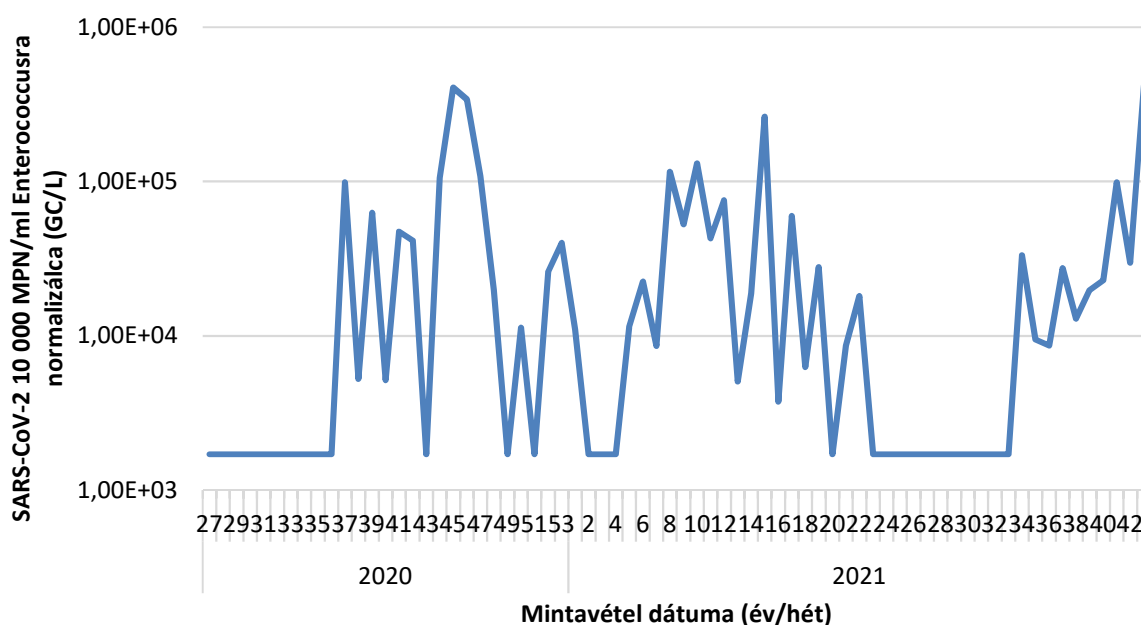
19. ábra: a miskolci szennyvíz SARS-CoV-2 vírusterhelése a mintavételek napján 2020 július és 2021 október között. 2021. 36. hete óta heti két minta érkezik a településről, ebben az esetben a heti eredménynél a két érték átlagát tüntettünk fel. A negatív és elvi kimutatási határ (<1710 GC/L) eredmények esetében az elvi kimutatási határral számoltuk.

A napi szennyvíz térfogattal végzett normalizálásnak további akadályja volt, hogy a térfogat adatokat a vizsgálatok során nem sikerült minden helyről időben beszerezni. A mintával ugyan küldtek az üzemeltetők mintavételi jegyzőkönyvet, azonban ezen nem tudták feltüntetni a napi térfogatot (a mintavételkor még nincs meg a teljes napi adat), az adatok későbbi rendszeres megküldése pedig nem minden szennyvíztelep esetében volt gördülékeny.

A fekál indikátorok nyomjelzőként való használatának előnye, hogy mérésük közvetlenül a beküldött mintából történik, hasonlóan a SARS-CoV-2-höz, így az eredmény jobban reprezentálja a mintát, mint a napi szennyvíz térfogat. Mikrobiológiai indikátorként a fekális enterococcusokat használtuk. Az irodalomban ennek a nyomjelzőnek a használata nem általános, elterjedtebb a CrAssphage vagy a PMMoV használata (Medema, Been, és mtsai. 2020). A vizsgálatok kezdetekor bevezetése melletti fő érvünk az volt, hogy a módszert az NNK vízhygiénés laboratóriumában már korábban rutinszerűen használtuk, a szükséges anyagok is rendelkezésre álltak. Így a SARS-CoV-2 kimutatási módszer fejlesztésére koncentrárlhattunk, és az eredményeket egy stabilan működő módszer eredményéhez hasonlítottuk. Ellenkező

esetben két új, beállítás alatt lévő módszer eredményeit kellett volna egymáshoz viszonyítanunk.

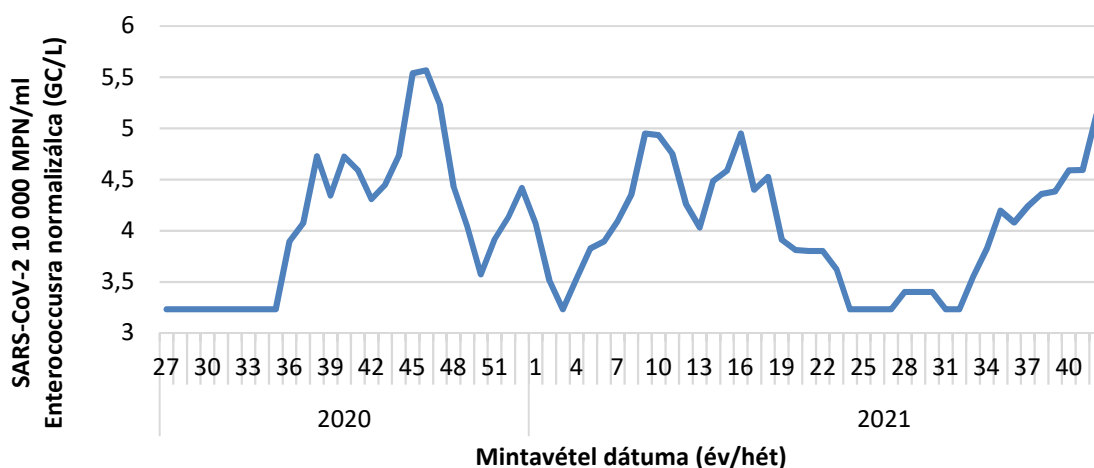
Az eredmények normalizálására legelőször 2020 augusztusában lett szükség, amikor az első egyértelműen pozitív SARS-CoV-2 eredményeket kaptuk a szennyvíz mintákból. Ekkorra körülbelül két hónapja folyt a rendszeres mintavétel, összesen 167 *Enterococcus* eredménnyel rendelkezünk a nyers szennyvizekből, ezek átlaga hozzávetőleg 10 000 MPN/ml értéknek adódott. A későbbiekben ehhez az értékhez normalizáltuk az eredményeket. Bár a későbbi minták *Enterococcus* eredményeinek átlaga ennél némileg magasabb értéket adott, az adatok összehasonlíthatósága miatt a normalizálási alapot nem tűnt célszerűnek a későbbiekben sem megváltoztatni. Az *Enterococcusra* történő normalizálás hatásait az eredményekre Miskolc esetében a 20. ábra mutatja be.



20. ábra: A miskolci szennyvíz SARS-CoV-2 eredményei 2020 július és 2021 október között 10 000 MPN/ml *Enterococcusra* normalizálva. 2021. 36. hete óta heti két minta érkezik a településről, ebben az esetben a heti eredménynél a két érték átlagát tüntettem fel. A negatív és elvi kimutatási határ (<1710 GC/L) eredmények esetében az elvi kimutatási határral számoltam, ebben az esetben az *Enterococcus* csíraszámot nem vettem figyelembe.

A két normalizálási módszert összehasonlítva látható, hogy ugyan mind az összesített vírusterhelés számítása, mind az *Enterococcusra* történő normalizálás csökkenti az egyes értékek kiugrását, ugyanakkor nem tünteti el. A várttól felfelé vagy lefelé eltérő eredményeket több faktor okozhatja. A laboratóriumi hibát viszonylag könnyű ellenőrizni megfelelő dokumentáció esetén, azonban így is előfordulhat, hogy felderítetlen marad. Ennél jóval kisebb rálátásunk van a mintavételi körülményekre, mivel azt külső szakemberek végezték.

A véletlenszerű ingadozások, vagy a mintavételből és a mérésből adódó hibák kiszűrése érdekében célszerű az eredmények esetében mozgóátlagot alkalmazni (21. ábra).



21. ábra: A Miskolcra beérkezett szennyvíz minták SARS-CoV-2 eredményei normalizálás nélkül, 3 pontos mozgóátlagot ($n-1 \dots n+1$) alkalmazva. Miskolcra az Európai Bizottság 2021-es ajánlása értelmében 2021. szeptember elejétől (36. hét) heti két minta érkezett vizsgálatra, ebben az esetben a heti eredménynél a két minta átlagát tüntettem fel. A negatív és elvi kimutatási határ (<1710 GC/L) eredmények esetében az elvi kimutatási határral számoltam.

A szakirodalomban számos normalizálási módszer használatára találni példát, azonban nem minden kutatócsoport használ normalizálást a szennyvíz minőségi változásainak követésére (Agrawal, Orschler, és Lackner 2021). Leginkább elfogadott fekáli indikátornak a szintén RNS vírus PMMoV (D’Aoust és mtsai. 2021; Peccia és mtsai. 2020) és CrAssphage (Medema, Heijnen, és mtsai. 2020) számít, ugyanakkor a szennyvíz mennyiségének (Westhaus és mtsai. 2021), valamint egyéb tulajdonságainak vizsgálata is előfordul, mint a vezetőképesség meghatározása. Hollandiában a vezetőképességgel történő normalizálást hasonlóan hatékonynak találták, mint a CrAssphage-el történőt (Langeveld és mtsai. 2021).

A további vizsgálatok során a vezetőképesség monitorozása megfontolandó, mivel egyszerűen kivitelezhető, gyors és olcsó vizsgálat. Emellett azonban fekáli indikátor mikroorganizmus vizsgálata továbbra is szükséges az esetleges mintavételi hibák kiszűrése érdekében. A jövőben megfontolandó valamelyik vírus indikátor használata, amely abból a szempontból is előnyös lehet, hogy ezzel a víruskoncentráció és a nukleinsav-kivonás lépései is jobban ellenőrizhetőkké válnának.

6.4.2 Összefüggés a klinikai adatokkal

A szennyvíz monitoring rendszer üzemeltetésének célja, hogy az eredmények segítségével előre becsülhető legyen a fertőzöttek számának alakulása, hogy az egészségügyi ellátórendszer időben felkészülhessen a megnövekedett terhelésre. A megfelelő normalizálási, illetve transzformálási módszer kiválasztásához, valamint az előrejelző képesség megállapításához szükség van az eredmények utólagos értékelésére.

Az új esetek számának megállapításához az OSZIR-ban rögzített SARS-CoV-2 megbetegedések fertőzés igazolásának dátumát vettem alapul. Az adatok közlésében itt is van valamennyi bizonytalanság, ugyanis nem teljesen egyértelmű, hogy a rögzítést végző orvos a COVID-19 gyanú felmerülésének dátumát, a mintavétel vagy az eredmény megérkezésének dátumát rögzíti a rendszerbe. Az aktív esetek szintén rögzítve vannak a rendszerben, a kijelentéseket végző háziorvosok leterheltsége miatt azonban ez az adat nem minden esetben bizonyul megbízhatónak. Emiatt az aktív esetek számát úgy becsültük, hogy a betegség lefolyását átlagosan 10 napnak véve, az előző 10 nap összes új esetét számítottuk aktív betegnek. Az egyes mintavételi helyekhez tartozó esetszámot a szennyvíztisztító telep teljes ellátási területe alapján, település alapon számoltuk (4. táblázat).

Problémát jelentett még, hogy a hét különböző napjain különböző mennyiségű tesztet végeztek, emiatt a napi esetszámok is jelentős ingadozást mutatnak. Ennek kiküszöbölésére 7 napos mozgóátlagot alkalmaztam; az adott mintavételi naphoz tartozó esetszámot úgy állapítottuk meg, hogy a mintavétel napján, valamint mintavétel előtt és után 3-3 nap átlagát vettük.

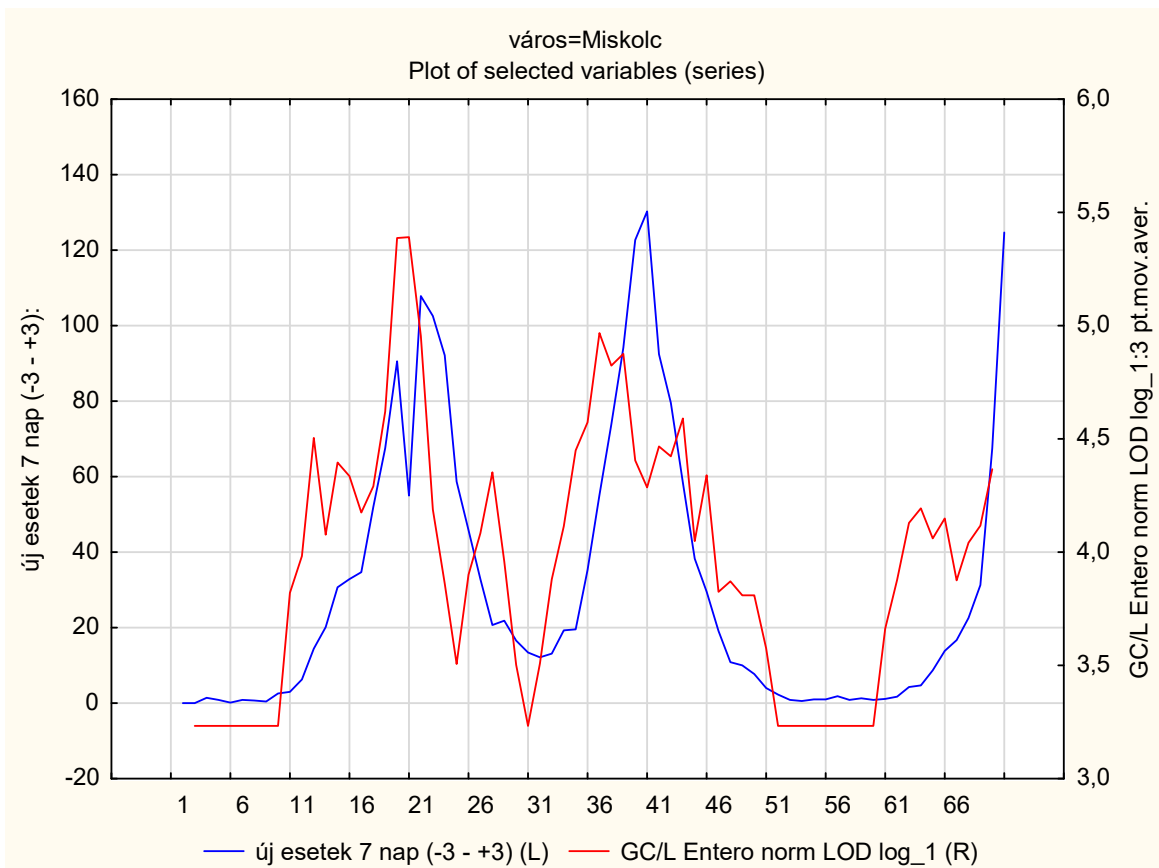
A megfelelő normalizálás, transzformáció és simítás kiválasztásához először lineáris regresszióval ellenőriztük, hogy melyik módszer mutatja a legjobb összefüggést a klinikai adatokkal (új és összes esetszám). A 6. táblázatban a Miskolcra vonatkozó eredmények láthatóak, a teljes adatsor a Függelékben található.

	r^2												
	GC/L, LOD		GC/L Entero norm LOD	vírusterhelés GC	GC/L, LOD log	GC/L Entero norm LOD log	vírusterhelés GC log	GC/L, LOD_simított	GC/L Entero norm LOD_simított	vírusterhelés GC_simított	GC/L, LOD log_simított	GC/L Entero norm LOD log_simított	vírusterhelés GC log_simított
Miskolc	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,19	0,19	0,04	0,27	0,28	0,26	0,33	0,33	0,08	0,43	0,46	0,42
	új eset +1 hét	0,22	0,24	0,04	0,35	0,39	0,35	0,38	0,42	0,07	0,52	0,58	0,52
	aktív eset/100.000 fő	0,20	0,20	0,04	0,25	0,25	0,24	0,35	0,32	0,08	0,39	0,39	0,37
	aktív eset +1 hét	0,23	0,23	0,04	0,32	0,34	0,32	0,41	0,42	0,07	0,50	0,53	0,49

6. táblázat: A szennyvíz eredmények különböző feldolgozással (normalizálás, logaritmizálás, 3 pontos simítás), valamint az azonos és következő heti (azonos módon számított) esetszám adatok összefüggése (lineáris regresszió). A pirossal jelölt számok esetében szignifikáns összefüggést találtam ($p < 0,05$), a színezés (sárgától zöldig növekvő tendencia) az r^2 értékek összehasonlítását segíti.

Miskolc, valamint a többi település esetében is a logaritmikusan transzformált, 3 pontra simított eredmények adták a legerősebb összefüggést a klinikai adatokkal. Mivel az egyes minták eredményeit az előtte és utána következő héten vett minták eredményeivel átlagoltuk, így nem keletkezett időbeli csúszás az adatsorban, ezért feltételezhető, hogy az így simított adatok legalább ugyanannyira használhatóak előrejelzésre, mintha nem alkalmaznánk simítást. A módszer hátránya ugyanakkor, hogy az utolsó adatpont esetében nem lehetséges a három pontos mozgóátlag alkalmazása, ebben az esetben vagy nem kalkulálunk az utolsó ponttal, vagy csak két pont eredményét vesszük figyelembe. Jelen dolgozatban az előző megoldást használtuk a kalkulációhoz. A különböző normalizálási módszerek (*Enterococcus* eredményre vagy térfogatra) nem térnek el egymástól jelentősen, azonban a mintavételi helyek többségénél az *Enterococcus*-ra normalizált adatok valamivel erősebb összefüggést mutatnak a klinikai adatokkal. Emiatt a továbbiakban az idősoros elemzést ezzel az adatsorral végeztük.

A szennyvíz eredmények előrejelző képességének megállapításához Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modellt alkalmaztuk (Almon 1965), mivel ez kiküszöböli az egymás utáni adatok korrelációjából adódó hibát (ld. Anyag és módszer fejezet Statisztikai értékelés). A modell lényege, hogy meghatározható egységnyi késleltetésig vizsgálja, hogy az egyes késleltetések milyen súllyal befolyásolják két érték összefüggését. Az új esetek és a szennyvíz adatok városenkénti vizsgálatához kéthetes eltolásig vizsgáltuk az adatok összefüggését. Mivel a modell nem teszi lehetővé, hogy az adatsor közben változtassuk a mintavételi gyakoriságot, ezért minden város esetében csak heti egy mintát vettük figyelembe. Azon városok esetében, ahonnan 2021 októberétől heti két minta érkezett, az egyik mintát (ha korábban a hét első felében érkezett, a csütörtökön érkezőt, ha a hét második felében, akkor a kedden érkezőt) figyelmen kívül hagytuk. Az eredményeket Miskolc esetében a 22. ábra és az 7. táblázat mutatja be, a többi eredmény a Függelékben található.



22. ábra: A miskolci szennyvíztisztító SARS-CoV-2 eredményei (Enterococcusra normalizált, log-transzformált, 3 pontra simított eredmények) és a szennyvíztelep ellátási területén kimutatott új COVID-19 megbetegedések (7 napos mozgóátlag a mintavétel napján)

város=Miskolc Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7576 R-square= ,5740 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	-13,5175764737	8,510726696537	-1,58829873825	0,117225354860
1	2,8970301098	0,315266929786	9,18913414676	0,000000000000
2	19,3116366934	8,551488454570	2,25827781865	0,027400491443

7. táblázat: Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Miskolc esetében

Az eredmények alapján Miskolcon, valamint valamennyi vizsgált mintavételi hely esetében a szennyvíz adatok egy hetes eltolással mutatják a legerősebb összefüggést az új esetszámokkal (a p érték 1 lag eltéréssel a legalacsonyabb). Az új eseteket és a simított szennyvíz eredményeket bemutató grafikonok ezt a legtöbb esetben jól mutatják, azonban bizonyos városok esetében eltérések is előfordultak, valamint az egyes járványhullámok során sem volt egységes a lefutás. Az eltérések okait először az egyes városok esetében próbáltuk meg

felderíteni. A 8. táblázat a két adatsor illeszkedését jellemző r^2 értékeket és a mintavételi hely jellemzőit összegzi.

	ellátott lakosság (fő)	átlagos térfogat (m ³)	mintavétel típusa	köv. hét r^2
Békéscsaba	59 542	10 651	pontminta	0,72
Budapest D	303 925	58 128	pontminta	0,67
Budapest É	668 330	143 533	pontminta	0,55
Budapest KP	912 698	241 813	24 órás átlagminta	0,75
Debrecen	214 426	43 413	pontminta	0,45
Eger	60 741	10 623	pontminta	0,74
Győr	146 559	26 982	pontminta	0,67
Kaposvár	75 343	10 772	24 órás átlagminta	0,64
Kecskemét	128 266	20 707	pontminta	0,62
Miskolc	191 352	37 605	24 órás átlagminta	0,58
Nyíregyháza	128 062	12 781	4 órás átlagminta	0,65
Pécs	156 107	23 488	pontminta	0,42
Salgótarján	41 656	5 410	pontminta	0,74
Szeged	172 171	44 707	pontminta	0,72
Székesfehérvár	113 601	26 010	24 órás átlagminta	0,70
Szekszárd	32 488	6 677	pontminta	0,59
Szolnok	109 838	17 019	pontminta	0,47
Szombathely	115 112	22 156	24 órás átlagminta	0,69
Tatabánya	81 332	12 624	pontminta	0,58
Veszprém	62 238	13 890	pontminta	0,70
Zalaegerszeg	82 414	12 286	pontminta	0,75

8. táblázat: Az egyes mintavételi helyek főbb jellemzőinek összehasonlítása, valamint a szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények (Enterococcusra normalizált, 3 pontos simítással) és a szennyvíztelep ellátási területén előforduló új COVID-19 esetek összefüggése a mintavételt követő héten (lineáris regresszió)

A szennyvíztelepekre beérkező szennyvíz mennyisége és minősége is jellemző ingadozást mutat a nap folyamán. Az ebből eredő eltérések legjobban 24 órás automata átlag mintavevő alkalmazásával küszöbölhetőek ki (EU 2021), az adatgyűjtés idején azonban ilyen berendezések még nem álltak rendelkezésre a mintavételi helyek többségénél. Az összefüggések vizsgálatakor azonban azt látjuk, hogy ugyan mindegyik automata mintavevővel rendelkező szennyvíztelep eredménye viszonylag megbízható, azonban az automata mintavevővel nem rendelkező telepek esetében is találhatunk olyanokat, melyek ugyanennyire, vagy jobban jelzik előre a COVID-19 esetszám alakulását. Li és mtsai. (2021) pontminták vizsgálata esetében azt találták, hogy a mintavétel pontos ideje meghatározó az eredmény megbízhatósága szempontjából. Elképzelhető, hogy azokon a településeken, ahol

pontmintavételt alkalmaznak, az eltérés a mintavétel pontos idejében (vagy ennek állandóságában) keresendő. A beküldött mintavételi jegyzőkönyvek egy részén ugyan feltüntetik a mintavétel pontos idejét, ez azonban nem minden esetben megbízható. Az automata mintavevő berendezés használatának fontosságában minden tanulmány egyetért, emiatt a jövőben fontos fejlesztési terület az automata mintavevő berendezések beszerzése azon telepek részére is, amelyek egyelőre nem rendelkeznek ilyen eszközzel.

Az eredmények megbízhatóságát a mintavételi gyakoriság is befolyásolhatja. Az Európai Unió heti két mintavételt javasol, amelyet heti egyre lehet csökkenteni, ha feltételezhetően nem fordulnak elő COVID-19 megbetegedések a területen (Európai Bizottság 2021). Más tanulmányok eredményei alapján szintén heti kettő vagy három mintavétel javasolt, ennél gyakoribb mintavétel azonban már nem növeli az eredmények megbízhatóságát (Bertels és mtsai. 2022). A hazai viszonyok esetében a minták beszállításának logisztikája jelentős kihívást jelentett, így a vizsgált időszak nagy részében heti mintavétel történt, gyakoribb mintavétel esetében is csak heti egy minta eredményét vettük számításba. A hazai adatok esetében a heti egy, illetve két minta előrejelző képességének eltérését a rövid időszak miatt még nem elemeztük.

A szennyvíz alapú epidemiológia módszerét ugyan nagyon kis populációméret esetében is használják (pl. repülőgépek, kórházak vagy egyetemi kampuszok szennyvize esetében), ugyanakkor ezek a vizsgálatok elsősorban a vizsgált populáció COVID-19 mentességének megerősítésére szolgálnak, vagy alacsony átfertőzöttség esetén a járvány (újbóli) fellobbanását jelezhetik (Li és mtsai. 2021; WHO 2022). Megbízható mennyiségi eredmény azonban csak nagyobb lakosság szám esetében várható, a hazai vizsgálatok emiatt is a megyeszékhelyekre terjednek ki. A tanulmányok többsége nagyobb populációmérettel rendelkező települések esetében magasabb kópiaszámot tapasztalt, bár ez a nagyobb településeken jelentkező egyébként is magasabb fertőzött aránnyal is magyarázható lehet (Bertels és mtsai. 2022).

A vizsgálat tervezésekor tehát azt feltételeztük, hogy a nagyobb városok eredményei megbízhatóbban fogják jelezni az esetszámot, mivel nagyobb populáció, több fertőzött és nagyobb napi szennyvíz térfogat esetében az egyéni eltérések, valamint a mintavételből és a mérési bizonytalanságból adódó esetleges hibák jobban kiátlagolódnak. Ezzel szemben azt találtuk, hogy az egyes mintavételi helyeken jellemző összefüggés teljesen független a szennyvíztelep által ellátott lakosság számától: míg a legnagyobb települések között is találunk igen megbízhatatlan eredményeket mutatókat (Debrecen, Pécs), addig a kisebb megyeszékhelyek esetében is tapasztaltunk nagyon jó összefüggéseket (Békéscsaba, Eger,

Salgótarján). Feltételezhető, hogy a nem várt eltérést egyéb faktorokban jelentkező különbségek okozzák.

A visszanyert SARS-CoV-2 kópiaszámot befolyásolhatja a szennyvízben található ülepedő anyagok mennyisége (Bertels és mtsai. 2022; Li és mtsai. 2021), mivel a vírus az üledékhez kötötten is előfordul, ahogy azt saját vizsgálataink is kimutatták (üledékből történő visszanyerés 5.2.2.5. fejezet). A standard módszer esetében ezt az üledéket eltávolítottuk, így az itt megtalálható vírusgenomok nem számítódnak bele a végső kópiaszámba. A vizsgálatok során látható ugyan, hogy az egyes mintavételi helyekről származó minták esetében eltérő mennyiségű üledék jellemző, pontos mennyiségi meghatározás azonban nem történik ezzel kapcsolatban.

A szennyvíz minősége, különösen csapadékvizet is befogadó rendszerek esetében, jelentős változásokat mutathat. Különböző kutatócsoportok számos módszert alkalmaznak a szennyvíz minőségi változásainak kiszűrésére. A térfogattal történő normalizálás (napi összes vírusterhelés, meghatározott populációra vonatkoztatott összes vírusterhelés meghatározása) egyszerű, kiegészítő mérést nem igénylő módszer a csapadékkal történő hígulás hatásának kiküszöbölésére. Az így történő normalizálás növelheti az eredmények megbízhatóságát, figyelembe kell azonban venni, hogy csapadékos napokon a szennyvíz tartózkodási ideje kisebb a hálózaton, ami a vírus genomjának kisebb mértékű degradációjával jár (Bertels és mtsai. 2022). Vizsgálataink során a szennyvíz napi mennyiségével történő normalizálás még az automata mintavevővel rendelkező települések esetén sem javította érdemben az eredmények megbízhatóságát (ld. Függelék).

A leginkább elfogadottnak számító normalizálási módszer a fekál indikátor RNS vírusokra (PMMoV, CrAssphage) történő normalizálás (Li és mtsai. 2021). Vizsgálataink során bakteriális fekál indikátort (fekális *Enterococcus*) használtunk, mivel ez a módszer is alkalmas a szennyvíz fekália tartalmának nyomon követésére, ugyanakkor a degradációja eltérhet az RNS vírusokétól. Az eredmények azt mutatják, hogy az *Enterococcus* számra történő normalizálás is képes valamelyest növelni az előrejelző képesség megbízhatóságát. Ennek ellenére a nagyobb elfogadottság és a minden bizonnyal nagyobb megbízhatóság miatt a PMMoV vizsgálatok, valamint az ezzel történő normalizálás bevezetése a rövid távú fejlesztési célok között szerepel.

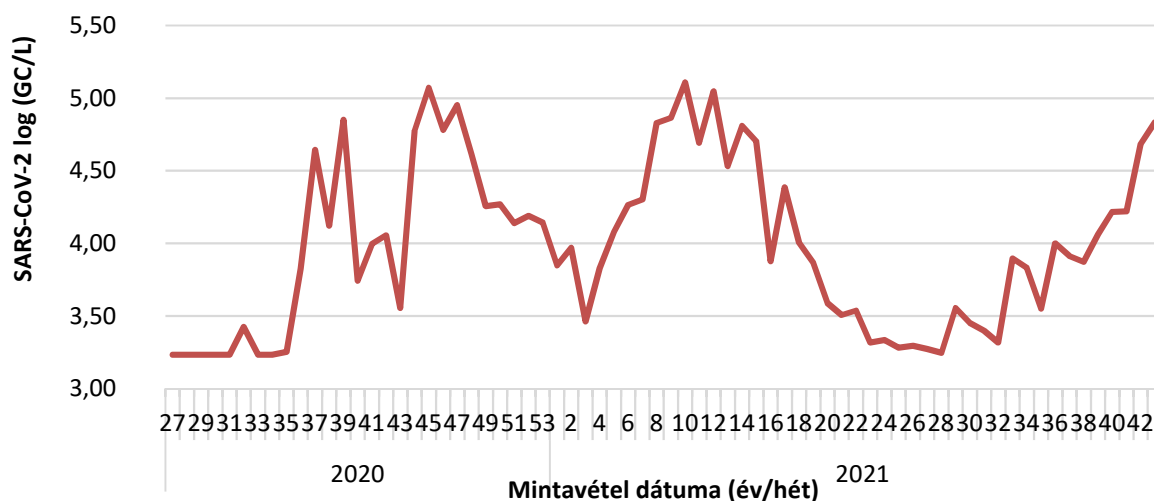
Az előrejelző képesség a különböző hullámok esetében is eltérhet, ennek okait később igyekszünk tisztázni.

6.4.3 Az országos átlag előrejelző képessége

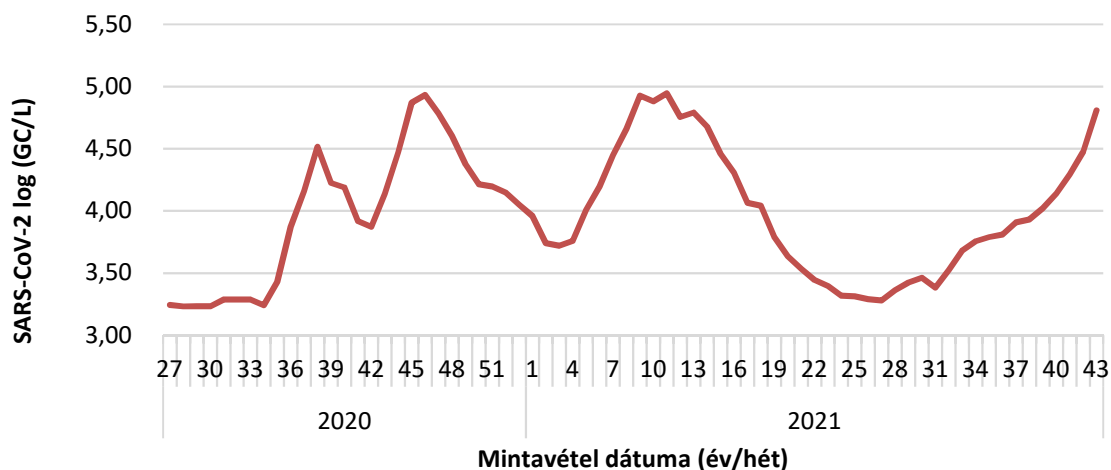
Az egyes városok eredményeinek nyomon követése mellett szükséges volt az országos trendek világos átlátása is. Az országos átlag számítása olyan előnnyel is jár, hogy az egyes városokban megfigyelt, véletlenszerűnek tűnő ingadozások ezzel a módszerrel elsimíthatóak.

Az országos átlag számításához az egyes minták 10 000 MPN/ml *Enterococcusra* normalizált SARS-CoV-2 eredményeinek 10-es alapú logaritmusát vettük, majd ezeket az eredményeket az egyes szennyvíztisztítók által ellátott lakosságsszámmal súlyoztuk. Negatív eredmények esetében a SARS-CoV-2 elvi alsó kimutatási határát (1710 GC/L) használtuk a számításhoz, ebben az esetben normalizálást nem alkalmaztuk. Az RT-qPCR reakció bizonytalanságai miatt az elméleti kimutatási határnál alacsonyabb számszerű eredmények is előfordulnak, ebben az esetben is az alsó kimutatási határral számoltuk.

2021 októberétől a legnagyobb településekről heti két minta érkezett, ebben az esetben a minták eredményeinek átlagát vettük figyelembe. Ugyan az országos átlag számítása már önmagában csökkenti a véletlenszerű hibák hatását, az egyes mintavételi helyek eredményeinek simítása (3 pontos mozgóátlag alkalmazása) tovább csökkenti az ingadozást. Az országos átlag alakulását az egyes számítási módszerek alkalmazásával a 23-24. ábrák szemléltetik.

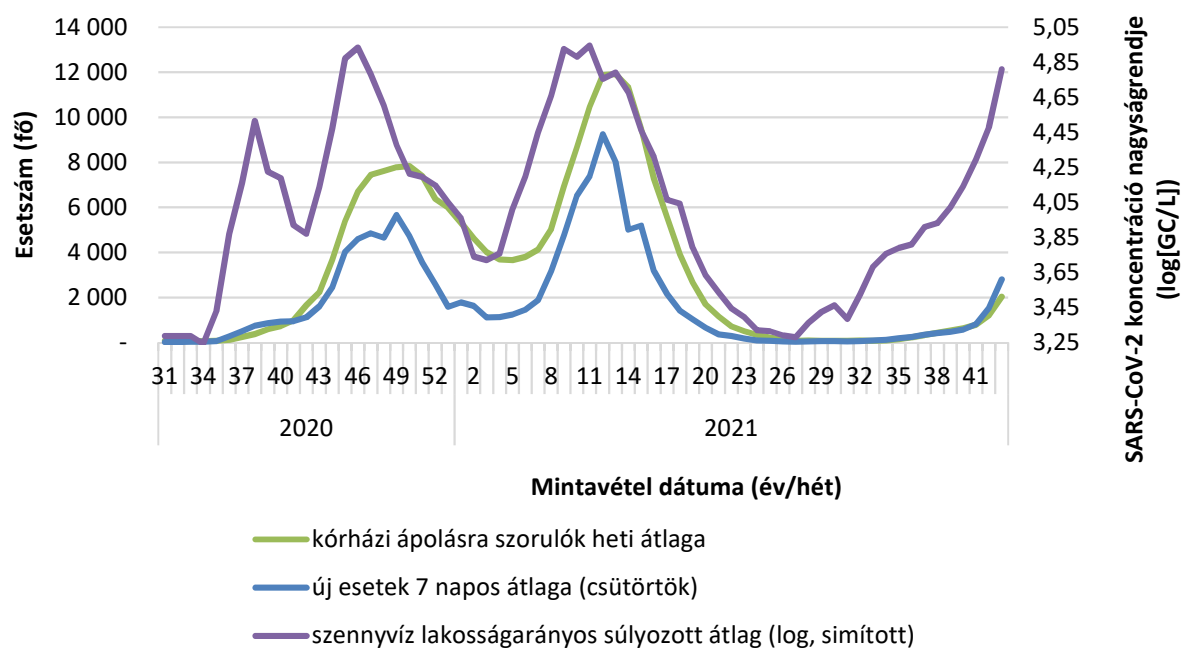


23. ábra: *Enterococcusra* normalizált SARS-CoV-2 eredmények országos, lakosságarányosan súlyozott átlagának alakulása a vizsgált periódusban (2020. 07. 01 – 2021. 10. 31.)



24. ábra: városenként 3 pontra simított, *Enterococcusra* normalizált SARS-CoV-2 eredmények országos, lakosságárányosan súlyozott átlagának alakulása a vizsgált periódusban (2020. 07. 01 – 2021. 10. 31.)

Az adatelemzésnél a szennyvíz eredményeket heti szinten összesítettük. Az új esetszám elemzésekor problémaként jelentkezett, hogy a hét különböző napjain különböző mennyiségű klinikai vizsgálat készült, így legcélszerűbb a 7 napos mozgóátlag alkalmazása volt. Mivel a heti szennyvíz mintákat hétfő és csütörtök között vették, az új esetszámokat is hasonló időintervallumban (előző hét péntektől adott hét csütörtökig) átlagoltuk. A kórházi esetek tekintetében kisebb felbontásban, és csak országos szinten álltak rendelkezésre az adatok az elemzés készítésekor, ezért ebben az esetben a kórházi adatokat az adott naptári hétre (hétfőtől vasárnapig) átlagoltuk (25. ábra).



25. ábra: Szennyvíz eredmények lakosságárányos 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

A 25. ábrán látható, hogy a szennyvíz eredmények trendjét jól követi mind az új esetek száma, mind a kórházi kezelésre szorulóknak száma. A késleltetési idő meghatározására az előző fejezetben ismertetett Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modellt alkalmaztuk. Az eredményeket a 9-10. táblázatok foglalják össze.

All Groups Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságarányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: új esetek 7 napos átlaga (csütörtök) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7364 R-square= ,5422 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	-756,508350966	685,1699450074	-1,10411782723	0,273878450440
1	164,435817255	19,1883619415	8,56955991118	0,000000000005
2	1085,379985476	690,7809779418	1,57123606488	0,121300868803

9. táblázat: Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az országos átlag és az országos új esetszám esetében

All Groups Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságarányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: kórházi ápolásra szorulóknak heti átlaga Lag: 4 Polyn. order: 1 R= ,7733 R-square= ,5980 N: 62				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(57)	p
0	-677,646094772	521,7850429412	-1,29870739673	0,199273901195
1	-252,901112726	259,9855885655	-0,97275050560	0,334787400156
2	171,843869319	18,1926877853	9,44576586745	0,000000000000
3	596,588851365	265,4713429327	2,24728155127	0,028509667593
4	1021,333833410	527,2804627053	1,93698402586	0,057709146770

10. táblázat: Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az országos átlag és a kórházi kezelésre szorulóknak országos száma esetében

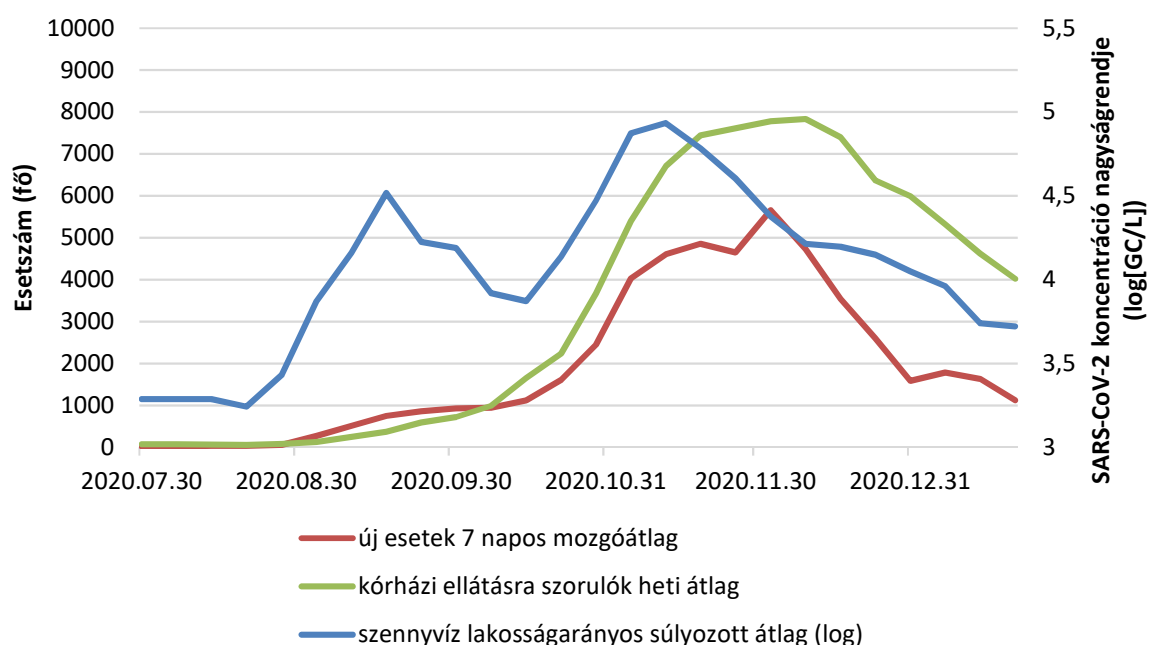
A számítások alapján az új esetszámmal országos szinten legszorosabban 1 hetes eltolással, míg a kórházi kezelésre szorulóknak számával legszorosabban 2 hetes eltolással függnek össze a szennyvíz adatok.

A világ számos országában végeznek hasonló szennyvíz vizsgálatokat a COVID-19 járvány követésére és előrejelzésére („COVIDPoops19 Dashboard” 2022). Az egyes országokban meghatározott előrejelző képesség nagyon változó, néhány naptól akár két hétig terjed az új esetszám tekintetében (D’Aoust és mtsai. 2021; Krivoňáková és mtsai. 2021; Agrawal, Orschler, és Lackner 2021). Az előrejelző képességet a betegség lappangási ideje mellett leginkább az egészségügyi ellátórendszer teljesítménye (a tesztek elérhetősége, várakozási idő a mintavételre, vizsgálatok elkészüléséhez szükséges idő) befolyásolja. A felsorolt tényezők időben is nagy változásokon mentek keresztül, így a továbbiakban ezen változások hatásait foglaljuk össze.

6.4.4 Előrejelzés hatékonysága az egyes járványhullámokban

A városenkénti, valamint az országos adatok elemzése során is feltűnő, hogy az egyes járványhullámokban eltérően követik egymást nem csak a szennyvíz- és klinikai adatok, de az új és a kórházi esetszám is. Az alábbiakban az országos szennyvíz adatsort (*Enterococcus*-ra normalizált, 3 pontra simított értékek) hasonlítottuk össze a klinikai adatokkal a COVID-19 hazai 2-4. hullámában (a számított értékek a Függelékben találhatóak). Az egyes hullámok elkülönítéséhez elsősorban a szennyvíz adatokat vettük figyelembe, az újabb hullámok kezdetének azt a hetet jelöltük ki, amikor először elkezdtek emelkedni a szennyvíz SARS-CoV-2 koncentrációk országos átlagban.

Második hullámként a 2020. augusztus eleje és 2021. 3. hete (január közepe) közötti időszakot ábrázoltuk (26. ábra).



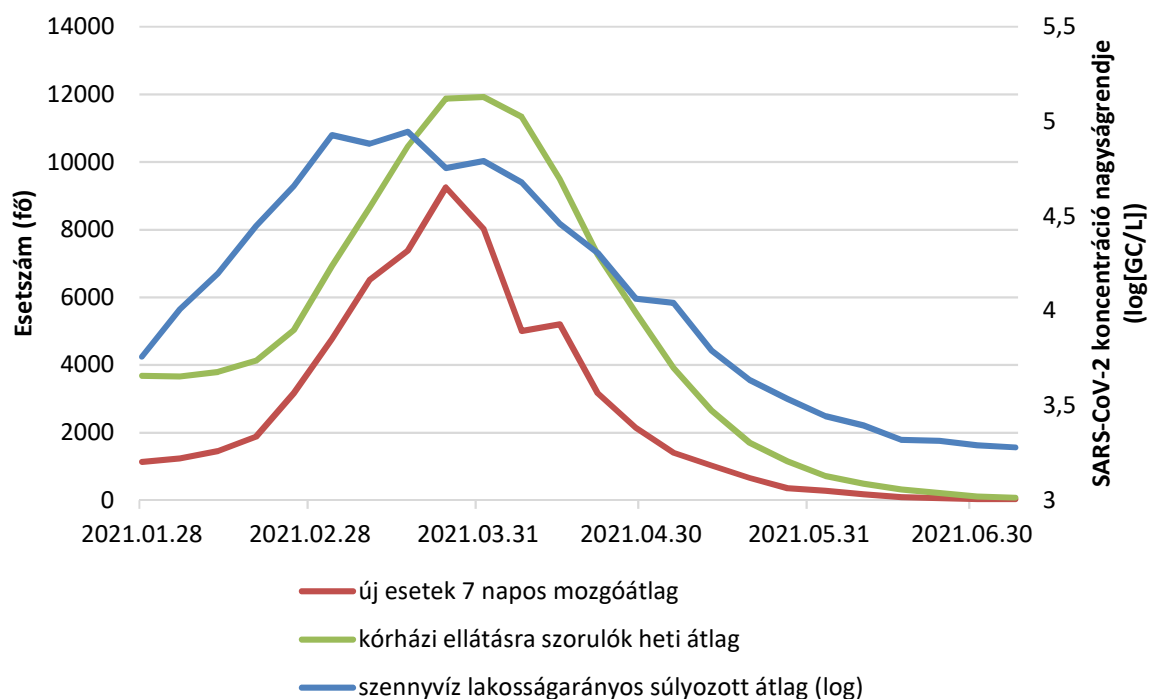
26. ábra: Szennyvíz eredmények lakosságarányos súlyozott átlaga (*Enterococcus*-ra normalizálva, 3 pontos simítást alkalmazva), valamint az új és kórházi kezelést igénylő COVID-19 esetszám alakulása a második járványhullám alatt.

A vizsgálatok során az első egyértelműen pozitív eredményeket 2020. augusztus első felében kaptuk, ezt 2020. szeptemberben trendszerű emelkedés követte. A COVID-19 esetszám ugyanebben az időben augusztus végén – szeptember elején indult hirtelen növekedésnek, az ellátórendszer azonban nehezen bírta a hirtelen fellépő vizsgálatok számának emelkedését. A második hullám folyamán végig jellemző volt, hogy az orr-garat mintavételre és a PCR eredményekre akár egy hétnél többet is várni kellett. Emellett elsősorban a nyár végén feltételezhetően magas volt a tünetmentes vagy enyhe tünettől orvoshoz nem fordulók aránya, mivel ebben az

időszakban a fertőzöttek átlagos életkora alacsony volt. A tünetmentes fertőzöttek vírusürítése a humán statisztikában nem jelent meg, a szennyvíz eredményekben viszont igen.

A szennyvíz adatokban 2020. szeptember második fele és október eleje között egy egyértelműen csökkenő trend volt megfigyelhető. A csökkenő koncentrációk váratlanok voltak ebben az időszakban, ezért felmerült a laboratóriumi hiba lehetősége is, emiatt számos minta mérését megismételtük ebből az időszakból. Az azonos időben végzett ismétlő vizsgálatok azonban megerősítették a koncentrációk átmeneti visszaesését. Ebben az időszakban az új esetszámokat tekintve csökkenő tendencia nem volt megfigyelhető, azonban a naponta diagnosztizált fertőzöttszám nem nőtt tovább. Az adatok alapján elképzelhetőnek tűnik, hogy a fertőzöttek számában szeptember elején jelentkező ugrást az ellátórendszer nem tudta követni, a klinikai adatokban ezért nem rajzolódik ki ez az időszak külön hullámként.

A szennyvíz eredményekben legközelebb 2021 4. hetében jelentkezett emelkedés, így a járvány harmadik hullámaként a 2021. január vége – 2021. július eleje (27. hét) közötti időszakot tekintettük (27. ábra)



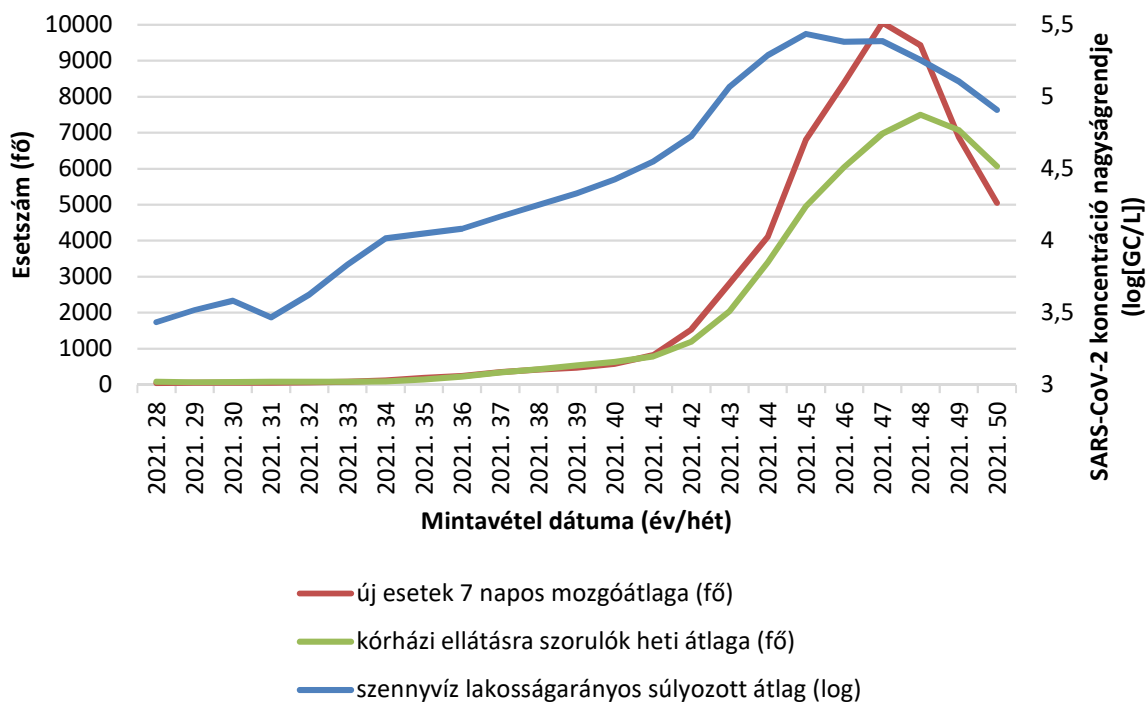
27. ábra: Szennyvíz eredmények lakosságárányos súlyozott átlaga (*Enterococcusra* normalizálva, 3 pontos simítást alkalmazva), valamint az új és kórházi kezelést igénylő COVID-19 esetszám alakulása a harmadik járványhullám alatt.

A harmadik járványhullám alatt a szennyvíz eredmények és a klinikai adatok lefutása nagyon hasonló volt. 2021 első felére a COVID-19 diagnosztika sokat fejlődött: ebben az időszakban a vizsgálatok nagy részét olcsóbb, kevésbé érzékeny, de hasonlóan megbízható gyorsesztekkel végezték. Ennek következtében több vizsgálat elvégzésére volt kapacitása az egészségügyi ellátórendszernek. A SARS-CoV-2 ebben az időszakban dominánsá váló alfa

variánsa a légutakban nagyobb kópiaszámban van jelen (Davies, Abbott, és mtsai. 2021), így a kevésbé érzékeny tesztek is könnyebben kimutatják. Emellett súlyosabb tüneteket is okoz (Davies, CMMID COVID-19 Working Group, és mtsai. 2021), így alacsonyabb lehetett a tünetmentes megbetegedések aránya. Ezek az eltérések magyarázhatják azt is, hogy míg a szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények a második és harmadik hullámban nem tértek el jelentősen, addig a klinikai eseteket tekintve harmadik hullám jelentősen nagyobb esetszámokkal jelentkezett.

2021 első felére elérhetővé váltak a laboratóriumi háttér nélkül, néhány perc alatt elvégezhető gyors tesztek is, ezek bevezetése a diagnosztikai gyakorlatban csökkenthette a megbetegedés kezdete és a fertőzés igazolása között eltelt időt. Ez a szennyvíz adatok előrejelző képességének rövidülését eredményezhetné, az előrejelző képesség azonban ebben az időszakban is megmaradt, sőt növekedett: az új esetek számának változása 2-3 hét késéssel jelent meg a szennyvíz adatokhoz képest, az emelkedés kezdete egy, míg a tetőzése két héttel követte a szennyvíz adatok változását. A korábbiaknál pontosabb diagnosztika, illetve a feltehetően kevesebb tünetmentes fertőzött miatt valószínűleg ebben a járványhullámban mutatkozott meg legpontosabban a szennyvíz- és a klinikai adatok közötti összefüggés.

A harmadik hullám lecsengése után 2021 nyarán a szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények alacsony értékeket mutattak, azonban az előző nyárral ellentétben, ebben az időszakban minden héten előfordult legalább néhány alsó méréshatár feletti eredmény. A koncentrációk ismételt emelkedését 2021. július második felétől tapasztaltuk, azonban az emelkedés nyáron és kora ősszel lassú és nem egyenletes volt (28. ábra). A szennyvíz eredmények a 45. héten érték el a legmagasabb értékeket, míg az új esetek száma a 47. héten, míg a kórházi fertőzések száma a 48. héten tetőzött.



28. ábra: Szennyvíz eredmények lakosságarányos súlyozott átlaga (*Enterococcusra* normalizálva, 3 pontos simítást alkalmazva), valamint az új és kórházi kezelést igénylő COVID-19 esetszám alakulása a negyedik járványhullám 2021. december közepéig tartó szakaszában.

A 4. hullám esetében a korábbi változatoknál is fertőzőképesebb (Mlcochova és mtsai. 2021; Puhach és mtsai. 2022) delta variáns okozta a fertőzések nagy részét (ECDC 2021). Emiatt azonos fertőzöttség mellett is magasabb kópiaszámot tapasztalhattunk a szennyvízben, mint a korábbi hullámok esetében. Emellett egy ezzel ellentétes hatás is jelentkezett: 2021 nyarára a hazai lakosság hozzávetőlegesen 60%-a COVID-19 elleni immunizációban részesült. Az oltás hazai adatok alapján a vakcina típusától és az oltott személy életkorától függően 68,7 – 88,7%-os védelmet ad a fertőzés ellen (Vokó és mtsai. 2021). Az oltás a tünetmentes fertőzés ellen is véd (Hall és mtsai. 2021; Angel és mtsai. 2021), azonban az enyhébb tünetek miatt az oltás ellenére fellépő esetleges enyhe fertőződés nagyobb eséllyel marad felderítetlen. Utóbbi szintén pozitív eltérést okoz a szennyvíz adatokban a klinikai esetszámokhoz képest.

Az egyes járványhullámok adatainak összehasonlítása során látható, hogy a szennyvíz minták azonos SARS-CoV-2 koncentrációihoz jelentősen eltérő napi új esetszám és kórházi kezelésre szoruló fertőzöttség társulhat. A klinikai adatokat számos tényező befolyásolja: míg a diagnosztikai kapacitások emelkedése és a betegség súlyosabb lefolyása a naponta diagnosztizált fertőzöttek számát növeli, addig a populáció magas szintű immunizációja, a fiatal életkor miatti enyhébb tünetek, de akár az enyhébb időjárás is csökkentheti a diagnosztizált fertőzöttek számát. A kórházban kezelték száma kevésbé függ a vizsgálati kapacitásoktól, azonban a fertőzöttek átlagos életkora, a keringő vírusvariánsok tulajdonságai, valamint az

átoltottság ezt az értéket is jelentősen képes módosítani. A COVID-19 fertőzöttség szám szennyvíz adatok alapján történő megállapítására történtek ugyan erőfeszítések (McMahan és mtsai. 2021), azonban itt a szennyvíz adatokon kívül további változókat is figyelembe vettek (érzékenyek, fertőzöttek és gyógyultak aránya), valamint a vizsgálatokat 2020 néhány nyári hónapjára vonatkozóan végezték. Ebben az időszakban még sem az új variánsok, sem az oltások hatása nem jelentkezett.

Míg bizonyos területeken azt figyelték meg, hogy a szennyvíz eredmények és az esetszámok közti összefüggés ugyan szignifikáns maradt, a szennyvíz eredmények előrejelző képessége ugyanakkor csökkent vagy eltűnt, míg más országokban nem változott az előrejelző képesség (International Water Association, 2022). A hazai adatok alapján az előrejelző képesség trendszerűen nem változott a vizsgált időszakban: a két vizsgált őszi hullám (második és negyedik) lefutása nagy hasonlóságot mutat, míg a tavaszi (harmadik) ettől némileg eltér, a szennyvíz eredményeket azonban minden hullám esetében 1-2 héttel követik a klinikai esetek.

A továbbiakban megvizsgáltuk azt is, hogy az egyes városok szennyvizében tapasztalt SARS-CoV-2 koncentráció különbségek együtt jártak-e a fertőzöttek számának változásával. A statisztikai értékelést az egyes járványhullámok felszálló szakaszában és tetőzésekor egy-egy hétre végeztük el (11. táblázat).

r^2	késleltetés	log Entero. norm. 3 hetes simítással
2020. 39. hét, 2. hullám felszálló	0	0,10
	+1 hét	0,13
2020. 45. hét, 2. hullám tetőzés	0	0,01
	+1 hét	0,00
2021. 6. hét, 3. hullám felszálló	0	0,23
	+1 hét	0,11
2021. 10. hét, 3. hullám tetőzés	0	0,43
	+1 hét	0,41
2021. 40. hét, 4. hullám felszálló	0	0,02
	+1 hét	0,06

11. táblázat: a szennyvíz SARS-CoV-2 koncentrációja (*Enterococcus* normalizált, logaritmizált, 3 pontra simított adatok városonként) és a szennyvíztelep ellátási területén jelentkező új esetek (100 000 főre vetítve), valamint a következő heti új esetek korrelációja (Pearson-féle korreláció). A pirossal kiemelt eredmények szignifikánsak ($p < 0,05$)

A keresztmetszeti vizsgálat során az új esetek száma és a szennyvízben mért SARS-CoV-2 koncentrációk között nem találtam szoros összefüggést. Számottevő szignifikáns korreláció mindössze a 3. hullám tetőpontján figyelhető meg. A jelenségnek több magyarázata is lehet. A kevésbé megbízható eredményeket mutató városok (pl. Debrecen, Pécs) eredményei ronthatják

az összefüggést. Az egyes városok szennyvíz eredményei között gyakran kis eltérések mutatkoznak azonos időpontban, így a mérési bizonytalanság ebben az esetben jelentősen befolyásolhatja az eredményeket. A klinikai eredmények bizonytalansága szintén számot tevő lehet, az egyes területeken jellemző tesztelési gyakorlat jelentősen eltérhet. További magyarázat lehet, hogy az országon belül a fertőzöttek számában területenként nem figyelhetőek meg nagyon jelentős eltérések, a kisebb eltérések pedig nem haladják meg a szennyvízvizsgálatok mérési bizonytalanságát.

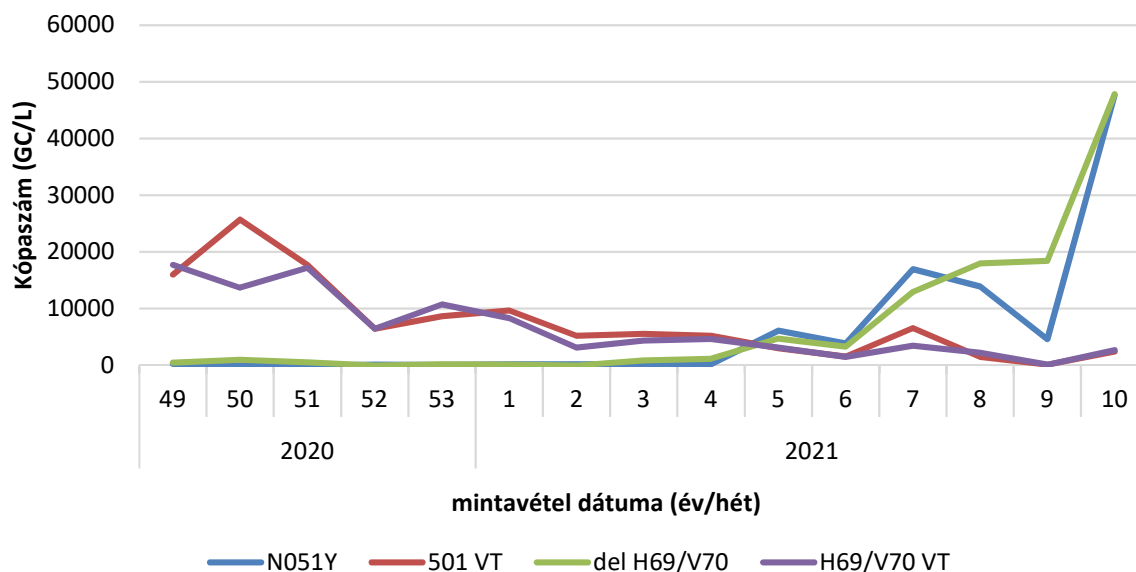
A szennyvíz eredmények előrejelző képességét az időbeli változások nyomon követése mellett a térbeli eltérések vizsgálatára is használják (WHO 2022). Ezekben az esetekben azonban a hazai rendszernél magasabb (heti 3) mintavételi gyakoriságot, valamint minden mintavételi hely esetében automata átlag mintavételt alkalmaztak. Az eredmények alapján a fertőzöttebbnek bizonyuló területek esetében emelték a klinikai tesztek számát, így lehetővé téve a fertőzöttek azonosítását és elkülönítését (Johnson és mtsai. 2021).

6.5 SARS-CoV-2 mutációs vizsgálatok eredményei

A SARS-CoV-2 szennyvízben mért mennyiségén túl a járvány fontos tényezője az is, hogy milyen vírusvariánsok fordulnak elő, illetve jelennek meg a vizsgált lakosság körében. Részletes vizsgálatokat az alfa variáns esetében végeztünk. Az alfa variánsra jellemző N50Y és del H69/V70 mutációk kimutatását összesen 212 szennyvíz minta esetében végeztük el, Budapest esetében 2020. december 1-jétől (49. hét), míg a többi vizsgált város esetében 2021. január 15-étől (3. hét) egységesen 2021. március 15-éig (15. hét) vett minták esetében. Azért ezt az időszakot választottuk, mert az első igazolt alfa variáns kimutatása hazánkban 2021. 01. 13-án történt, de feltételezhető volt, hogy a mutáció már korábban is megjelenhetett. Budapesten a magas lakosságszám és a járványhelyzet ellenére is kimagasló nemzetközi forgalom miatt feltételezhető volt, hogy az új variáns előbb jelenhetett meg a fővárosban az országos átlagnál. Március közepére a klinikai adatok alapján már csaknem kizárólagosan ez a variáns fordult elő, így ezt tűnt célszerűnek záró dátumnak választani. A vizsgálatok elvégzésére utólag, 2021 májusában volt lehetőség, azonban így is hasznos információt szolgáltatott az új variáns térbeli és időbeli elterjedéséről, valamint az így nyert tapasztalatokat a későbbi variánsok nyomon követése esetében is felhasználhattuk.

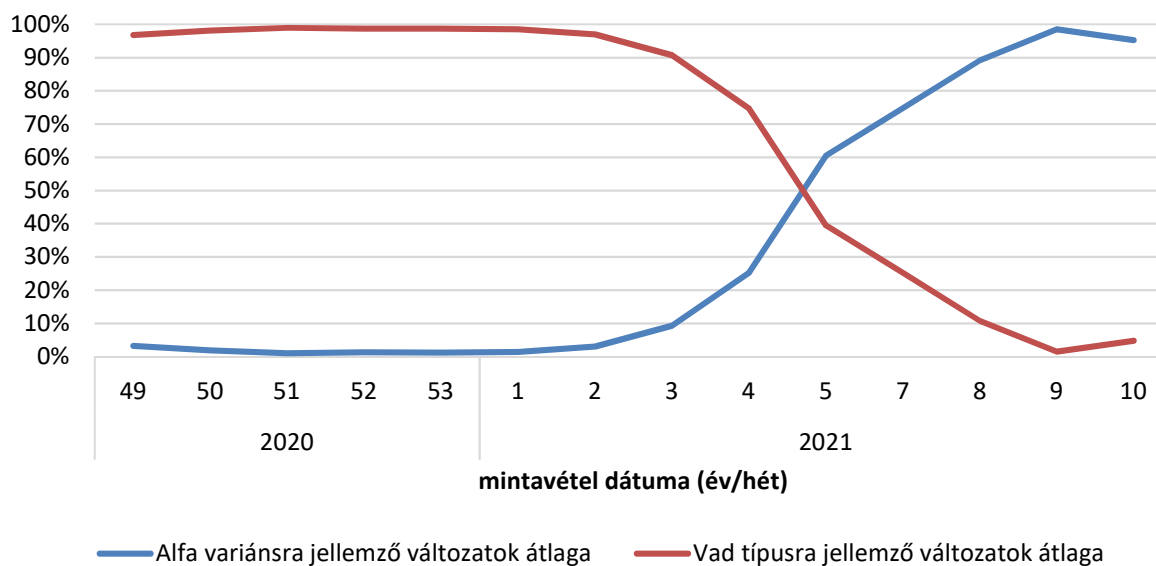
A budapesti minták esetében december elején még a vad típusra jellemző változatok magas koncentrációját láthatjuk, majd a koncentrációk csökkenésnek indultak a harmadik hullám lecsengésével összhangban (29. ábra). Elszórtan és alacsony koncentrációban, de néhány mintában már 2020 decemberében kimutathatóak voltak az alfa variánsra jellemző mutációk is.

Ezek a változatok azonban más leszármazási vonalakban is jelen lehetnek, így az eredmények még nem bizonyítják egyértelműen az alfa variáns jelenlétét ebben az időszakban.



29. ábra: A SARS-CoV-2 Alfa variánsára jellemző N501Y és del H69/V70 mutációk, valamint ezek vad típusú változatai koncentrációjának változása 2020. december 1. és 2021. március 15-én Budapesten vett mintákban (északi, déli és központi szennyvíztisztító pontmintái, átlag)

2021. január közepétől azonban az alfa variánsra jellemző génavariánsok koncentrációja egyértelmű növekedésnek indult, miközben a vad típus aránya továbbra is változatlanul csökkent. A koncentrációk mellett a két típus arányának változása (30. ábra) kifejezetten látványos.



30. ábra: A SARS-CoV-2 alfa variánsára jellemző N501Y és del H69/V70 mutációk, valamint ezek vad típusú változatai átlagos arányának változása 2020. december 1. és 2021. március 15 között Budapesten vett mintákban (északi, déli és központi szennyvíztisztító pontmintái, átlag)

Hasonlóan gyors változás volt megfigyelhető az összes vizsgált településen 2021 januárja és márciusa között (12. táblázat), bár az új változat nem minden településen egyszerre jelent meg.

hét	Békéscsaba	Budapest	Debrecen	Eger	Győr	Kaposvár	Kecskemét	Miskolc	Nyíregyháza	Pécs	Salgótarján	Szeged	Székesfehérvár	Székszárd	Szolnok	Szombathely	Tatabánya	Budapest agglomeráció*	Veszprém	Zalaegerszeg
3	0.00	0.09	0.32		0.00	0.16	0.00	0.00	0.06	0.00	0.08	0.09	0.00	0.10	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	0.09
4	0.00	0.25	0.03	0.00	0.53	0.23	0.00	0.05	0.34	0.00	0.03	0.39	0.03	0.00	0.00	0.00	0.29	0.58	0.00	0.00
5	0.00	0.61	0.31	0.00	0.18	0.50	0.00	0.03		0.18	0.48	0.14	0.00	0.27	0.08	0.00	0.50	0.71	0.00	0.68
6			0.20	0.00				0.00	0.75			0.67	0.11	0.06	0.20	0.44	0.83	0.92	0.00	0.45
7	0.75	0.75	0.83	0.83	0.90	0.66	0.00	0.44	0.95	0.91	0.40	0.77	0.56	0.20	0.03	0.71	0.76	0.84	0.75	
8		0.89	0.94	0.59	0.82	0.88	0.85	0.66	0.71	0.85	0.89	0.89	0.64	0.81	0.43	0.82	0.55	0.99	0.43	0.91
9	0.78	0.99	0.63	1.00	0.94	0.91		0.66	0.99	0.90	0.91	0.96	0.95	0.92	0.66	0.91	0.98	1.00	0.91	
10	0.75	0.95	0.93	1.00	0.92	1.00	0.93	0.90	0.95	0.95	0.91	0.96	0.97	0.98	0.82	0.97	0.94	0.97	0.84	0.41

□ nincs adat

12. táblázat: Az alfa variánsra jellemző mintázatok (N501Y és del H69/V70) arányának változása a 2021. január 15. és 2021. március 15. között vett mintákban. A színskála az arány változását emeli ki (zöld – kizárólag a vad típusra jellemző változatok voltak jelen a mintában, piros – kizárólag az alfa variánsra jellemző változatok voltak jelen).

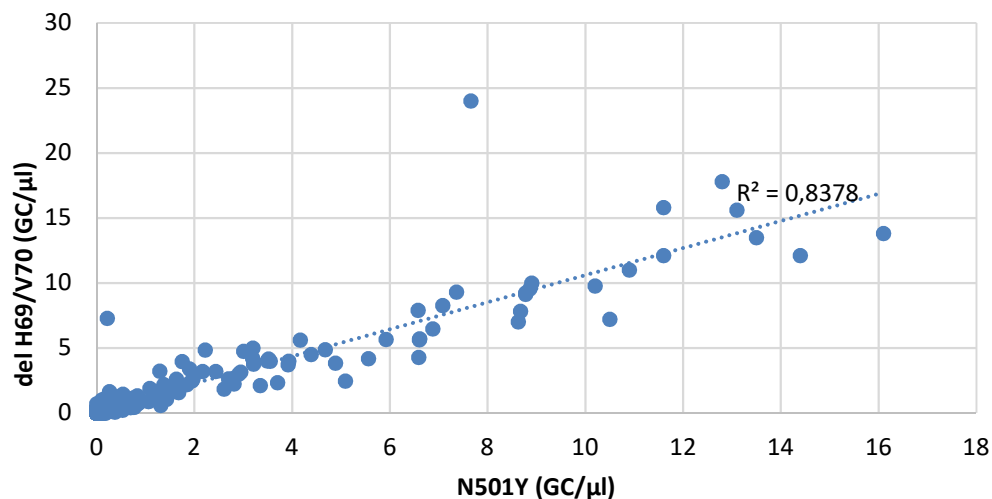
* 5 Budapest környéki település közös mintája (Tököl, Biatorbágy, Szigetszentmiklós, Budakeszi és Százhalombatta)

Az eredmények alapján Budapesten és agglomerációs településein, Tatabányán és Kaposváron terjedt el legkorábban ez a változat, míg pl. Szolnokon és Miskolcon csak hetekkel később. Március közepére szinte mindenütt 90 % felett volt az alfa variáns aránya a szennyvízben. Az új variáns elterjedési mintázatában nem volt megfigyelhető egyértelműen sem területi, sem lakosságszámmal arányos összefüggés az egyes városok esetében.

Bár a vizsgált települések többségében az új típus elterjedése gyors és folyamatos volt, néhány, a vártál alacsonyabb vagy magasabb érték is megfigyelhető a táblázatban. A tendenciába nem illeszkedő, kiugró eredményeit okozhatta a szennyvízminták nem tökéletes keveredése, ami ilyen komplex mintáknál a gondos mintaelőkészítés ellenére is előfordulhat (ilyen eltérés figyelhető meg pl. Győr esetében a 4. héten vagy Debrecen esetében a 9. héten). Kisebb örökítőanyag-koncentrációnál a véletlenül is múlhat, hogy a kimutatási reakcióba milyen mennyiségben kerülnek be az egyes variánsok.

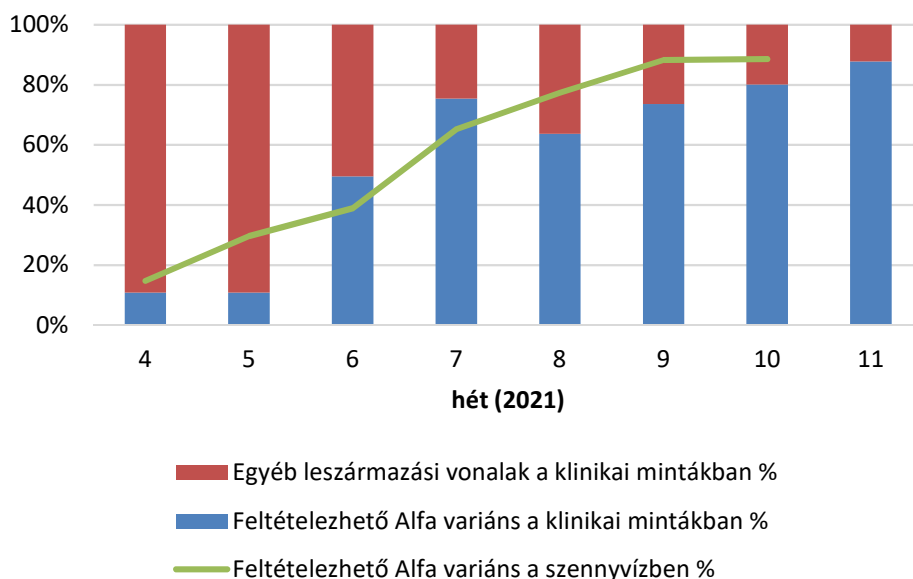
Az S gén két mutációs helyének vizsgálata még nem jelent egyértelmű bizonyítékot az alfa variáns jelenlétére, hiszen az egyes mutációk más leszármazási vonalakban is ismertek, és a vizsgálati körülmények azt sem támasztották alá, hogy a két variáns azonos genomban fordult

elő. Az N501Y mutáció előfordul többek között a béta variánsban is, az alfa variáns pedig a két vizsgált mutáción kívül számos további nem-szinonim mutációt is hordoz (Rambaut és mtsai, 2020). A két vizsgált változat koncentrációit összehasonlítva (31. ábra) azonban erős korrelációt láttunk az N501Y és a del H69/V70 mutációk előfordulása között (Pearson-korreláció, $R=0,9153$; $p<0,05$). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a két mutációs hely vizsgálatával valóban elsősorban az alfa variáns jelenlétét tudtuk megállapítani.



31. ábra: A SARS-CoV-2 alfa variánsára jellemző két mutáns génváltozat koncentrációjának összehasonlítása az egyes mintákban.

A humán megbetegedéseket okozó vírusvariánsokkal kapcsolatban ebből az időszakból országosan reprezentatívnak tekinthető adatsor nem áll rendelkezésre. Az NNK laboratóriuma (COVID munkacsoport) azonban az ország területének jelentős részéről kap légúti mintákat SARS-CoV-2 PCR vizsgálatra, így az összehasonlításhoz ezeket az eredményeket használtuk fel. A munkacsoport által azonosított pozitív mintákat PCR módszerrel (VirSNiP Mutation Assays - TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Németország) szűrték az alfa variáns két jellemző mutációs pontjára, az N501Y és a delH69/V70 mutációkra. Az előszűrés alapján feltételezhető alfa variánst tartalmazó minták egy részét teljes genom szekvenálással is megerősítették, az eredmények 100%-ban igazolták az alfa variáns jelenlétét az előszűrt mintákban. Az alfa variánsra jellemző mutációk arányát klinikai és szennyvíz minták esetében a 32. ábra mutatja be.

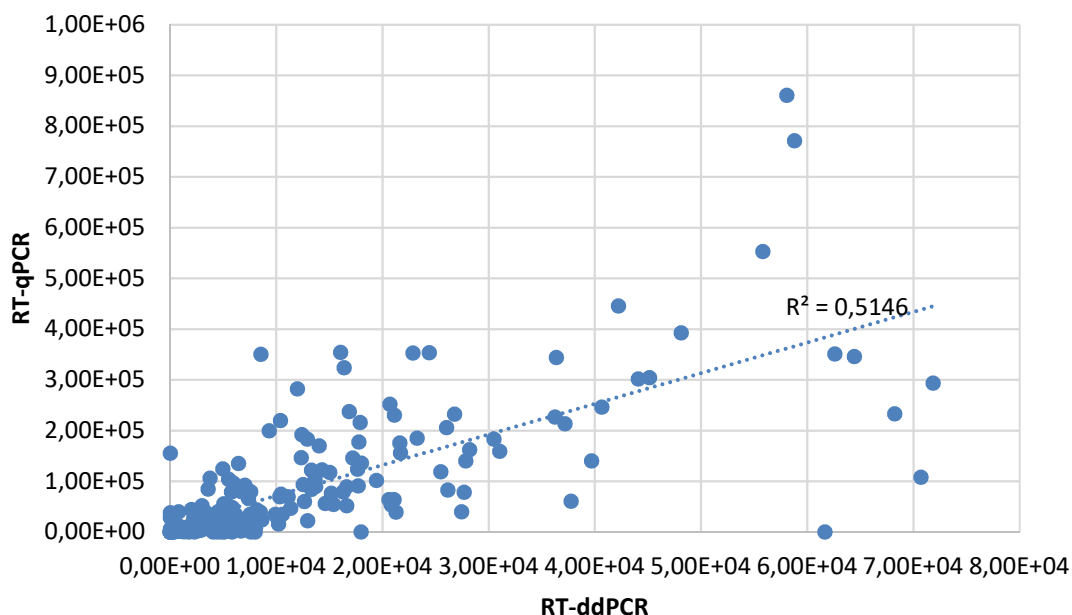


32. ábra: Két mutáció (N501Y és del H69/V70) jelenléte alapján feltételezhető SARS-CoV-2 alfa variáns előfordulásának változása 2021. 4. és 11. hete között (január közepe – március második fele) a szennyvíz mintákban és az NNK COVID laboratórium által vizsgált klinikai mintákban

A vizsgált időszakban a klinikai mintákban is jelentősen nőtt az alfa variáns előfordulása. Míg 2021. január közepén csupán a minták 10%-ában találták meg a variánsra jellemző mutációkat, 2021. március közepére az arány már elérte a 90%-ot. Az alfa variánsra jellemző mutációk aránya a szennyvízben és a klinikai minták esetében szoros korrelációt mutatott, a két érték közötti összefüggés statisztikailag is szignifikánsnak bizonyult (Pearson-korreláció, $R=0,921$, $p<0,05$).

Más tanulmányok szintén szoros összefüggést találtak a klinikai adatok és a szennyvízben kimutatható variánsok aránya között, mind ddPCR (Heijnen és mtsai. 2021) mind újgenerációs szekvenálás (Jahn és mtsai. 2021) módszerével.

A SARS-CoV-2 alfa variánsára jellemző mindkét vizsgált mutáció az S génen található, ezért a variáns kimutatás során a számszerűsítés ennek a génnek a kópiaszáma alapján történt, szemben a járványkövetés során használt kvantitatív PCR-el, ahol az N1 gén kópiaszáma kerül meghatározásra. A kétféle mennyiségi eredmény összehasonlítását a 33. ábra mutatja be.



33. ábra: Az S gén alapján ddPCR-el mért koncentrációk (a kétféle variáns összege, a két vizsgált mutációs pontra kapott eredmény átlagában) és az N1 gén alapján qPCR-el mért eredmények összehasonlítása

A kétféle mérési módszerrel kapott eredmény ugyan mutat összefüggést (Pearson-korreláció, $R=0,7173$, $p<0,05$), azonban számos jelentős eltérést is láthatunk a módszerek összehasonlítása során. Jellemző eltérés például, hogy a ddPCR-el kapott eredmények átlagosan 62%-kal alacsonyabbak, mint a qPCR-rel kapott eredmények. Az eltérés okát nem sikerült tisztázni, azonban Heijnen és mtsai. (2021) nagyon hasonló eredményt kaptak S gén ddPCR-el mért és N2 gén qPCR-el mért eredményeivel kapcsolatban. Az eltérést magyarázhatja az, hogy a két gén eltérő kópiaszámban fordulhat elő, azonban azonos (N1) primer szettel végzett vizsgálatok során is hasonló eredményeket kaptunk.

A ddPCR-el végzett vizsgálatok előnye, hogy gyorsan és viszonylag olcsón, nagy pontossággal megállapítható az egyes variánsok előfordulásának aránya. A módszer hátránya, hogy az újabb variánsok esetében újabb primer szetteket kell beszerezni, ami a pandémia alatt elhúzódó folyamat lehet (az alfa variánsra vonatkozó vizsgálatokat csak 2021 májusában sikerült elvégezni, több hónappal a variáns elterjedése után).

Hátrányként kell azonban megjegyezni, hogy az újonnan felbukkanó, esetleg korábban nem ismert variánsok azonosítása a hasonló, egy-egy jellemző mutáció azonosítására szolgáló szűrési módszerrel nem lehetséges. Az újgenerációs szekvenálás módszerével azonban preconcepciók nélkül vizsgálható a vírus teljes genomja. Több kutatócsoportnak is sikerült már jó eredményeket elérni ezzel a módszerrel (Agrawal és mtsai. 2021; Crits-Christoph és mtsai. 2021; Izquierdo-Lara és mtsai. 2021; Jahn és mtsai. 2021). Az NNK-ban 2021 októberéig még nem sikerült megbízhatóan beállítani a módszert, bár a vizsgálatok folyamatban vannak,

kedvező részeredmények már rendelkezésre állnak. Az újgenerációs szekvenálás módszerével végzett vizsgálatok hátránya, hogy az egyes variánsok elkülönítése így sem egyértelmű, mivel a rövid leolvasási keretek miatt nem állapítható meg, hogy az egyes mutációk azonos genomon találhatóak-e. Hosszú leolvasási keretek alkalmazása a szennyvízben található vírus genomok töredezettsége miatt nem bizonyult sikeresnek. A gyors és megbízható azonosítást feltehetően több különböző módszer kombinációja (ddPCR és szekvenálás) jelenthetné.

6.6 A szennyvíz alapú COVID-19 előrejelző rendszer eredményeinek gyakorlati hasznosulása a járványkezelésben

A szennyvíz alapú epidemiológia felhasználási lehetőségei sokrétűek, elengedhetetlen azonban a szoros közreműködés a járványügyi szakemberekkel, valamint az eredmények gyors és hatékony kommunikációja a döntéshozók, valamint a lakosság felé. Olyan területek vagy közösségek vizsgálata esetén, ahol nincsenek jelen ismert fertőzöttek, a szennyvízvizsgálatokkal kiszűrhető a betegség (ismételt) megjelenése. A poliovírus vizsgálatok esetében a szennyvíz alapú epidemiológiát ilyen célból használják (Asghar és mtsai. 2014).

A COVID-19 követésére használt szennyvíz alapú epidemiológia leggyakoribb felhasználási módja a megbetegedések tendenciájának elemzése, lehetőség szerint előrejelzése. Az eredmények ilyen jellegű felhasználási lehetőségét az eddig bemutatott összefüggések is alátámasztják. A szennyvíz eredmények – előrejelző képességük révén – a klinikai esetszámnál gyorsabban jelzik a járványügyi korlátozások szükségességét, illetve hatásait. A hatékony döntéstámogatás érdekében az eredményeket hetente kétszer közöltük az Országos Tisztifőorvos, valamint rajta keresztül a járvány kezelésével megbízott Operatív Törzs felé, ahol az eredményeket egyéb járványügyi mutatók mellett figyelembe vették a döntéshozatalhoz. A jelentésekben az országos átlag alakulására fókuszáltunk, emellett külön megemlítettük a vizsgálatba bevont városokat is, ahol jelentős növekedést vagy csökkenést tapasztalunk az adatokban. Az országos adatok az országos szintű intézkedések meghozatalában, illetve a hatásuk követésében bizonyultak hasznosnak, míg a városi szintű adatok az egészségügyi ellátórendszer regionális terhelésének tervezésében nyújtottak segítséget.

Az eredmények hasznosításának másik fontos aspektusa a lakosság tájékoztatása, ezáltal a figyelem felhívása a járványügyi óvintézkedések betartására. Lakossági kommunikációs anyag hetente került fel az NNK honlapjára (<https://www.nnk.gov.hu/index.php/koronavirus/szennyvizvizsgalatok>). Lakossági kommunikációhoz az eredményeket koncentráció kategóriákba soroltuk

(alacsony/mérsékelt/emelkedett/magas), emellett jeleztük a változás irányát is (csökken/stagnál/emelkedik/erősen emelkedik). Az eredményeket a SARS-CoV-2 koncentrációk *Enterococcusra* történő normalizálása után jelentettük.

A koncentráció-változásnál a mikrobiológiai vizsgálatok átlagos hibahatárát vettük számításba, ezek alapján számottevő változásnak a nagyságrendnyi (legalább tízszeres) eltérés számított. Ez alapján stagnálónak tekintettük a tendenciát, ha nagyságrendnyi változást nem tapasztaltunk az adatokban, míg emelkedőnek, ha nagyságrendnyi növekedést mértünk. A csökkenő tendenciát óvatosabban kommunikáltuk az eredményekben gyakran megfigyelhető ingadozás miatt: csak akkor jeleztük, ha két egymás utáni eredmény is a korábbinál egy nagyságrenddel alacsonyabb eredményt mutatott. Az erősen emelkedő tendencia besorolást – bár korábban számoltunk vele – mindezidáig nem használtuk, ami eddig minden esetben jó döntésnek bizonyult. A két nagyságrendnyi vagy nagyobb változásokról a későbbiekben kivétel nélkül kiderült, hogy csupán átmeneti ingadozást jelentettek, amelyet a minta nem tökéletes keveredése, esetleg mintavételi vagy feldolgozási hiba okozhatott.

A koncentráció kategóriák megállapítása szintén még az első valós pozitív minták megtalálása előtt, 2020 nyarán történt, így a várható koncentráció tartományokat irodalmi adatok alapján becsültük. Az egyik legelső, számszerű eredményeket is tartalmazó preprint tanulmány (Wurtzer és mtsai. 2020) alapján súlyosan járványos időszakban, Párizsban a koncentráció megközelítette a 10^7 GC/L értéket. Ez alapján a "magas" koncentráció-kategóriát 10^6 GC/L érték felett állapítottuk meg. Az "alacsony" koncentráció-tartománynál az elméleti alsó méréshatárt (1710 GC/L) vettük alapul. Emellett mikrobiológiai szempontból nem akartuk megkülönböztetni a negatív eredményt a gyengén pozitív, kimutatási határ körüli értékektől, emiatt a következő ("mérsékelt") koncentráció-kategória az elméleti alsó kimutatási határnál kb. egy nagyságrenddel magasabban (10^4 GC/L) kezdődik.

A koncentráció-kategóriák megállapításánál tehát az alábbi értékeket vettük figyelembe:

- Alacsony koncentráció: negatív eredmény vagy $<10^4$ GC/L
- Mérsékelt koncentráció: $10^4 - 10^5$ GC/L
- Emelkedett koncentráció: $10^5 - 10^6$ GC/L
- Magas koncentráció: $>10^6$ GC/L

Az így megállapított koncentráció-kategóriák a monitoring rendszer első másfél évében megfelelőnek bizonyultak, mindezidáig nem vált szükségessé a rendszer felülvizsgálata vagy a skála bővítése.

A szennyvizek SARS-CoV-2 vizsgálatát végző kutatócsoportok más országokban is igyekeznek a lakosság számára is közzétenni az eredményeket valamilyen formában. Az egyes országok különböző gyakorlatot folytatnak erre: Ausztriában a hazaihoz hasonló kategóriákat tesznek közzé (<https://corona.hydro-it.com/dashboard/>), Hollandiában ezzel szemben a számszerű mérési eredményeket jelenítik meg (<https://www.kwrwater.nl/en/actueel/sewage-monitoring-as-an-early-warning-system-for-corona/>). Előbbi módszer előnye az egyszerűbb, átláthatóbb eredményközlés, míg utóbbié a nagyobb pontosság, ugyanakkor a számszerű adatok ábrázolása esetén a véletlenszerű ingadozások értelmezése és kiszűrése a lakosság számára nehezen kommunikálható. Hollandia esetében több száz szennyvíztelep napi monitorozásával készülnek az adatok, így a rendszer kevésbé érzékeny a kiugró adatokra, azok könnyebben simíthatóak.

A szennyvíz SARS-CoV-2 vizsgálatokból készülő lakossági kommunikációs anyag nagy figyelmet kap, a legolvasottabb hírportálok hetente átveszik a hírt, valamint rendszeresen megjelenik egyéb országos médiumokban (televízió, rádió) is.

A világban az eredmények további felhasználásai is előfordulnak. Részletesebb, kisebb településrészekre kiterjedő vizsgálatok esetén lokális intézkedéseknek is alapja lehet a szennyvíz alapú epidemiológia eredménye, így a célzottabb korlátozások bevezetésével a gazdasági károk is csökkenthetőek. Emellett a vizsgálattal marginalizált csoportok, vagy egyéb okokból kevésbé tesztelt lakosság körében előforduló megbetegedésről is valós képet alkothatunk (WHO 2022).

A vizsgálat nagyobb, város méretű populációk mellett egészen kis közösségek vizsgálatára is alkalmas lehet, mint egy kórház, kollégium, vagy akár egy repülő utazóközössége. Ilyen esetben a mintavétel megfelelő szervezése (pl. automata mintavevő alkalmazása) még nagyobb jelentőségű. Nagyobb közösségi csomóponton (pl. vasútállomás, repülőtér) keletkező szennyvíz vizsgálata az ideiglenesen átutazók fertőzöttségének felmérésében is segíthet (WHO 2022). Utóbbi elsősorban újabb vírusvariánsok behurcolása, valamint az így induló újabb járványhullámok indulása esetén lehet kiemelt jelentőségű. Emiatt az NNK-ban is vizsgáljuk a nagyobb közlekedési csomópontokban keletkező szennyvíz vizsgálatának lehetőségét.

7. Következtetések

Munkám során áttekinttem, hogy a különböző vizes közegekből történő víruskimutatás hogyan nyújthat segítséget a járványtannak. Kitértem egyrészt arra, hogy a közvetlen emberi felhasználásra szánt vizek (ivóvíz, természetes vagy medencés fürdők) vizsgálatával hozzájárulhatunk egy járvány eredetének felderítéséhez, amely elengedhetetlen a további fertőzések elkerülése érdekében. A szennyvíz vizsgálatával emellett a szennyvíztelep által ellátott lakosság egészségi állapota is monitorozható, amely mind a döntéshozók, mind a lakosság részére kiemelkedően fontos információt jelent egy olyan nehéz időszakban, amelyet a COVID-19 világjárvány okozott.

Dolgozatom fő megállapításai a következők:

- A vízzel terjedő kórokozó vírusok (calicivírusok, hepatitis A) kimutatása a vizsgált esetekben nem tudta egyértelműen kizárni vagy megerősíteni a víz, mint közvetítő közeg szerepét, de az eredmények így is hozzájárultak a járvány eredetének felderítéséhez. Az vizsgált hepatitis A halmozódás esetében a víz, mint közvetítő közeg szerepe megkérdőjelezhető az eredmények alapján, míg a három calicivírus-járványból egy esetben nagyon valószínű, egy esetben pedig szintén elképzelhető a vízeredet. A harmadik esetben sem zárható ki teljesen a víz, mint közvetítő közeg szerepe.
- 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.
- A szennyvízből történő SARS-CoV-2 kimutatási módszer fejlesztése 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.
- A szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények és a klinikai esetszámok összevetése során igazolódott, hogy a módszer jól alkalmazható a hazai esetszámok előrejelzésére, és hozzájárul az egészségügyi ellátórendszer kapacitásainak jobb tervezhetőségéhez. A dolgozatban elemzett időszakban, 2020 júliusa és 2021 októbere között 1738 minta vizsgálata történt meg. Emellett a negyedik hullám pontosabb értékelése érdekében további másfél hónapnyi adatsort felhasználtam (országos átlag alakulása összesen 209 minta alapján).

- Megfelelő normalizálási és simítási módszert alkalmazva az adatok a legtöbb vizsgált nagyvárosban erős összefüggést mutatnak az új és aktív COVID-19 esetszámokkal (Pearson-korreláció, $r^2=0,75 - 0,42$; 0,5 alatti érték mindössze három városban figyelhető meg. Az összefüggés minden esetben szignifikáns ($p < 0,05$)).
- Az egyes városokat, valamint az országos átlagot tekintve a szennyvíz eredmények az új esetek számával egy, míg a kórházi esetszámokkal két hetes eltolással mutatják a legerősebb összefüggést.
- A pandémia hazai második, harmadik és negyedik hullámát tekintve trendszerű eltolódás nem figyelhető meg az előrejelző képességben.
- A szennyvíz eredmények önmagukban sem az új fertőzöttek, sem a kórházi kezelésre szorulóknak 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.
- A szennyvíz vizsgálata a keringő vírusvariánsok azonosításának is hatékony eszköze lehet. Az alkalmazott ddPCR módszer alkalmas a legfontosabb variánsok gyors szűrésére és az arányának számszerű megállapítására. Az eredmények az alfa variáns elterjedésének időszakában szoros korrelációt mutattak a variánsok klinikai mintákban megfigyelt arányával (Pearson-korreláció, $R=0,921$, $p < 0,05$). A módszer hátránya azonban, hogy az újabb variánsok kimutatásához speciális fogyóanyagok kellenek; ezek beszerzése pedig időigényes. A variánsok azonosításának legmegbízhatóbb módszere a teljes genom szekvenálás, ez azonban komplex környezeti minták esetében további módszerfejlesztést igényel.
- A szennyvíz SARS-CoV-2 eredmények hatékony kommunikációja a döntéshozók és a lakosság felé elősegíti a döntéshozatalt és a járványügyi védekezést.

8. Összefoglalás

Jelen dolgozatban a különböző vizes közegekből – ivóvízből, természetes és medencés fürdővízből, valamint szennyvízből – történő víruskimutatás lehetőségeit, valamint az eredmények járványügyi hasznosítását vizsgáltuk. Az emberek által közvetlenül felhasznált vizek esetében a vizsgálatok segítséget nyújthatnak egy esetleges járvány eredetének felderítésében, míg a szennyvíz vizsgálatával magára a járványra vonatkozó adatokat nyerhetünk (szennyvíz alapú epidemiológia).

Enterális eredetű járványok kivizsgálásakor három calicivírus és egy hepatitis A járvány esetében nyújtottunk segítséget az esetleges víz eredet felderítésében a járványügyi hatóságnak. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a hepatitis A halmozódás esetében nem a víz volt a terjesztő közeg, míg a három calicivírus járványból két esetben valószínűleg igen.

A szennyvíz, mint közösségi minta vizsgálatát a COVID-19 járvánnyal kapcsolatban végeztük. Külföldi adatok alapján hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a szennyvíz vizsgálata jól használható a COVID-19 esetszámok előrejelzésére, mivel a fertőzöttek már a tünetek megjelenése előtt is ürítik a vírust. A vizsgálatok a megfelelő módszer kiválasztásával kezdődtek, így a visszanyerés és az áteresztőképesség, valamint a hozzáférhetőség figyelembevételével egy egyedi lapmembrános, ultraszűréses víruskoncentrálási módszert fejlesztettünk ki, amelyet RNS kivonás, és RT-qPCR követ.

A szennyvíz adatok és a COVID-19 esetszámok közti összefüggés vizsgálatát három járványhullámon keresztül, közel másfél évnyi, heti rendszerességű adatsoron elemeztük. A vizsgált három járványhullám alatt az előrejelző képesség trendszerűen nem változott, az eltérő körülmények (tesztek száma, tünetmentesek aránya, átoltottság) ellenére sem: az új esetek számát egy, a kórházban ápoltak számát két héttel jelzi előre. Az egyes megyeszékhelyek eredményeinek megbízhatósága eltérő. Az előrejelző képesség nem függ szorosan a lakosságszámtól, automata mintavétel alkalmazásával javítható, ugyanakkor pontmintavétellel is jó eredmények érhetőek el.

A szennyvíz vizsgálatával a keringő vírusvariánsokról is reprezentatív képet alkothatunk. Részletes vizsgálatokat az alfa variáns elterjedésekor végeztünk, ahol a szennyvíz eredmények szoros összefüggést mutattak a klinikai adatokkal.

A vizsgálatok eredményei közvetlen felhasználásra kerültek mind a helyi járványok eredetének felderítésében, mind a COVID-19 járvány kezelésével kapcsolatban. Utóbbi esetben a járvány kezelésével megbízott operatív törzs a heti rendszerességgel küldött adatainkat egyéb

mutatók mellett felhasználta a döntéshozatalban, míg a lakossági tájékoztatónk a figyelem felkeltésén keresztül segítette a védekezést.

9. Summary

The possibility of virus detection from several water matrices – drinking water, pool water, recreational water and wastewater – and the epidemiological application of the results was investigated in this study. The investigation of waters for direct human use helps in source identification of outbreaks, while wastewater surveillance provides data on epidemic trends (wastewater-based epidemiology).

In the investigation of enteric outbreaks, we assisted the epidemiological authority in three calicivirus and one hepatitis A epidemics in identifying potential water origin. Based on the results, water was unlikely to be the transmission medium in case of hepatitis A cluster, while in two of the three investigated calicivirus outbreaks, water origin is plausible.

Wastewater as a community sample was investigated in the context of the COVID-19 pandemic. Based on literature data, the efficiency of wastewater surveillance in predicting COVID-19 cases was recognized early on, because infected people start shedding the virus even before symptoms appear. Investigations started by selecting the appropriate method. Considering the recovery, throughput and availability, an in-house virus concentration method was developed combining flat sheet membrane ultrafiltration, followed by RNS extraction and RT-qPCR.

The correlation between wastewater data and COVID-19 cases was examined on three epidemic waves, on weekly data series of almost one and a half years. In the three epidemic waves, predictive power showed no shift, despite the changing circumstances (i. e. number of tests, the rate of asymptomatic cases, vaccination). The reliability of the results of the county seats varied. The reliability of prediction shows no close correlation with the population size, it can be improved by automatic composite sampling, however, good results can be also availed by grab sampling.

By wastewater surveillance, representative picture can be obtained also on the circulating virus variants. Detailed study was carried out for alpha variant emergence. In this case, wastewater results showed close correlation with clinical data.

The results of these study were directly used both in detecting the source of local epidemics and in dealing with the COVID-19 epidemic. In the latter case, the operational board entrusted with pandemic management used the weekly data in decision making together with other indicators, while communication to the public helped defense through raising awareness.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **dr. Vargha Mártának**, amiért támogatta a doktori tanulmányaim elkezdését és folytatását. Szakmai támogatása és lelkesedése nélkül nem csak ezen dolgozat, de az abban feldolgozott eredmények sem készülhettek volna el.

Köszönöm **dr. Khayer Bernadettnek**, hogy a doktori tanulmányaim nehezebb időszakában is folyamatosan támogattott, és nem hagyta, hogy doktori fokozat szerzése nélkül megússzam. Köszönettel tartozom **dr. Oravecz Orsolyának** is, akinek szintén fontos szerepe volt abban, hogy dolgozatom a jelenlegi formájában beadásra kerüljön.

Köszönöm munkatársaimnak, elsősorban **Schuler Eszternek, Kovács Luca Bellának, Ladányi Barbarának és Lénárt Györgyné, Mariannak** a laboratóriumi munkában nyújtott pótolhatatlan segítséget, valamint **Erdélyi Norbertnek és Málnási Tibornak**, hogy a statisztika útvesztőiben segítettek eligazodni. Köszönöm a szakmai segítséget az NNK Nemzeti Biztonsági Laboratórium munkatársainak, elsősorban **Magyar Nórának, Pályi Bernadettnek, Déri Dánielnek és dr. Kis Zoltánnak**.

Köszönettel tartozom a **Nemzeti Népegészségügyi Központnak**, és elsősorban a Közegészségügyi Laboratóriumi Főosztály vezetőjének, **dr. Pándics Tamásnak**, hogy támogatta a doktori tanulmányaimat.

A szennyvíz alapú epidemiológiai vizsgálatok csak széles körű összefogással készülhettek el. Köszönettel tartozom a **Magyar Víziközmű Szövetségnek és a Szennyvíztelepek üzemeltetőinek** a mintavételek lebonyolításáért, a megyei kormányhivatalom Népegészségügyi Főosztályainak a mintaszállítáért, valamint a **SUEZ WTS-nek**, elsősorban **dr. Vízvárdi Kristófnak** a speciális ultraszűrő membránok elkészítéséért. Utóbbi a dolgozatom elkészültét is támogatta, segítségük nélkül azonban a hazai szennyvíz alapú COVID-19 előrejelző rendszer azonban ilyen korán és ebben a formában nehezen tudott volna megvalósulni.

Nem utolsó sorban köszönöm a **Családomnak**, akik az idáig vezető úton is mindig, mindenben támogattak és bíztattak.

11. Irodalomjegyzék

- Agrawal, Shelesh, Laura Orschler, és Susanne Lackner. 2021. „Long-Term Monitoring of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater of the Frankfurt Metropolitan Area in Southern Germany”. *Scientific Reports* 11 (1): 5372. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84914-2>.
- Agrawal, Shelesh, Laura Orschler, Selina Schubert, Kira Zachmann, Leo Heijnen, Simona Tavazzi, Bernd Manfred Gawlik, Miranda de Graaf, Gertjan Medema, és Susanne Lackner. 2021. „A Pan-European Study of SARS-CoV-2 Variants in Wastewater under the EU Sewage Sentinel System”. Preprint. *Epidemiology*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.11.21258756>.
- Ahmed, Warish, Paul M. Bertsch, Aaron Bivins, Kyle Bibby, Kata Farkas, Amy Gathercole, Eiji Haramoto, és mtsai. 2020. „Comparison of Virus Concentration Methods for the RT-QPCR-Based Recovery of Murine Hepatitis Virus, a Surrogate for SARS-CoV-2 from Untreated Wastewater”. *Science of The Total Environment* 739 (október): 139960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>.
- Allard, Annika, Bo Albinsson, és Göran Wadell. 2001. „Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis”. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2): 498–505. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.498-505.2001>.
- Almon, Shirley. 1965. „The Distributed Lag Between Capital Appropriations and Expenditures”. *Econometrica* 33 (1): 178. <https://doi.org/10.2307/1911894>.
- Angel, Yoel, Avishay Spitzer, Oryan Henig, Esther Saiag, Eli Sprecher, Hagit Padova, és Ronen Ben-Ami. 2021. „Association Between Vaccination With BNT162b2 and Incidence of Symptomatic and Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections Among Health Care Workers”. *JAMA* 325 (24): 2457. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.7152>.
- Asghar, H., O. M. Diop, G. Weldegebriel, F. Malik, S. Shetty, L. El Bassioni, A. O. Akande, és mtsai. 2014. „Environmental Surveillance for Polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative”. *Journal of Infectious Diseases* 210 (suppl 1): S294–303. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu384>.
- Balboa, Sabela, Miguel Mauricio-Iglesias, Santiago Rodriguez, Lucía Martínez-Lamas, Francisco J. Vasallo, Benito Regueiro, és Juan M. Lema. 2021. „The Fate of SARS-COV-2 in WWTPS Points out the Sludge Line as a Suitable Spot for Detection of COVID-19”. *Science of The Total Environment* 772 (június): 145268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145268>.
- Benedict, Katharine M., Hannah Reses, Marissa Vigar, David M. Roth, Virginia A. Roberts, Mia Mattioli, Laura A. Cooley, és mtsai. 2017. „Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water — United States, 2013–2014”. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 66 (44): 1216–21. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6644a3>.
- Bertels, Xander, Phaedra Demeyer, Siel Van den Bogaert, Tim Boogaerts, Alexander L.N. van Nuijs, Peter Delputte, és Lies Lahousse. 2022. „Factors Influencing SARS-CoV-2 RNA Concentrations in Wastewater up to the Sampling Stage: A Systematic Review”. *Science of The Total Environment* 820 (május): 153290. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153290>.
- Bisseux, Maxime, Jonathan Colombet, Audrey Mirand, Anne-Marie Roque-Afonso, Florence Abravanel, Jacques Izopet, Christine Archimbaud, és mtsai. 2018. „Monitoring Human Enteric Viruses in Wastewater and Relevance to Infections Encountered in the Clinical

- Setting: A One-Year Experiment in Central France, 2014 to 2015". *Eurosurveillance* 23 (7). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237>.
- Boehm, Alexandria B., Katherine E. Graham, és Wiley C. Jennings. 2018. „Can We Swim Yet? Systematic Review, Meta-Analysis, and Risk Assessment of Aging Sewage in Surface Waters". *Environmental Science & Technology* 52 (17): 9634–45. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01948>.
- Brüssow, Harald, és Lutz Brüssow. 2021. „Clinical Evidence That the Pandemic from 1889 to 1891 Commonly Called the Russian Flu Might Have Been an Earlier Coronavirus Pandemic". *Microbial Biotechnology* 14 (5): 1860–70. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13889>.
- Calgua, B., A. Mengewein, A. Grunert, S. Bofill-Mas, P. Clemente-Casares, A. Hundesa, A.P. Wyn-Jones, J.M. López-Pila, és R. Girones. 2008. „Development and Application of a One-Step Low Cost Procedure to Concentrate Viruses from Seawater Samples". *Journal of Virological Methods* 153 (2): 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>.
- Cavanagh, Dave. 2005. „Coronaviridae: a review of coronaviruses and toroviruses". In *Coronaviruses with Special Emphasis on First Insights Concerning SARS*, szerkesztette Axel Schmidt, Olaf Weber, és Manfred H. Wolff, 1–54. Basel: Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/3-7643-7339-3_1.
- Chenar, Shima Shamkhali, és Zhiqiang Deng. 2018. „Development of Genetic Programming-Based Model for Predicting Oyster Norovirus Outbreak Risks". *Water Research* 128 (január): 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.032>.
- „COVIDPoops19 Dashboard". 2022. <https://www.covid19wbec.org/covidpoops19>.
- Crits-Christoph, Alexander, Rose S. Kantor, Matthew R. Olm, Oscar N. Whitney, Basem Al-Shayeb, Yue Clare Lou, Avi Flamholz, és mtsai. 2021. „Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants". Szerkesztette Melinda M. Pettigrew. *MBio* 12 (1): e02703-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02703-20>.
- D'Aoust, Patrick M., Tyson E. Graber, Elisabeth Mercier, Danika Montpetit, Ilya Alexandrov, Nafisa Neault, Aiman Tariq Baig, és mtsai. 2021. „Catching a Resurgence: Increase in SARS-CoV-2 Viral RNA Identified in Wastewater 48 h before COVID-19 Clinical Tests and 96 h before Hospitalizations". *Science of The Total Environment* 770 (május): 145319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145319>.
- Daughton, C. G. 2001. „Emerging Pollutants, and Communicating the Science of Environmental Chemistry and Mass Spectrometry: Pharmaceuticals in the Environment". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12 (10): 1067–76. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00287-2).
- Davies, Nicholas G., Sam Abbott, Rosanna C. Barnard, Christopher I. Jarvis, Adam J. Kucharski, James D. Munday, Carl A. B. Pearson, és mtsai. 2021. „Estimated Transmissibility and Impact of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England". *Science* 372 (6538): eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>.
- Davies, Nicholas G., CMMID COVID-19 Working Group, Christopher I. Jarvis, W. John Edmunds, Nicholas P. Jewell, Karla Diaz-Ordaz, és Ruth H. Keogh. 2021. „Increased Mortality in Community-Tested Cases of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7". *Nature* 593 (7858): 270–74. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03426-1>.
- Dura, Gyula, Tamás Pándics, Mihály Kádár, Katalin Krisztalovics, Zoltánné Kiss, Judit Bodnár, Ágnes Asztalos, és Erzsébet Papp. 2010. „Environmental Health Aspects of Drinking Water-Borne Outbreak Due to Karst Flooding: Case Study". *Journal of Water and Health* 8 (3): 513–20. <https://doi.org/10.2166/wh.2010.099>.
- Eftim, Sorina E., Tao Hong, Jeffrey Soller, Alexandria Boehm, Isaac Warren, Audrey Ichida, és Sharon P. Nappier. 2017. „Occurrence of Norovirus in Raw Sewage – A Systematic

- Literature Review and Meta-Analysis”. *Water Research* 111 (március): 366–74. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.017>.
- Ekundayo, Temitope C., Bright E. Igere, Yinka D. Oluwafemi, Chidozie D. Iwu, és Oladipo O. Olaniyi. 2021. „Human Norovirus Contamination in Water Sources: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Environmental Pollution* 291 (december): 118164. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118164>.
- Európai Bizottság. 2021. *A BIZOTTSÁG (EU) 2021/472 AJÁNLÁSA (2021. március 17.) a SARS-CoV-2 és variánsai uniós szennyvizekben történő szisztematikus megfigyelésének kialakítására vonatkozó közös megközelítésről*.
- European Centre for Disease Prevention and Control: Variants of interest and concern in the EU/EEA <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/situation-updates/variants-dashboard>
- ECDC 2012: Toolkit for investigation and response to Food and Waterborne Disease Outbreaks with an EU dimension <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/toolkit-investigation-and-response-food-and-waterborne-disease-outbreaks-eu>
- Farkas, Kata, Evelien M. Adriaenssens, David I. Walker, James E. McDonald, Shelagh K. Malham, és Davey L. Jones. 2019. „Critical Evaluation of CrAssphage as a Molecular Marker for Human-Derived Wastewater Contamination in the Aquatic Environment”. *Food and Environmental Virology* 11 (2): 113–19. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09369-1>.
- Farkas, Kata, David M. Cooper, James E. McDonald, Shelagh K. Malham, Alexis de Rougemont, és Davey L. Jones. 2018. „Seasonal and Spatial Dynamics of Enteric Viruses in Wastewater and in Riverine and Estuarine Receiving Waters”. *Science of The Total Environment* 634 (szeptember): 1174–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.038>.
- Farkas, Kata, Luke S. Hillary, Jamie Thorpe, David I. Walker, James A. Lowther, James E. McDonald, Shelagh K. Malham, és Davey L. Jones. 2021. „Concentration and Quantification of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Using Polyethylene Glycol-Based Concentration and QRT-PCR”. *Methods and Protocols* 4 (1): 17. <https://doi.org/10.3390/mps4010017>.
- Graham, D. Y., X. Jiang, T. Tanaka, A. R. Opekun, H. P. Madore, és M. K. Estes. 1994. „Norwalk Virus Infection of Volunteers: New Insights Based on Improved Assays”. *Journal of Infectious Diseases* 170 (1): 34–43. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.1.34>.
- Guix, Susana, Cristina Fuentes, Rosa M. Pintó, Albert Blanco, Aurora Sabrià, Eduard Anfruns-Estrada, Virginia Rodríguez Garrido, és mtsai. 2019. „Infectivity of Norovirus GI and GII from Bottled Mineral Water during a Waterborne Outbreak, Spain”. *Emerging Infectious Diseases* 26 (1): 134–37. <https://doi.org/10.3201/eid2601.190778>.
- Guo, Meng, Wanyin Tao, Richard A. Flavell, és Shu Zhu. 2021. „Potential Intestinal Infection and Faecal–Oral Transmission of SARS-CoV-2”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18 (4): 269–83. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00416-6>.
- Hall, Victoria Jane, Sarah Foulkes, Ayoub Saei, Nick Andrews, Blanche Oguti, Andre Charlett, Edgar Wellington, és mtsai. 2021. „COVID-19 Vaccine Coverage in Health-Care Workers in England and Effectiveness of BNT162b2 mRNA Vaccine against Infection (SIREN): A Prospective, Multicentre, Cohort Study”. *The Lancet* 397 (10286): 1725–35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00790-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00790-X).
- Heijnen, Leo, Goffe Elsinga, Miranda de Graaf, Richard Molenkamp, Marion P.G. Koopmans, és Gertjan Medema. 2021. „Droplet Digital RT-PCR to Detect SARS-CoV-2 Variants of Concern in Wastewater”. Preprint. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.25.21254324>.

- Heijnen, Leo, és Gertjan Medema. 2011. „Surveillance of Influenza A and the Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 in Sewage and Surface Water in the Netherlands”. *Journal of Water and Health* 9 (3): 434–42. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.019>.
- Izquierdo-Lara, Ray, Goffe Elsinga, Leo Heijnen, Bas B. Oude Munnink, Claudia M.E. Schapendonk, David Nieuwenhuijse, Matthijs Kon, és mtsai. 2021. „Monitoring SARS-CoV-2 Circulation and Diversity through Community Wastewater Sequencing, the Netherlands and Belgium”. *Emerging Infectious Diseases* 27 (5): 1405–15. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204410>.
- IWA 2022. „Early detection of Omicron variant with wastewater surveillance” online konferencia <https://iwa-network.org/learn/early-detection-of-omicron-variant-with-wastewater-surveillance/>.
- Jahn, Katharina, David Dreifuss, Ivan Topolsky, Anina Kull, Pravin Ganesanandamoorthy, Xavier Fernandez-Cassi, Carola Bänziger, és mtsai. 2021. „Detection and Surveillance of SARS-CoV-2 Genomic Variants in Wastewater”. Preprint. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.08.21249379>.
- Johnson, R, C J F Muller, S Ghoor, J Louw, E Archer, S Surujlal-Naicker, N Berkowitz, és mtsai. 2021. „Qualitative and quantitative detection of SARS-CoV-2 RNA in untreated wastewater in Western Cape Province, South Africa”. *South African Medical Journal* 111 (3): 198. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2021.v111i3.15154>.
- Kern, Anita, Mihaly Kadar, Katalin Szomor, György Berencsi, Beatrix Kapusinszky, és Marta Vargha. 2013. „Detection of Enteric Viruses in Hungarian Surface Waters: First Steps towards Environmental Surveillance”. *Journal of Water and Health* 11 (4): 772–82. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.242>.
- Kitajima, Masaaki, Warish Ahmed, Kyle Bibby, Annalaura Carducci, Charles P. Gerba, Kerry A. Hamilton, Eiji Haramoto, és Joan B. Rose. 2020. „SARS-CoV-2 in Wastewater: State of the Knowledge and Research Needs”. *Science of The Total Environment* 739 (október): 139076. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>.
- Kitajima, Masaaki, Hannah P. Sassi, és Jason R. Torrey. 2018. „Pepper Mild Mottle Virus as a Water Quality Indicator”. *Npj Clean Water* 1 (1): 19. <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>.
- Koroglu, Mehmet, Kathryn H. Jacobsen, Tayfur Demiray, Ahmet Ozbek, Unal Erkorkmaz, és Mustafa Altindis. 2017. „Socioeconomic Indicators Are Strong Predictors of Hepatitis A Seroprevalence Rates in the Middle East and North Africa”. *Journal of Infection and Public Health* 10 (5): 513–17. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.09.020>.
- Krivoňáková, Nad'a, Andrea Šoltýsová, Michal Tamáš, Zdenko Takáč, Ján Krahulec, Andrej Ficek, Miroslav Gál, és mtsai. 2021. „Mathematical Modeling Based on RT-QPCR Analysis of SARS-CoV-2 in Wastewater as a Tool for Epidemiology”. *Scientific Reports* 11 (1): 19456. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98653-x>.
- KSH 2019: https://nyilvantarto.hu/letoltes/statisztikak/kozerdeku_lakossag_2019.xlsx
- Kulinkina, Alexandra V., Enkhtsetseg Shinee, Bernado Rafael Guzmán Herrador, Karin Nygård, és Oliver Schmoll. 2016. *The Situation of Water-Related Infectious Diseases in the Pan-European Region*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
- La Rosa, G, P. Mancini, G. Bonanno Ferraro, C. Veneri, M. Iaconelli, L. Lucentini, L. Bonadonna, és mtsai. 2021. „Rapid Screening for SARS-CoV-2 Variants of Concern in Clinical and Environmental Samples Using Nested RT-PCR Assays Targeting Key Mutations of the Spike Protein”. *Water Research* 197 (június): 117104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117104>.
- Langeveld, Jeroen, Remy Schilperoort, Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Claudia E.M. Schapendonk, Ewout Fanoy, Evelien I.T. de Schepper, Marion P. G. Koopmans, Miranda de Graaf, és Gertjan Medema. 2021. „Normalisation of SARS-CoV-2

- Concentrations in Wastewater: The Use of Flow, Conductivity and CrAssphage”. Preprint. *Epidemiology*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.30.21266889>.
- LaTurner, Zachary W., David M. Zong, Prashant Kalvapalle, Kiara Reyes Gamas, Austen Terwilliger, Tessa Crosby, Priyanka Ali, és mtsai. 2021. „Evaluating Recovery, Cost, and Throughput of Different Concentration Methods for SARS-CoV-2 Wastewater-Based Epidemiology”. *Water Research* 197 (június): 117043. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117043>.
- Lee, Wei Lin, Maxim Imakaev, Federica Armas, Kyle A. McElroy, Xiaoqiong Gu, Claire Duvallet, Franciscus Chandra, és mtsai. 2021. „Quantitative SARS-CoV-2 Alpha Variant B.1.1.7 Tracking in Wastewater by Allele-Specific RT-QPCR”. *Environmental Science & Technology Letters*, július, acs.estlett.1c00375. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00375>.
- Lemon, Stanley M., Jördis J. Ott, Pierre Van Damme, és Daniel Shouval. 2018. „Type A Viral Hepatitis: A Summary and Update on the Molecular Virology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention”. *Journal of Hepatology* 68 (1): 167–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>.
- Li, Xuan, Shuxin Zhang, Jiahua Shi, Stephen P. Luby, és Guangming Jiang. 2021. „Uncertainties in Estimating SARS-CoV-2 Prevalence by Wastewater-Based Epidemiology”. *Chemical Engineering Journal* 415 (július): 129039. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129039>.
- Maunula, L., S. Kalso, C.-H. Von Bonsdorff, és A. Pönkä. 2004. „Wading Pool Water Contaminated with Both Noroviruses and Astroviruses as the Source of a Gastroenteritis Outbreak”. *Epidemiology and Infection* 132 (4): 737–43. <https://doi.org/10.1017/S0950268804002249>.
- McMahan, Christopher S, Stella Self, Lior Rennert, Corey Kalbaugh, David Kriebel, Duane Graves, Cameron Colby, és mtsai. 2021. „COVID-19 Wastewater Epidemiology: A Model to Estimate Infected Populations”. *The Lancet Planetary Health* 5 (12): e874–81. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00230-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00230-8).
- Medema, Gertjan, Frederic Been, Leo Heijnen, és Susan Petterson. 2020. „Implementation of Environmental Surveillance for SARS-CoV-2 Virus to Support Public Health Decisions: Opportunities and Challenges”. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 17 (október): 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.09.006>.
- Medema, Gertjan, Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Ronald Italiaander, és Anke Brouwer. 2020. „Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands”. *Environmental Science & Technology Letters* 7 (7): 511–16. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- Miura, Fuminari, Masaaki Kitajima, és Ryosuke Omori. 2021. „Duration of SARS-CoV-2 Viral Shedding in Faeces as a Parameter for Wastewater-Based Epidemiology: Re-Analysis of Patient Data Using a Shedding Dynamics Model”. *Science of The Total Environment* 769 (május): 144549. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144549>.
- Mlcochova, Petra, Steven A. Kemp, Mahesh Shanker Dhar, Guido Papa, Bo Meng, Isabella A. T. M. Ferreira, Rawlings Datir, és mtsai. 2021. „SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta Variant Replication and Immune Evasion”. *Nature*, szeptember. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>.
- NNK 2021: Magyarország ivóvízminősége, 2020. https://www.nnk.gov.hu/attachments/article/726/Ivovizminoseg_2020.pdf
- NNK 2020: Magyarország ivóvízminősége, 2018. https://www.nnk.gov.hu/attachments/article/726/Iv%C3%B3v%C3%ADzmin%C5%91s%C3%A9g2018__2020_3.pdf

- Naqvi, Ahmad Abu Turab, Kisa Fatima, Taj Mohammad, Urooj Fatima, Indrakant K. Singh, Archana Singh, Shaikh Muhammad Atif, Gururao Hariprasad, Gulam Mustafa Hasan, és Md. Imtaiyaz Hassan. 2020. „Insights into SARS-CoV-2 Genome, Structure, Evolution, Pathogenesis and Therapies: Structural Genomics Approach”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866 (10): 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>.
- Ortiz-Prado, Esteban, Katherine Simbaña-Rivera, Lenin Gómez- Barreno, Mario Rubio-Neira, Linda P. Guaman, Nikolaos C Kyriakidis, Claire Muslin, és mtsai. 2020. „Clinical, Molecular, and Epidemiological Characterization of the SARS-CoV-2 Virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a Comprehensive Literature Review”. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 98 (1): 115094. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094>.
- Paranthaman, Karthik, Ellen Pringle, Alison Burgess, Neil Macdonald, és James Sedgwick. 2018. „An Unusual Outbreak of Norovirus Associated with a Halloween-Themed Swimming Pool Party in England, 2016”. *Eurosurveillance* 23 (44). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.44.1700773>.
- Patel, Manish M., Aron J. Hall, Jan Vinjé, és Umesh D. Parashar. 2009. „Noroviruses: A Comprehensive Review”. *Journal of Clinical Virology* 44 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>.
- Paula, Vanessa Salete de, Livia Melo Villar, és Ana Maria Coimbra Gaspar. 2003. „Comparison of Four Extraction Methods to Detect Hepatitis A Virus RNA in Serum and Stool Samples”. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7 (2): 135–41. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702003000200007>.
- Peccia, Jordan, Alessandro Zulli, Doug E. Brackney, Nathan D. Grubaugh, Edward H. Kaplan, Arnau Casanovas-Massana, Albert I. Ko, és mtsai. 2020. „Measurement of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Tracks Community Infection Dynamics”. *Nature Biotechnology* 38 (10): 1164–67. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>.
- Pecson, Brian M., Emily Darby, Charles N. Haas, Yamrot M. Amha, Mitchel Bartolo, Richard Danielson, Yeggie Dearborn, és mtsai. 2021. „Reproducibility and Sensitivity of 36 Methods to Quantify the SARS-CoV-2 Genetic Signal in Raw Wastewater: Findings from an Interlaboratory Methods Evaluation in the U.S.” *Environmental Science: Water Research & Technology* 7 (3): 504–20. <https://doi.org/10.1039/D0EW00946F>.
- Philo, Sarah E., Erika K. Keim, Rachael Swanstrom, Angelo Q.W. Ong, Elisabeth A. Burnor, Alexandra L. Kossik, Joanna C. Harrison, és mtsai. 2021. „A Comparison of SARS-CoV-2 Wastewater Concentration Methods for Environmental Surveillance”. *Science of The Total Environment* 760 (március): 144215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144215>.
- Puhach, Olha, Kenneth Adea, Nicolas Hulo, Pascale Sattonnet, Camille Genecand, Anne Iten, Frédérique Jacquéroz Bausch, és mtsai. 2022. „Infectious Viral Load in Unvaccinated and Vaccinated Patients Infected with SARS-CoV-2 WT, Delta and Omicron”. Preprint. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2022.01.10.22269010>.
- Rabaan, Ali A., Shamsah H. Al-Ahmed, Ranjit Sah, Mohammed A. Alqumber, Shafiul Haque, Shailesh Kumar Patel, Mamta Pathak, és mtsai. 2021. „MERS-CoV: Epidemiology, Molecular Dynamics, Therapeutics, and Future Challenges”. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 20 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00414-7>.
- Rambaut A., Loman N., Pybus O., Barclay W., Barrett J, Carabelli A., Connor T., Peacock T., Robertson D. L. & Volz E. 2020: reliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars->

- cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563 (accessed on 30 July 2021)Rockx, Barry, Matty de Wit, Harry Vennema, Jan Vinjé, Erwin de Bruin, Yvonne van Duynhoven, és Marion Koopmans. 2002. „Natural History of Human *Calicivirus* Infection: A Prospective Cohort Study”. *Clinical Infectious Diseases* 35 (3): 246–53. <https://doi.org/10.1086/341408>.
- Salvo, Matías, Ana Moller, Elena Alvareda, Pablo Gamazo, Rodney Colina, és Matías Victoria. 2021. „Evaluation of Low-Cost Viral Concentration Methods in Wastewaters: Implications for SARS-CoV-2 Pandemic Surveillances”. *Journal of Virological Methods* 297 (november): 114249. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114249>.
- Sampathkumar, Priya, Zelalem Temesgen, Thomas F. Smith, és Rodney L. Thompson. 2003. „SARS: Epidemiology, Clinical Presentation, Management, and Infection Control Measures”. *Mayo Clinic Proceedings* 78 (7): 882–90. <https://doi.org/10.4065/78.7.882>.
- Schets, Franciska, Harold van den Berg, Harry Vennema, Manon Pelgrim, Cees Collé, Saskia Rutjes, és Willemijn Lodder. 2018. „Norovirus Outbreak Associated with Swimming in a Recreational Lake Not Influenced by External Human Fecal Sources in The Netherlands, August 2012”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (11): 2550. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112550>.
- Shapiro, Michael, Beny London, Daniel Nigri, Alon Shoss, Eyal Zilber, és Itay Fogel. 2016. „Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Review of the Current Situation in the World”. *Disaster and Military Medicine* 2 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s40696-016-0019-2>.
- Shin, Eui-Cheol, és Sook-Hyang Jeong. 2018. „Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis A”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (9): a031708. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031708>.
- Sims, Natalie, és Barbara Kasprzyk-Hordern. 2020. „Future Perspectives of Wastewater-Based Epidemiology: Monitoring Infectious Disease Spread and Resistance to the Community Level”. *Environment International* 139 (június): 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>.
- Vennema, Harry, Erwin de Bruin, és Marion Koopmans. 2002. „Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction.” *J Clin Virol.* 25 (2): 233–35.
- Vinjé, Jan, Mary K. Estes, Pedro Esteves, Kim Y. Green, Kazuhiko Katayama, Nick J. Knowles, Yvan L’Homme, és mtsai. 2019. „ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae”. *Journal of General Virology* 100 (11): 1469–70. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332>.
- Vokó, Zoltán, Zoltán Kiss, György Surján, Orsolya Surján, Zsófia Barcza, Bernadett Pályi, Eszter Formanek-Balku, és mtsai. 2021. „Nationwide Effectiveness of Five SARS-CoV-2 Vaccines in Hungary—the HUN-VE Study”. *Clinical Microbiology and Infection*, november, S1198743X2100639X. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.11.011>.
- Walsh, Kieran A., Karen Jordan, Barbara Clyne, Daniela Rohde, Linda Drummond, Paula Byrne, Susan Ahern, és mtsai. 2020. „SARS-CoV-2 Detection, Viral Load and Infectivity over the Course of an Infection”. *Journal of Infection* 81 (3): 357–71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.067>.
- Wang, Pengfei, Ryan G. Casner, Manoj S. Nair, Maple Wang, Jian Yu, Gabriele Cerutti, Lihong Liu, és mtsai. 2021. „Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization”. *Cell Host & Microbe* 29 (5): 747-751.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.007>.

- Wang, Pengfei, Manoj S. Nair, Lihong Liu, Sho Iketani, Yang Luo, Yicheng Guo, Maple Wang, és mtsai. 2021. „Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7”. *Nature* 593 (7857): 130–35. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>.
- Weiss, Susan R., és Julian L. Leibowitz. 2011. „Coronavirus Pathogenesis”. In *Advances in Virus Research*, 81:85–164. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>.
- Westhaus, Sandra, Frank-Andreas Weber, Sabrina Schiwy, Volker Linnemann, Markus Brinkmann, Marek Widera, Carola Greve, és mtsai. 2021. „Detection of SARS-CoV-2 in Raw and Treated Wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 Surveillance and Potential Transmission Risks”. *Science of The Total Environment* 751 (január): 141750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>.
- WHO (2020) WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020
Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>, accessed on 13.11.2020
- WHO (2021a) Weekly epidemiological update on COVID-19 - 5 October 2021 <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---5-october-2021>
- WHO (2021b): Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- WHO (2022): Environmental surveillance for SARS-COV-2 to complement public health surveillance Interim Guidance 2022. 04. 14. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HEP-ECH-WSH-2022.1>
- WHO. 2022. „Environmental surveillance for SARS-COV-2 to complement public health surveillance”.
- World Health Organization és United Nations Children’s Fund (UNICEF). 2021. *Progress on Household Drinking Water, Sanitation and Hygiene 2000-2020: Five Years into the SDGs*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345081>.
- Wu, Fuqing, Amy Xiao, Jianbo Zhang, Katya Moniz, Noriko Endo, Federica Armas, Mary Bushman, és mtsai. 2021. „Wastewater Surveillance of SARS-CoV-2 across 40 U.S. States from February to June 2020”. *Water Research* 202 (szeptember): 117400. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117400>.
- Wurtzer, S, V Marechal, Jm Mouchel, Y Maday, R Teyssou, E Richard, JI Almayrac, és L Moulin. 2020. „Evaluation of Lockdown Effect on SARS-CoV-2 Dynamics through Viral Genome Quantification in Waste Water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020”. *Eurosurveillance* 25 (50). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000776>.
- Yaniv, Karin, Eden Ozer, Yair Lewis, és Ariel Kushmaro. 2021. „RT-QPCR Assays for SARS-CoV-2 Variants of Concern in Wastewater Reveals Compromised Vaccination-Induced Immunity”. *Water Research* 207 (december): 117808. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117808>.
- Yezli, Saber, és Jonathan A. Otter. 2011. „Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment”. *Food and Environmental Virology* 3 (1): 1–30. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7>.
- Zheng, Shufa, Jian Fan, Fei Yu, Baihuan Feng, Bin Lou, Qianda Zou, Guoliang Xie, és mtsai. 2020. „Viral Load Dynamics and Disease Severity in Patients Infected with SARS-

CoV-2 in Zhejiang Province, China, January-March 2020: Retrospective Cohort Study”. *BMJ*, április, m1443. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>.

Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, és mtsai. 2020. „A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019”. *New England Journal of Medicine* 382 (8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

12.Függelék

		r^2												
		GC/L, LOD	GC/L Entero norm LOD	vírusterhelés GC	GC/L, LOD log	GC/L Entero norm LOD log	vírusterhelés GC log	GC/L, LOD ₋₁	GC/L Entero norm LOD ₋₁	vírusterhelés GC ₋₁	GC/L, LOD log ₋₁	GC/L Entero norm LOD log ₋₁	vírusterhelés GC log ₋₁	
Békéscsaba	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,42	0,20	0,22	0,57	0,53	0,56	0,60	0,46	0,48	0,67	0,68	0,65	
	új eset +1 hét	0,56	0,26	0,27	0,61	0,57	0,60	0,78	0,59	0,50	0,71	0,72	0,69	
	aktív eset/100.000 fő	0,25	0,14	0,25	0,51	0,48	0,50	0,41	0,35	0,49	0,62	0,64	0,61	
	aktív eset +1 hét	0,42	0,20	0,26	0,59	0,54	0,58	0,64	0,50	0,51	0,71	0,71	0,69	
Budapest D	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,34	0,49	0,00	0,42	0,48	0,43	0,56	0,68	0,00	0,52	0,61	0,52	
	új eset +1 hét	0,36	0,49	0,00	0,44	0,50	0,45	0,70	0,85	0,00	0,55	0,67	0,56	
	aktív eset/100.000 fő	0,26	0,35	0,00	0,38	0,41	0,38	0,48	0,59	0,00	0,48	0,55	0,48	
	aktív eset +1 hét	0,36	0,50	0,00	0,44	0,50	0,44	0,64	0,76	0,00	0,55	0,65	0,55	
Budapest É	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,27	0,16	0,00	0,48	0,43	0,47	0,47	0,32	0,00	0,60	0,57	0,59	
	új eset +1 hét	0,30	0,16	0,00	0,46	0,42	0,45	0,52	0,31	0,00	0,58	0,55	0,58	
	aktív eset/100.000 fő	0,23	0,15	0,00	0,46	0,42	0,45	0,42	0,31	0,00	0,59	0,56	0,58	
	aktív eset +1 hét	0,30	0,16	0,00	0,48	0,44	0,47	0,52	0,33	0,00	0,61	0,58	0,61	
Budapest KP	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,43	0,23	0,00	0,55	0,60	0,51	0,64	0,46	0,00	0,67	0,78	0,64	
	új eset +1 hét	0,47	0,22	0,00	0,53	0,58	0,49	0,72	0,51	0,00	0,66	0,75	0,63	
	aktív eset/100.000 fő	0,33	0,16	0,00	0,52	0,55	0,48	0,54	0,38	0,00	0,65	0,74	0,62	
	aktív eset +1 hét	0,47	0,25	0,00	0,56	0,62	0,52	0,70	0,51	0,00	0,69	0,80	0,66	
Debrecen	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,01	0,05	0,02	0,18	0,21	0,18	0,02	0,13	0,06	0,36	0,40	0,36	
	új eset +1 hét	0,01	0,06	0,02	0,23	0,26	0,23	0,02	0,15	0,04	0,40	0,45	0,40	
	aktív eset/100.000 fő	0,00	0,04	0,02	0,17	0,19	0,17	0,01	0,13	0,07	0,34	0,36	0,33	
	aktív eset +1 hét	0,01	0,06	0,02	0,21	0,25	0,21	0,02	0,15	0,05	0,39	0,43	0,39	
Eger	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,26	0,09	0,34	0,52	0,53	0,51	0,56	0,23	0,51	0,78	0,77	0,77	
	új eset +1 hét	0,24	0,07	0,34	0,53	0,53	0,53	0,45	0,19	0,58	0,76	0,74	0,76	
	aktív eset/100.000 fő	0,29	0,09	0,27	0,51	0,52	0,49	0,53	0,21	0,45	0,72	0,71	0,70	
	aktív eset +1 hét	0,27	0,09	0,38	0,54	0,54	0,53	0,53	0,22	0,56	0,78	0,78	0,78	
Győr	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,37	0,51	0,16	0,48	0,53	0,48	0,54	0,68	0,27	0,59	0,63	0,59	
	új eset +1 hét	0,49	0,57	0,11	0,57	0,59	0,57	0,67	0,75	0,20	0,66	0,67	0,67	

		r^2												
		GC/L, LOD	GC/L Entero norm LOD	vírusterhelés GC	GC/L, LOD log	GC/L Entero norm LOD log	vírusterhelés GC log	GC/L, LOD ₁	GC/L Entero norm LOD ₁	vírusterhelés GC ₁	GC/L, LOD log ₁	GC/L Entero norm LOD log ₁	vírusterhelés GC log ₁	
	aktív eset/100.000 fő	0,26	0,39	0,19	0,42	0,47	0,42	0,39	0,54	0,31	0,50	0,55	0,51	
	aktív eset +1 hét	0,42	0,54	0,14	0,52	0,56	0,53	0,60	0,71	0,25	0,63	0,65	0,64	
Kaposvár	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,60	0,58	0,09	0,54	0,60	0,53	0,87	0,90	0,16	0,65	0,71	0,63	
	új eset +1 hét	0,62	0,49	0,07	0,50	0,54	0,50	0,89	0,78	0,12	0,60	0,64	0,60	
	aktív eset/100.000 fő	0,59	0,59	0,10	0,55	0,62	0,53	0,81	0,90	0,17	0,64	0,73	0,62	
	aktív eset +1 hét	0,62	0,55	0,07	0,53	0,58	0,53	0,91	0,87	0,13	0,64	0,70	0,63	
Kecskemét	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,06	0,05	0,10	0,40	0,40	0,38	0,11	0,09	0,21	0,52	0,56	0,50	
	új eset +1 hét	0,06	0,05	0,08	0,41	0,43	0,39	0,17	0,16	0,18	0,56	0,62	0,53	
	aktív eset/100.000 fő	0,03	0,02	0,13	0,34	0,32	0,33	0,07	0,05	0,24	0,49	0,49	0,46	
	aktív eset +1 hét	0,06	0,06	0,09	0,42	0,43	0,40	0,14	0,13	0,20	0,56	0,60	0,54	
Miskolc	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,19	0,19	0,04	0,27	0,28	0,26	0,33	0,33	0,08	0,43	0,46	0,42	
	új eset +1 hét	0,22	0,24	0,04	0,35	0,39	0,35	0,38	0,42	0,07	0,52	0,58	0,52	
	aktív eset/100.000 fő	0,20	0,20	0,04	0,25	0,25	0,24	0,35	0,32	0,08	0,39	0,39	0,37	
	aktív eset +1 hét	0,23	0,23	0,04	0,32	0,34	0,32	0,41	0,42	0,07	0,50	0,53	0,49	
Nyíregyháza	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,17	0,37	0,05	0,42	0,49	0,41	0,25	0,42	0,09	0,53	0,60	0,52	
	új eset +1 hét	0,24	0,31	0,05	0,46	0,51	0,46	0,32	0,53	0,12	0,57	0,65	0,58	
	aktív eset/100.000 fő	0,14	0,30	0,05	0,40	0,45	0,37	0,20	0,38	0,10	0,51	0,57	0,49	
	aktív eset +1 hét	0,20	0,31	0,05	0,45	0,50	0,44	0,29	0,49	0,11	0,58	0,65	0,57	
Pécs	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,01	0,02	0,03	0,10	0,16	0,10	0,03	0,08	0,09	0,24	0,40	0,25	
	új eset +1 hét	0,01	0,02	0,03	0,17	0,23	0,16	0,01	0,04	0,07	0,27	0,42	0,27	
	aktív eset/100.000 fő	0,02	0,04	0,03	0,09	0,15	0,09	0,04	0,09	0,09	0,20	0,35	0,20	
	aktív eset +1 hét	0,01	0,02	0,04	0,13	0,19	0,13	0,03	0,07	0,08	0,26	0,42	0,26	
Salgótarján	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,21	0,21	0,47	0,57	0,51	0,58	0,54	0,60	0,61	0,75	0,76	0,75	
	új eset +1 hét	0,22	0,28	0,24	0,59	0,59	0,61	0,42	0,46	0,60	0,73	0,74	0,75	
	aktív eset/100.000 fő	0,20	0,24	0,38	0,54	0,52	0,55	0,56	0,57	0,61	0,71	0,69	0,70	
	aktív eset +1 hét	0,25	0,26	0,39	0,59	0,55	0,61	0,53	0,57	0,63	0,78	0,78	0,78	
Szeged	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,42	0,37	0,05	0,55	0,55	0,54	0,65	0,63	0,09	0,70	0,70	0,68	
	új eset +1 hét	0,39	0,33	0,03	0,55	0,53	0,54	0,71	0,67	0,05	0,71	0,72	0,70	

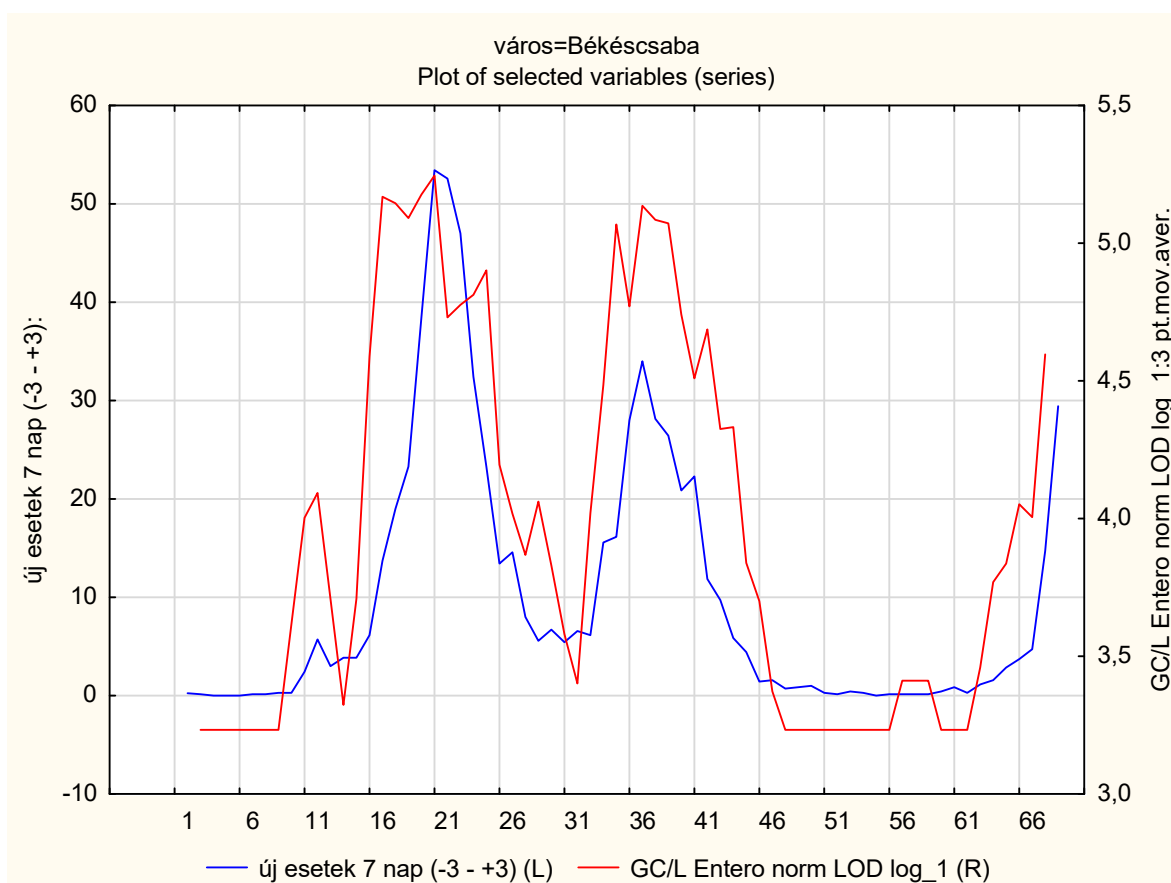
		r^2											
		GC/L, LOD	GC/L Entero norm LOD	vírusterhelés GC	GC/L, LOD log	GC/L Entero norm LOD log	vírusterhelés GC log	GC/L, LOD ₋₁	GC/L Entero norm LOD ₋₁	vírusterhelés GC ₋₁	GC/L, LOD log ₋₁	GC/L Entero norm LOD log ₋₁	vírusterhelés GC log ₋₁
	aktív eset/100.000 fő	0,35	0,32	0,07	0,50	0,49	0,49	0,56	0,55	0,12	0,66	0,65	0,63
	aktív eset +1 hét	0,40	0,35	0,04	0,56	0,55	0,55	0,68	0,67	0,07	0,71	0,72	0,69
Székesfehérvár	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,56	0,41	0,02	0,53	0,57	0,53	0,83	0,73	0,03	0,61	0,68	0,61
	új eset +1 hét	0,61	0,43	0,01	0,55	0,56	0,55	0,86	0,78	0,02	0,63	0,70	0,63
	aktív eset/100.000 fő	0,46	0,31	0,02	0,49	0,51	0,49	0,70	0,59	0,04	0,56	0,62	0,57
	aktív eset +1 hét	0,60	0,44	0,02	0,55	0,58	0,55	0,86	0,78	0,03	0,62	0,70	0,62
Szekszárd	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,24	0,03	0,31	0,45	0,37	0,44	0,42	0,08	0,56	0,60	0,52	0,59
	új eset +1 hét	0,34	0,05	0,25	0,50	0,44	0,49	0,56	0,11	0,45	0,62	0,59	0,62
	aktív eset/100.000 fő	0,18	0,03	0,35	0,42	0,33	0,40	0,38	0,07	0,61	0,60	0,51	0,59
	aktív eset +1 hét	0,30	0,04	0,31	0,50	0,42	0,49	0,50	0,10	0,55	0,64	0,58	0,63
Szolnok	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,20	0,10	0,21	0,45	0,38	0,44	0,35	0,21	0,30	0,62	0,55	0,61
	új eset +1 hét	0,19	0,08	0,20	0,43	0,32	0,43	0,33	0,16	0,27	0,56	0,47	0,56
	aktív eset/100.000 fő	0,16	0,07	0,20	0,45	0,37	0,45	0,36	0,24	0,27	0,63	0,58	0,62
	aktív eset +1 hét	0,23	0,12	0,20	0,46	0,38	0,45	0,37	0,22	0,28	0,60	0,53	0,60
Szombathely	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,39	0,37	0,05	0,45	0,45	0,44	0,63	0,67	0,11	0,63	0,67	0,63
	új eset +1 hét	0,39	0,36	0,07	0,50	0,48	0,49	0,64	0,68	0,14	0,67	0,69	0,67
	aktív eset/100.000 fő	0,31	0,30	0,04	0,37	0,38	0,37	0,56	0,61	0,10	0,57	0,62	0,56
	aktív eset +1 hét	0,38	0,36	0,05	0,48	0,47	0,47	0,62	0,66	0,11	0,64	0,67	0,63
Tatabánya	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,29	0,24	0,04	0,37	0,36	0,37	0,48	0,40	0,09	0,52	0,54	0,53
	új eset +1 hét	0,36	0,33	0,03	0,40	0,40	0,40	0,59	0,56	0,07	0,54	0,58	0,55
	aktív eset/100.000 fő	0,23	0,16	0,05	0,35	0,32	0,36	0,41	0,30	0,10	0,50	0,50	0,51
	aktív eset +1 hét	0,33	0,27	0,04	0,39	0,39	0,40	0,56	0,49	0,08	0,55	0,58	0,56
Veszprém	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,55	0,39	0,29	0,55	0,50	0,54	0,81	0,71	0,49	0,72	0,74	0,72
	új eset +1 hét	0,54	0,34	0,21	0,55	0,45	0,53	0,78	0,61	0,39	0,72	0,70	0,71
	aktív eset/100.000 fő	0,59	0,44	0,32	0,57	0,53	0,56	0,80	0,73	0,52	0,71	0,73	0,71
	aktív eset +1 hét	0,56	0,39	0,25	0,56	0,47	0,54	0,84	0,71	0,46	0,76	0,76	0,75

Zalaegerszeg	új esetek 7 napos átlaga/100.000 fő	0,40	0,34	0,21	0,53	0,51	0,51	0,72	0,67	0,43	0,78	0,77	0,77
	új eset +1 hét	0,52	0,42	0,25	0,61	0,57	0,60	0,79	0,72	0,39	0,77	0,75	0,76
	aktív eset/100.000 fő	0,36	0,29	0,20	0,50	0,49	0,49	0,63	0,58	0,40	0,74	0,72	0,72
	aktív eset +1 hét	0,51	0,43	0,20	0,58	0,56	0,57	0,79	0,72	0,40	0,78	0,77	0,77
_: 3 pontos mozgó átlag (n-1...n+1)				szignifikáns (p<0,05) nem szignifikáns (p>0,05)									

F1. táblázat: A szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma és a COVID-19 esetszámok közötti összefüggés városonként bontásban, a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban

város=Békéscsaba				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7140 R-square= ,5099 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	0,309457101783	3,300370331899	0,093764356925	0,925603648512
1	0,998489038185	0,124447766730	8,023358429181	0,000000000040
2	1,687520974586	3,317541392704	0,508666140021	0,612821143337

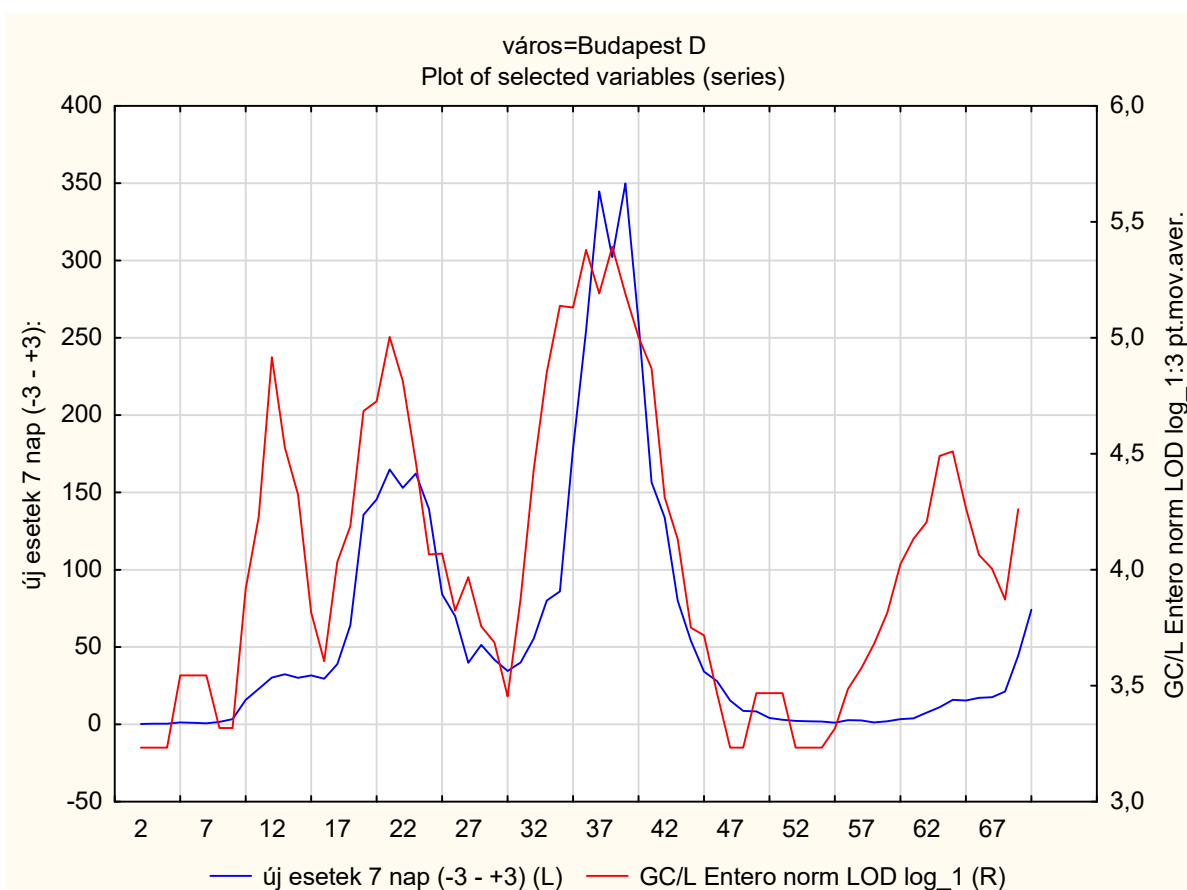
F2. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Békéscsaba esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F1. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Békéscsaba esetében

város=Budapest D				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,6952 R-square= ,4833 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	-0,00000000216	0,000000078129	-0,027700398109	0,977988667438
1	5,99556729536	0,780857988176	7,678178857291	0,000000000130
2	11,99113459289	1,561715966978	7,678178904767	0,000000000130

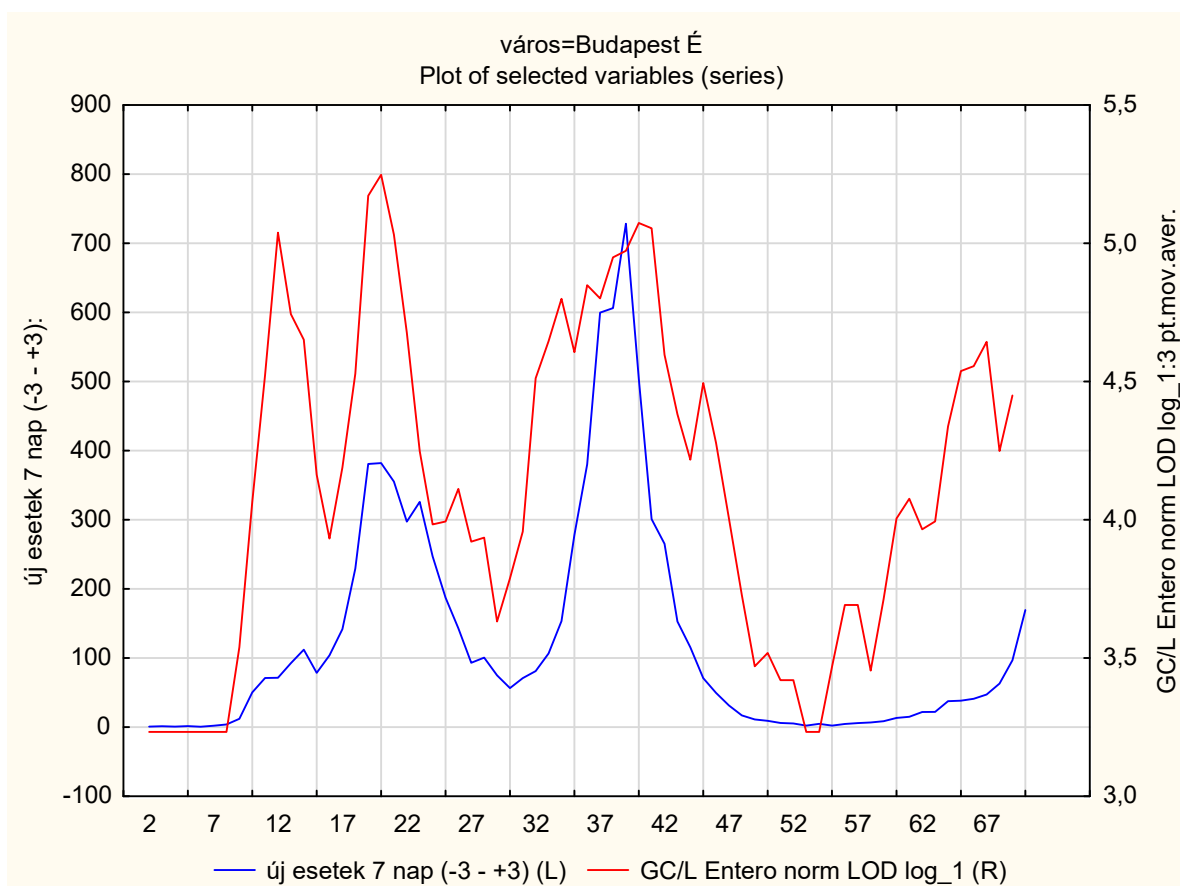
F3. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Budapest déli szennyvíztisztító esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F2. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Budapest déli szennyvíztisztító esetében

város=Budapest É				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,6972 R-square= ,4861 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	-0,00000001865	0,000000154293	-0,120865884781	0,904181927944
1	11,65627936468	1,513477154543	7,701655310549	0,000000000119
2	23,31255874801	3,026954289490	7,701655366569	0,000000000119

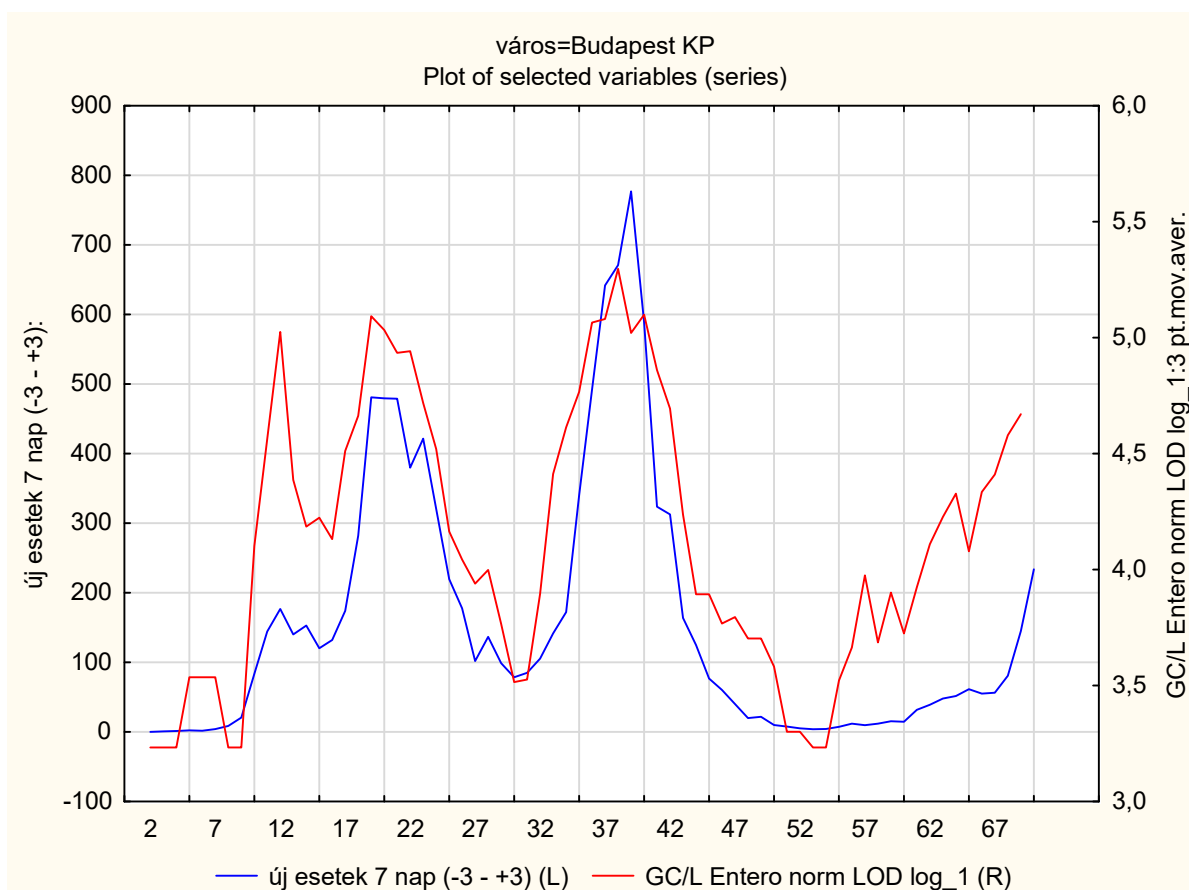
F4. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Budapest északi szennyvíztisztító esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F3. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Budapest északi szennyvíztisztító esetében

város=Budapest KP Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7388 R-square= ,5458 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	-0,00000003158	0,000000171771	-0,183866258284	0,854708902418
1	14,62650966317	1,688721682538	8,661290853553	0,000000000003
2	29,25301935792	3,377443341723	8,661290922794	0,000000000003

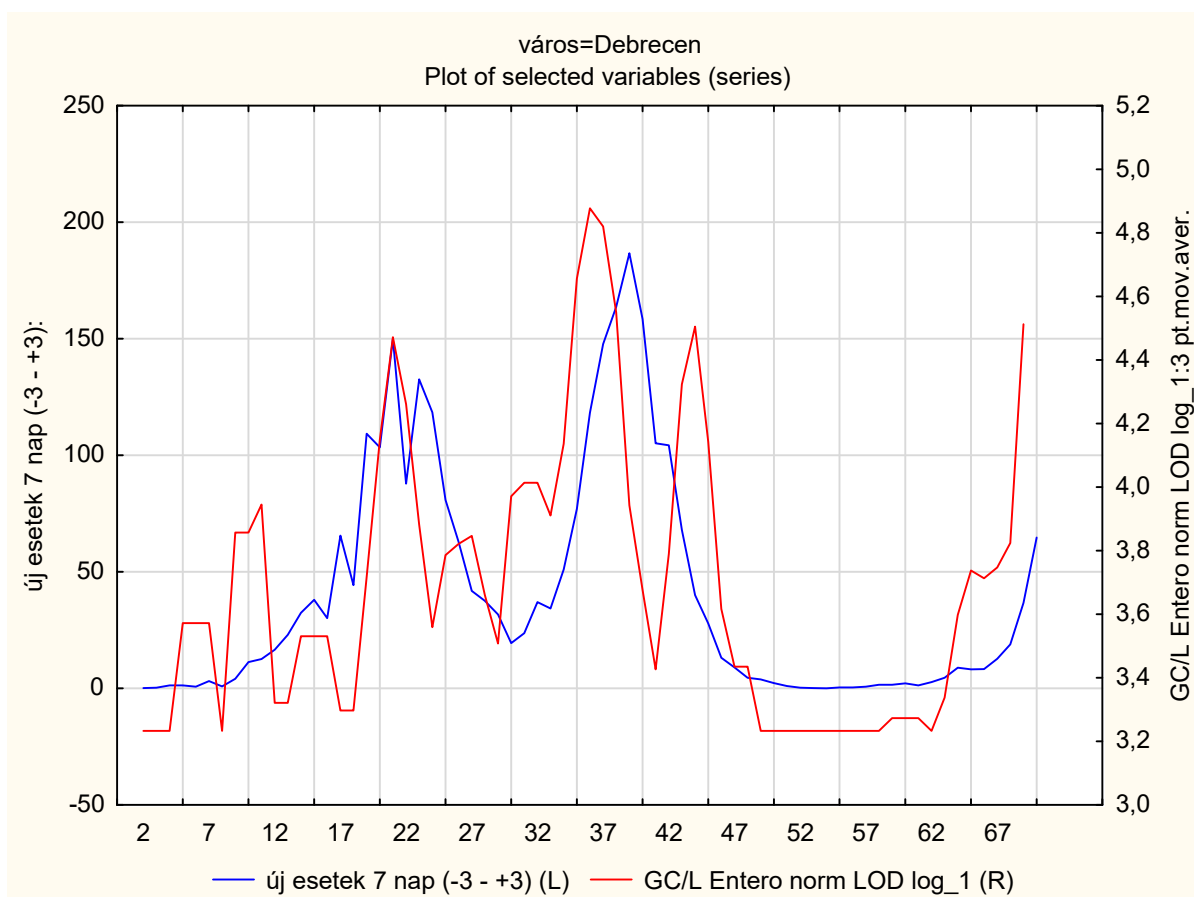
F5. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Budapest központi szennyvíztisztító esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F4. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Budapest központi szennyvíztisztító esetében

város=Debrecen Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7095 R-square= ,5035 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	-0,000000014565	0,000000047038	-0,309647696809	0,757850774516
1	4,123845903282	0,519710984626	7,934883089400	0,000000000046
2	8,247691821128	1,039421962931	7,934883151660	0,000000000046

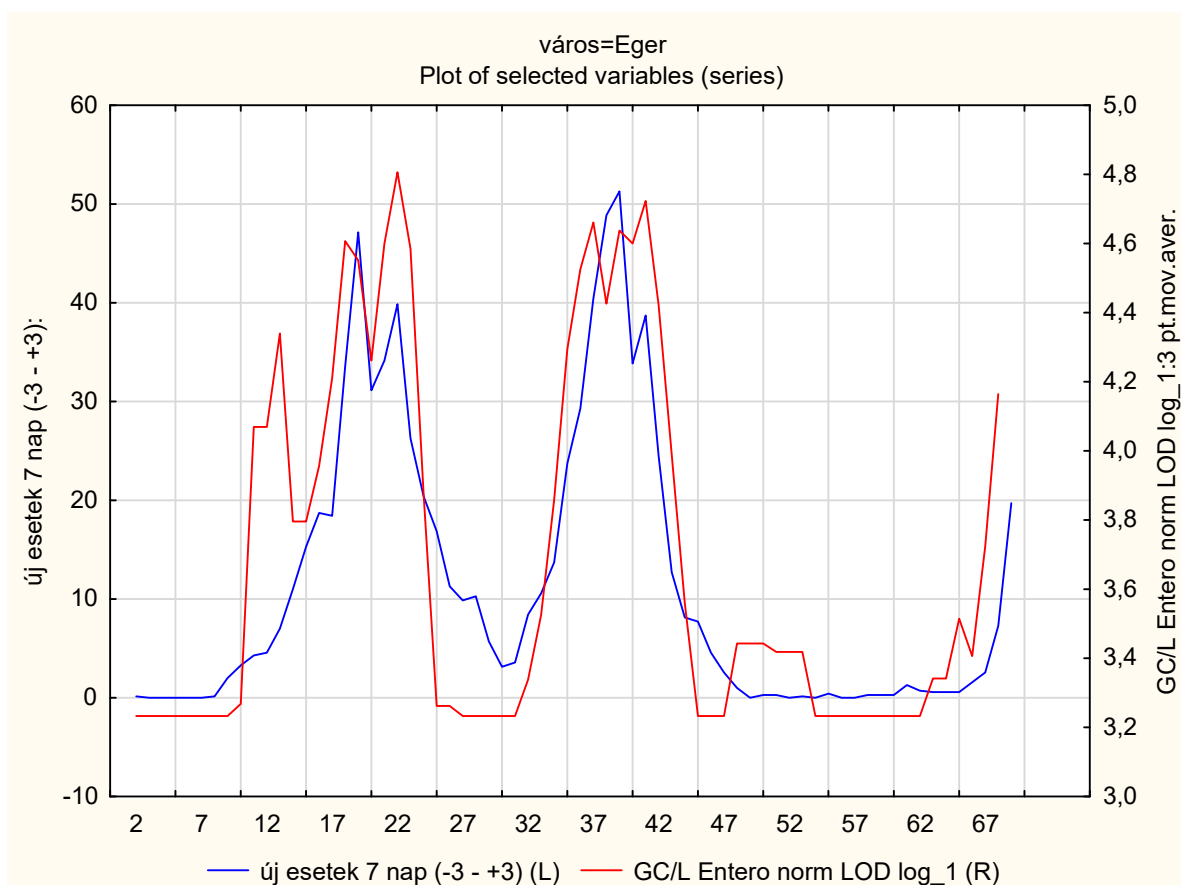
F6. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Debrecen esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F5. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Debrecen esetében

város=Eger Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7244 R-square= ,5247 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	-0,000000005835	0,000000013125	-0,444589053863	0,658164899090
1	1,195086168376	0,145716747529	8,201433182130	0,000000000018
2	2,390172342587	0,291433493366	8,201433249776	0,000000000018

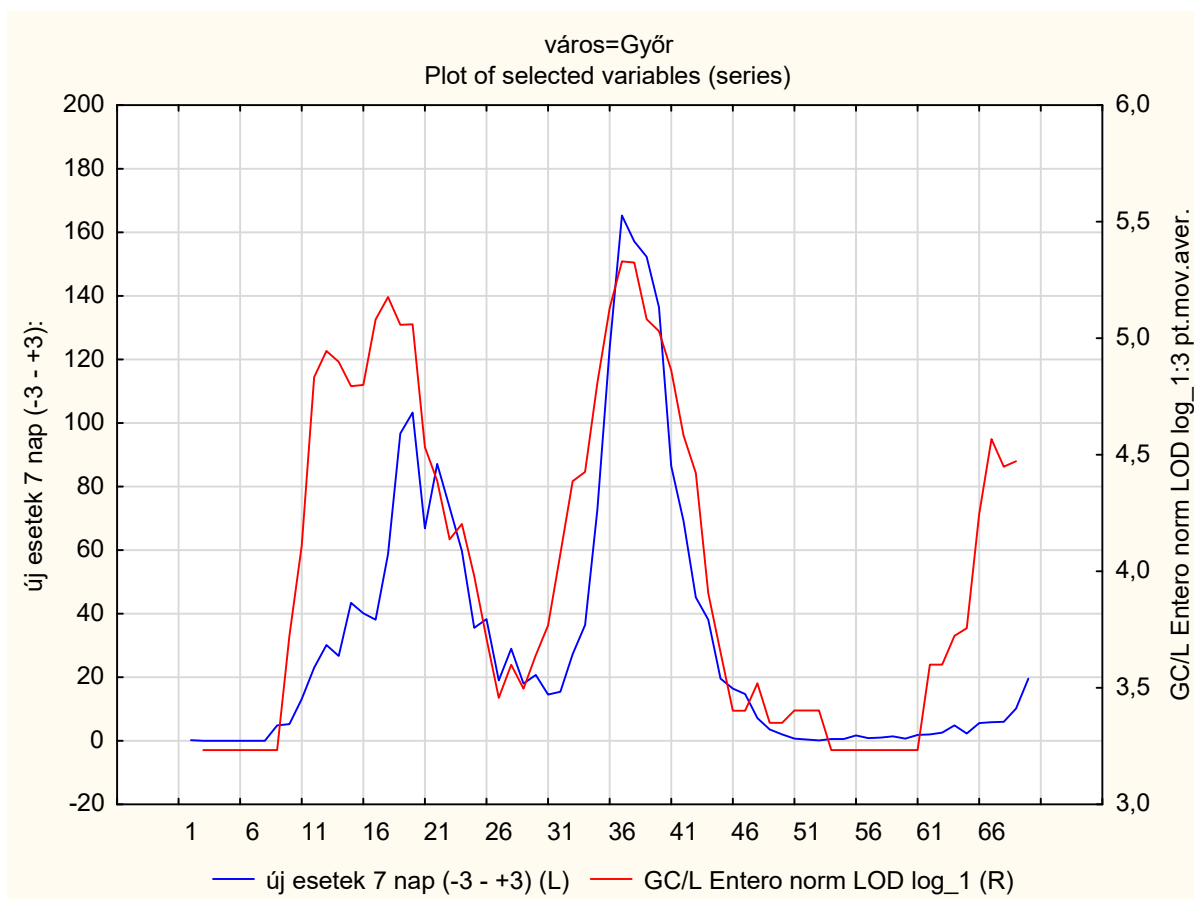
F7. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Eger esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F6. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Eger esetében

város=Győr Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7238 R-square= ,5239 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	-7,13032082504	12,14190558648	-0,587248910334	0,559169143861
1	3,22137698337	0,38694700471	8,325111563428	0,000000000011
2	13,57307479178	12,21306454646	1,111357001360	0,270705910231

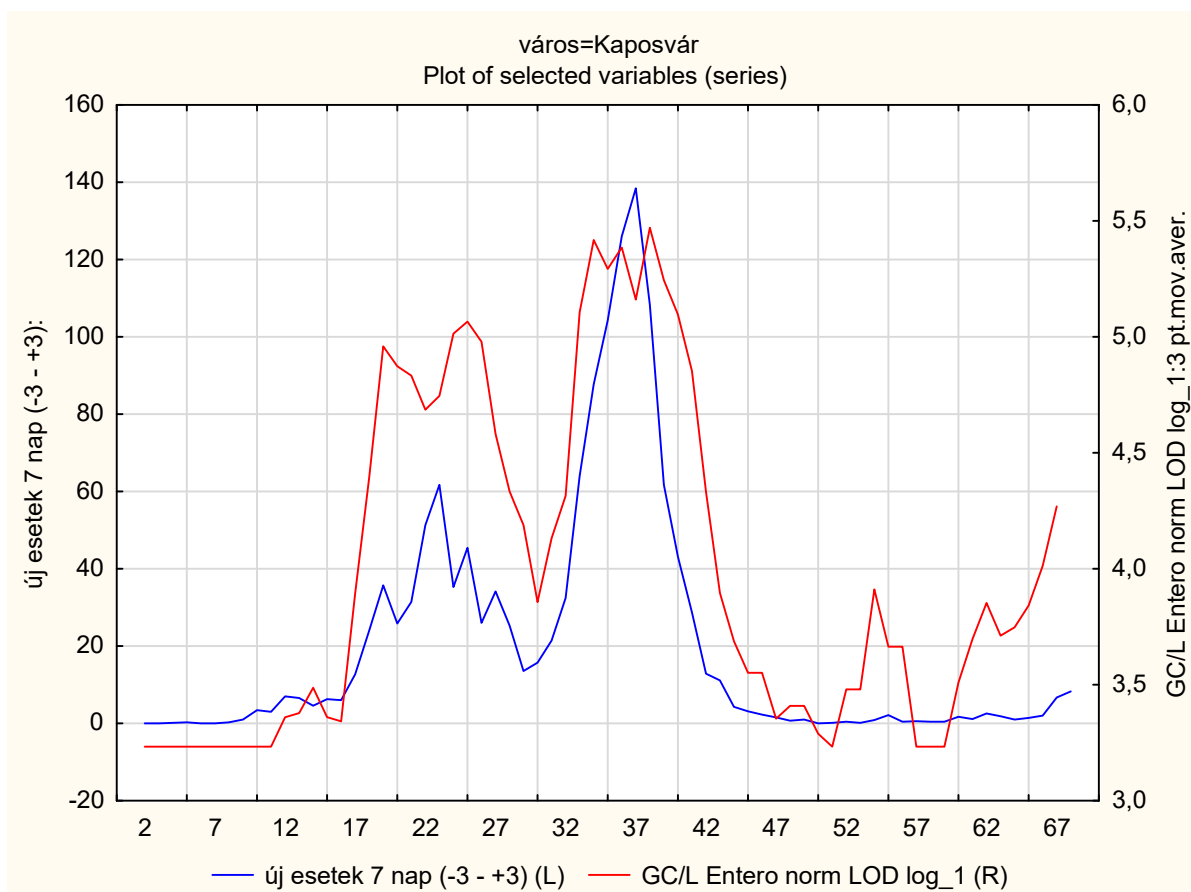
F8. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Győr esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F7. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Győr esetében

város=Kaposvár				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,6594 R-square= ,4348 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	0,000000017417	0,000000029578	0,588844351504	0,558140018652
1	2,090544536787	0,302963277313	6,900323218476	0,000000003437
2	4,181089056158	0,605926550901	6,900323232151	0,000000003437

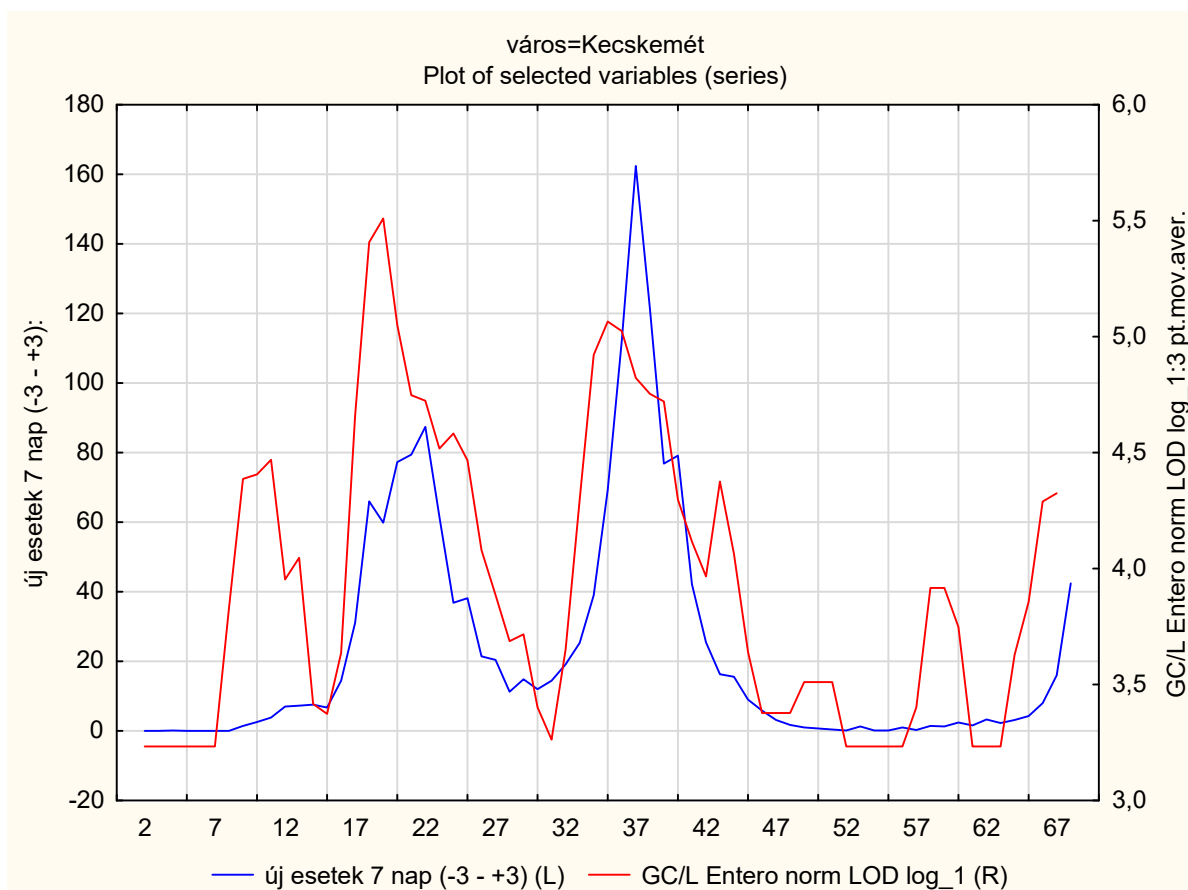
F9. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Kaposvár esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F8. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Kaposvár esetében

város=Kecskemét Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,6781 R-square= ,4598 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	-0,000000011617	0,000000032073	-0,362219150863	0,718440158214
1	2,387812435650	0,334391410412	7,140770849072	0,000000001327
2	4,775624882917	0,668782816509	7,140770912513	0,000000001327

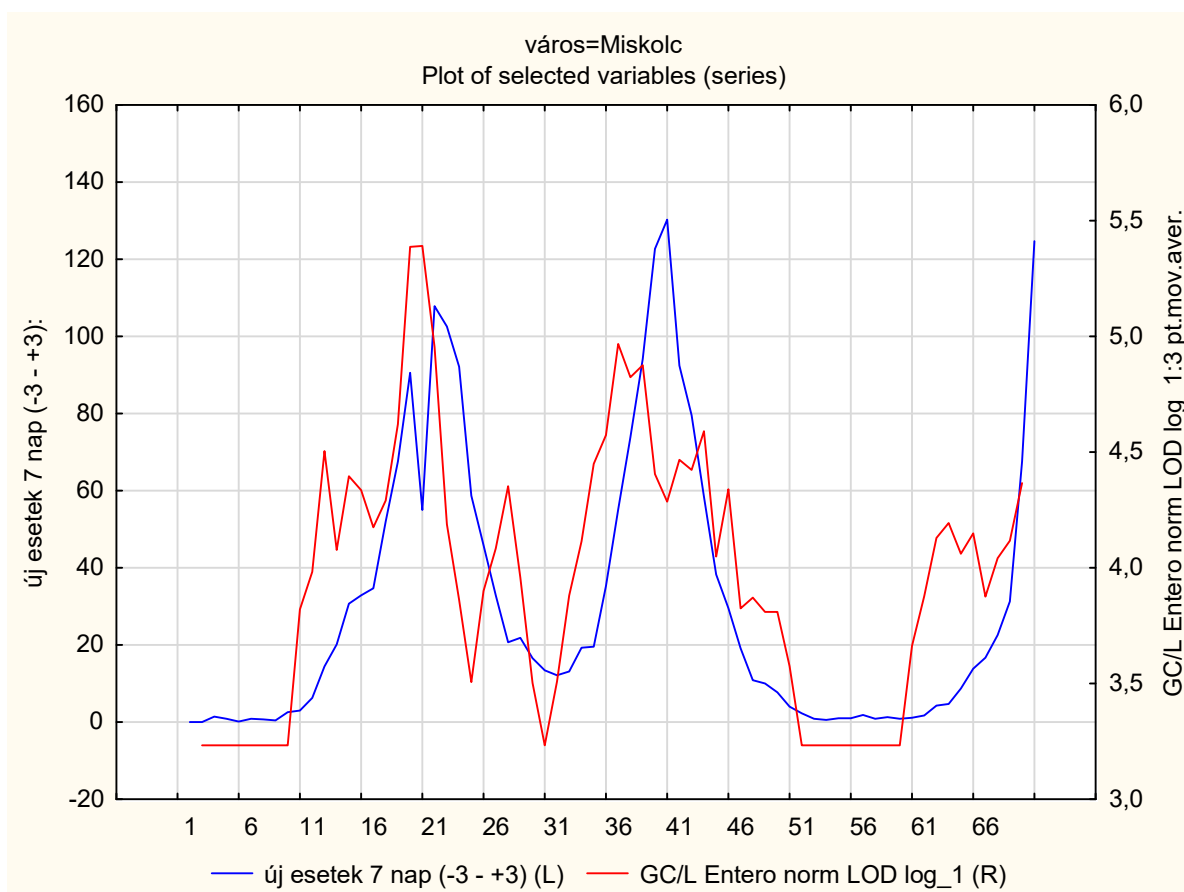
F10. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Kecskemét esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F9. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Kecskemét esetében

város=Miskolc Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7576 R-square= ,5740 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	-13,5175764737	8,510726696537	-1,58829873825	0,117225354860
1	2,8970301098	0,315266929786	9,18913414676	0,000000000000
2	19,3116366934	8,551488454570	2,25827781865	0,027400491443

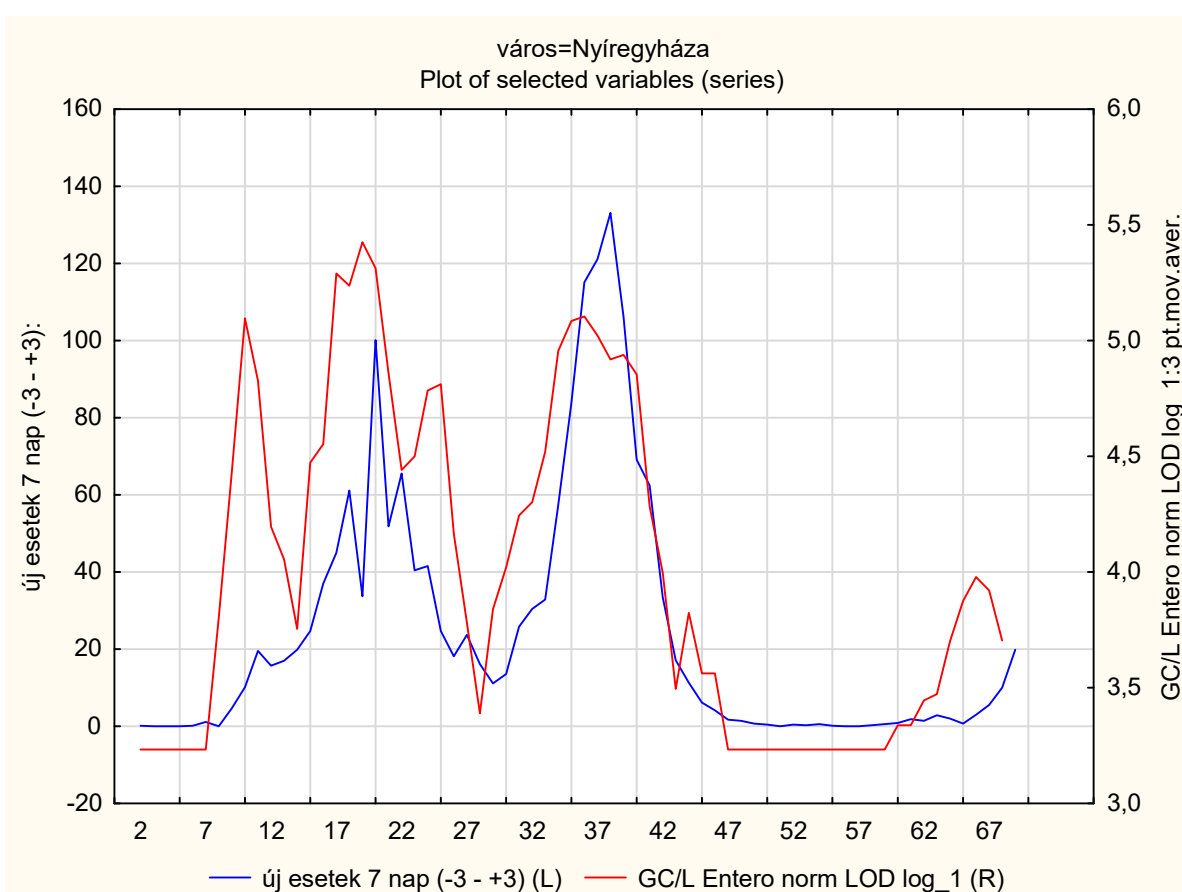
F11. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Miskolc esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F10. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Miskolc esetében

város=Nyíregyháza				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7105 R-square= ,5048 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	0,000000008268	0,000000030080	0,274872998802	0,784327718994
1	2,436096664408	0,305039448685	7,986169247662	0,000000000042
2	4,872193320548	0,610078893847	7,986169280211	0,000000000042

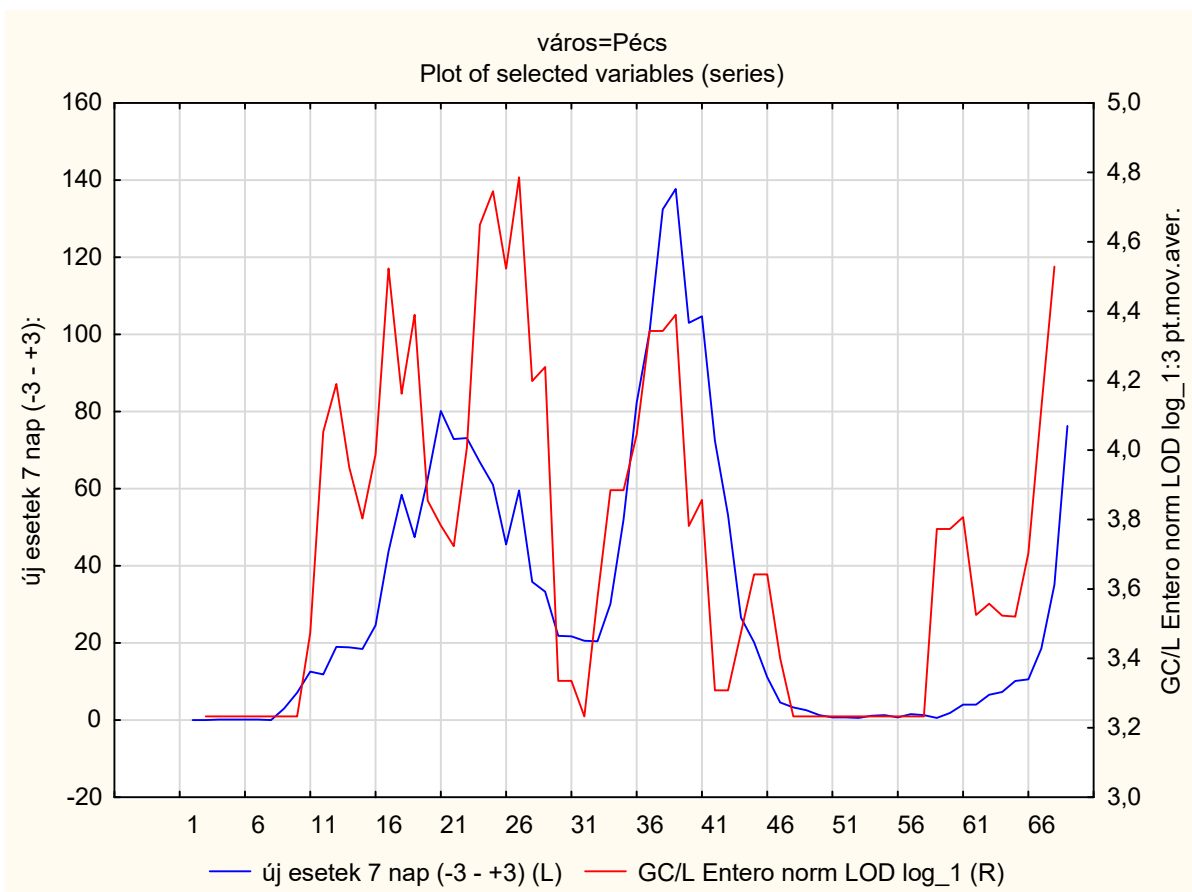
F12. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Nyíregyháza esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F11. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Nyíregyháza esetében

város=Pécs				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7202 R-square= ,5188 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	0,127246582033	10,31247223167	0,012339095725	0,990195343609
1	2,998465756168	0,36729939795	8,163546613233	0,000000000023
2	5,869684930304	10,37629034674	0,565682410010	0,573684709704

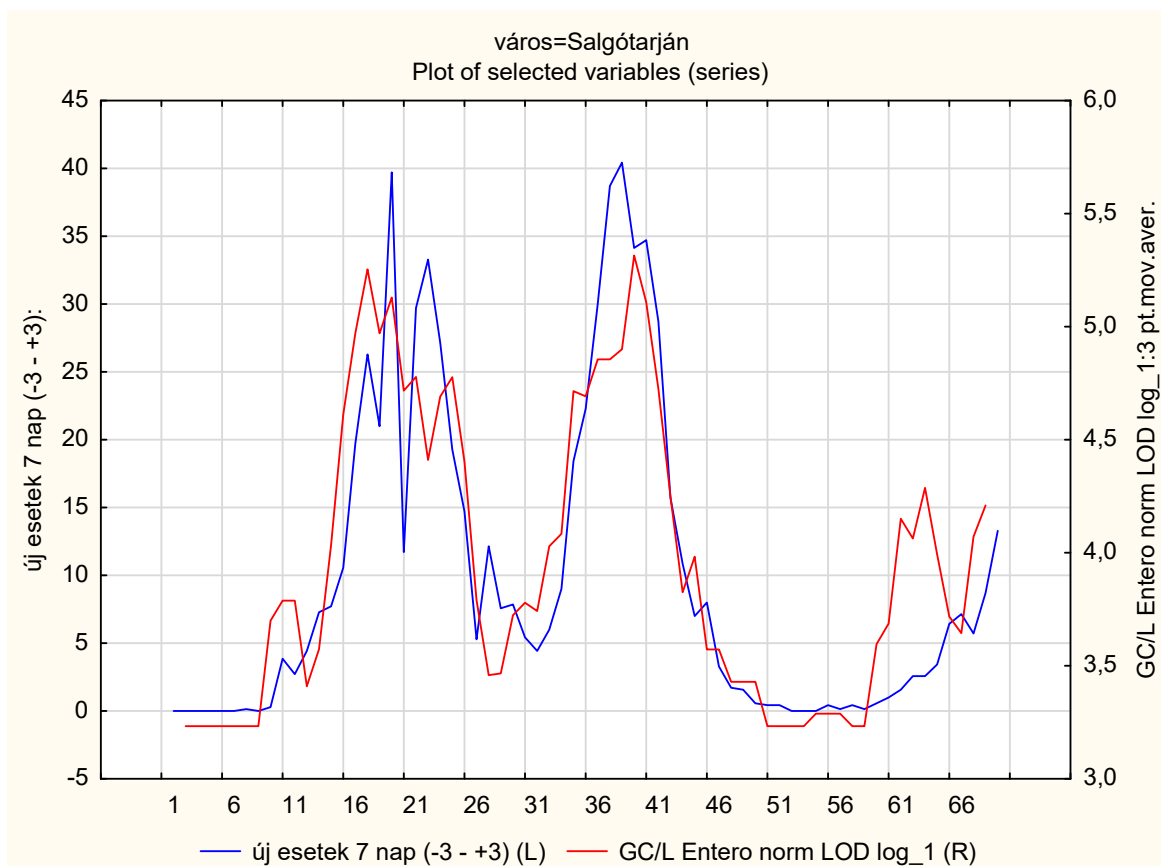
F13. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Pécs esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F12. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Pécs esetében

város=Salgótarján				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7550 R-square= ,5701 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	1,908719539059	3,089882274899	0,617732123507	0,539014365751
1	0,984159352143	0,108156612774	9,099391400151	0,000000000001
2	0,059599165226	3,103080832900	0,019206449472	0,984738089334

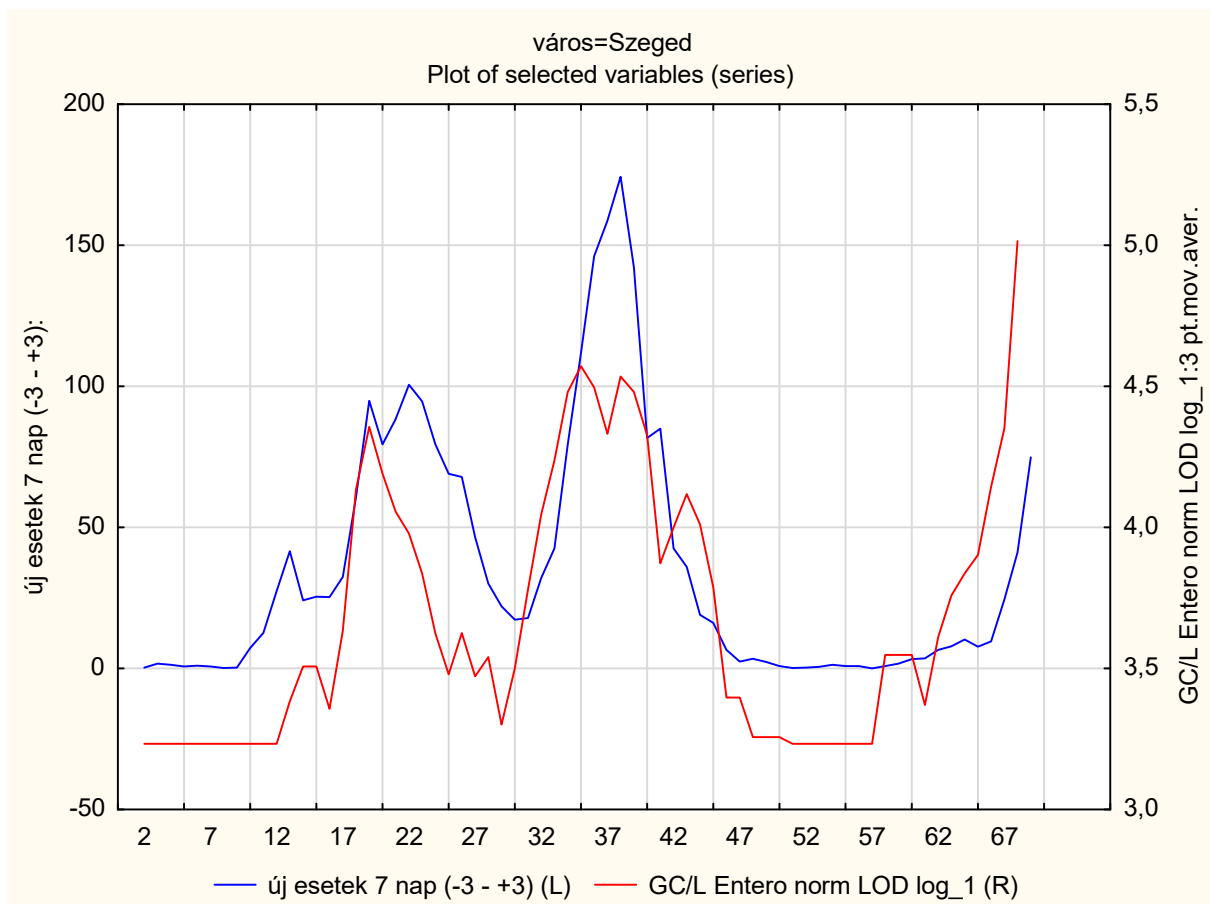
F14. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Salgótarján esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F13. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Salgótarján esetében

város=Szeged				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7200 R-square= ,5183 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	-0,000000024342	0,000000041136	-0,591747131826	0,556171595837
1	3,682699673164	0,458880387071	8,025402211384	0,000000000036
2	7,365399370669	0,917760767848	8,025402292949	0,000000000036

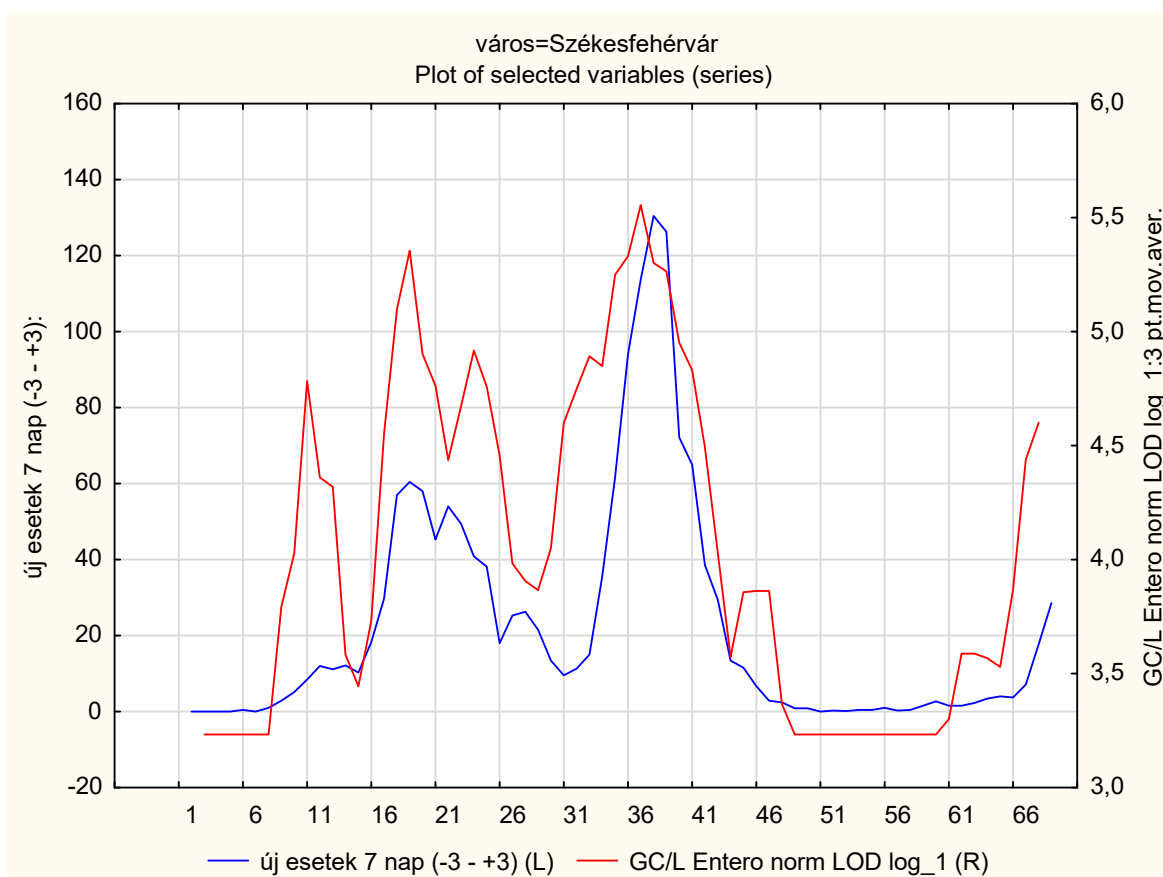
F15. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Szeged esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F14. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Szeged esetében

város=Székesfehérvár Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7089 R-square= ,5025 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	2,149553201203	7,120199884938	0,301895064175	0,763758947264
1	2,247397504085	0,284822123200	7,890529987051	0,000000000068
2	2,345241806967	7,164092231590	0,327360638467	0,744515945690

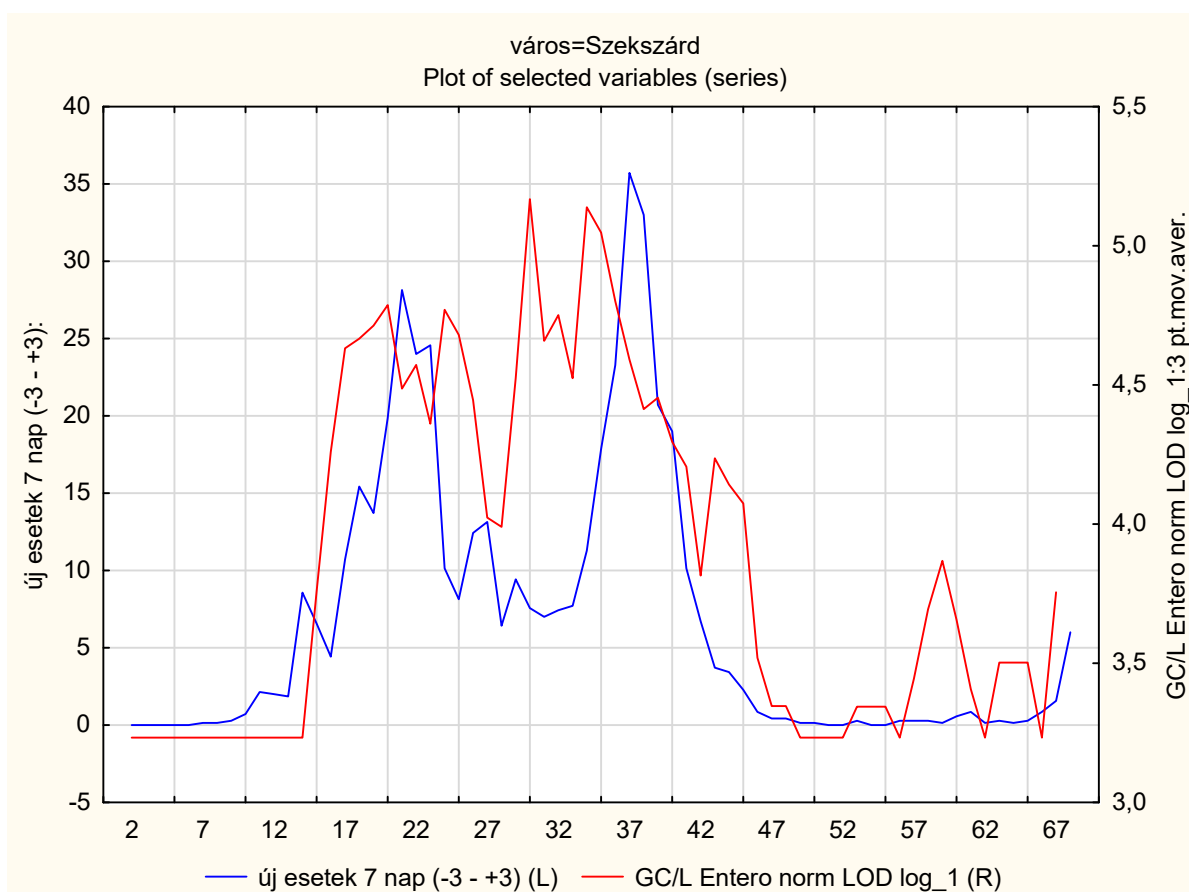
F16. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Székesfehérvár esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F15. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Székesfehérvár esetében

város=Szekszárd				
Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations)				
Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3)				
Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7123 R-square= ,5074 N: 64				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(61)	p
0	0,000000001002	0,000000008152	0,122898748603	0,902591303523
1	0,685045730843	0,086086247093	7,957667501762	0,000000000052
2	1,370091460684	0,172172493307	7,957667536611	0,000000000052

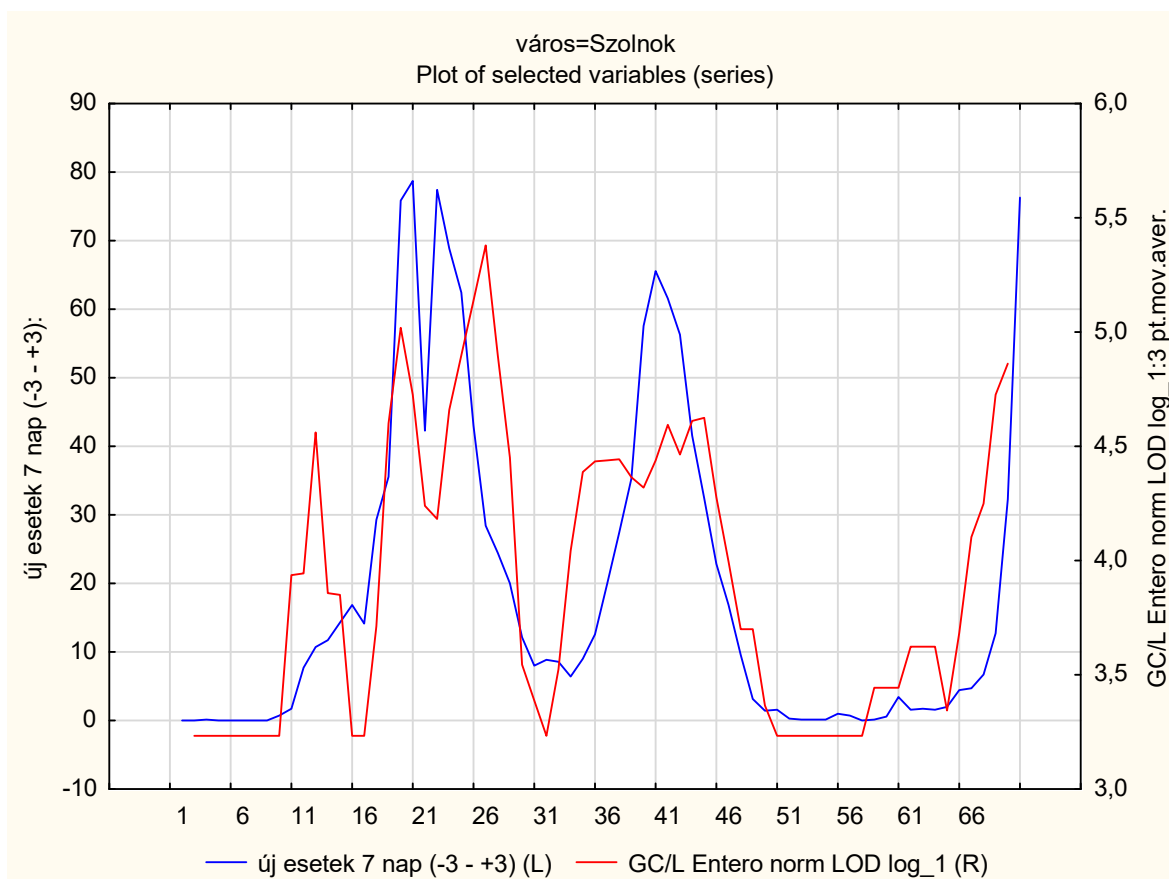
F17. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Szekszárd esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F16. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Szekszárd esetében

város=Szolnok Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7248 R-square= ,5254 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	8,56751003169	4,968459942757	1,72437941141	0,089543145321
1	1,75639470897	0,215759638122	8,14051564164	0,000000000020
2	-5,05472061375	5,008782830184	-1,00917144646	0,316752773133

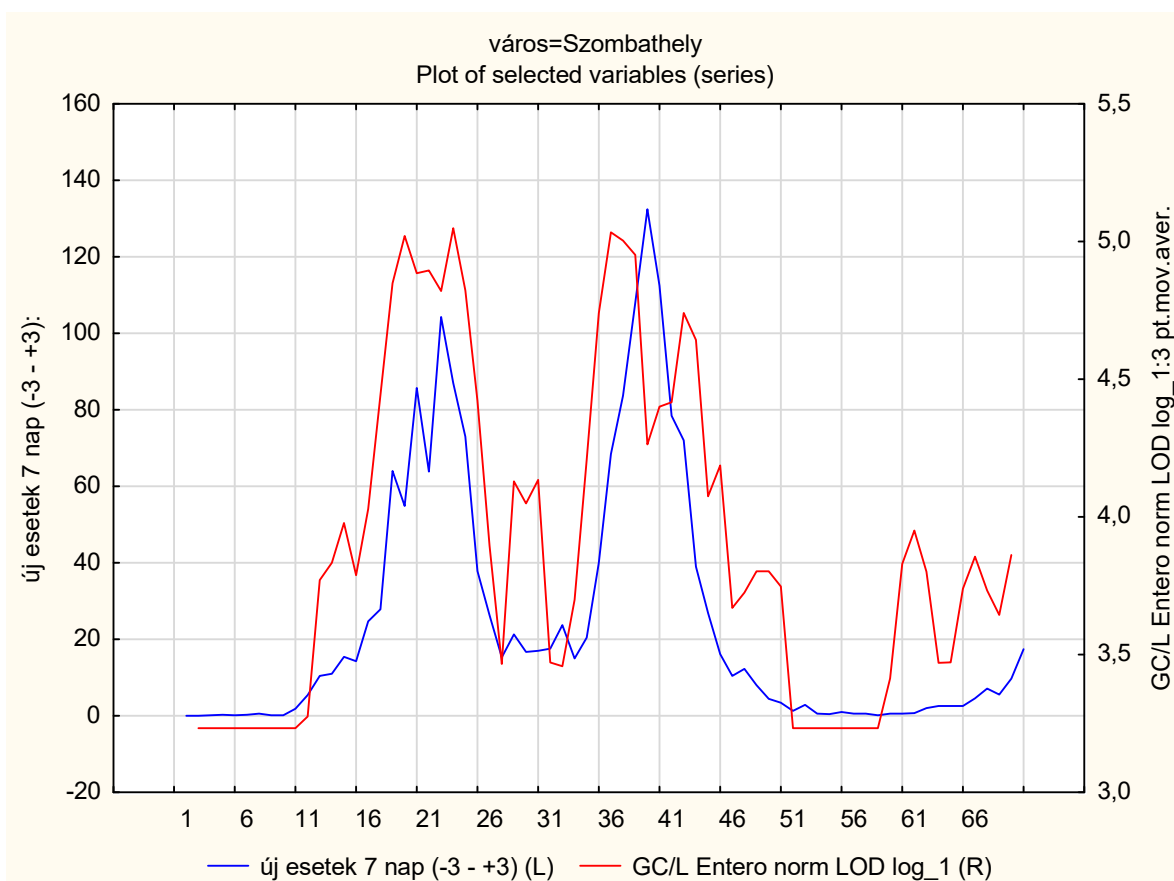
F18. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Szolnok esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F17. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Szolnok esetében

város=Szombathely Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7039 R-square= ,4955 N: 66				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(63)	p
0	2,432819193524	8,864913079940	0,274432379831	0,784650259424
1	2,518407564289	0,317816198475	7,924100710952	0,000000000048
2	2,603995935054	8,885740779334	0,293053331143	0,770444511963

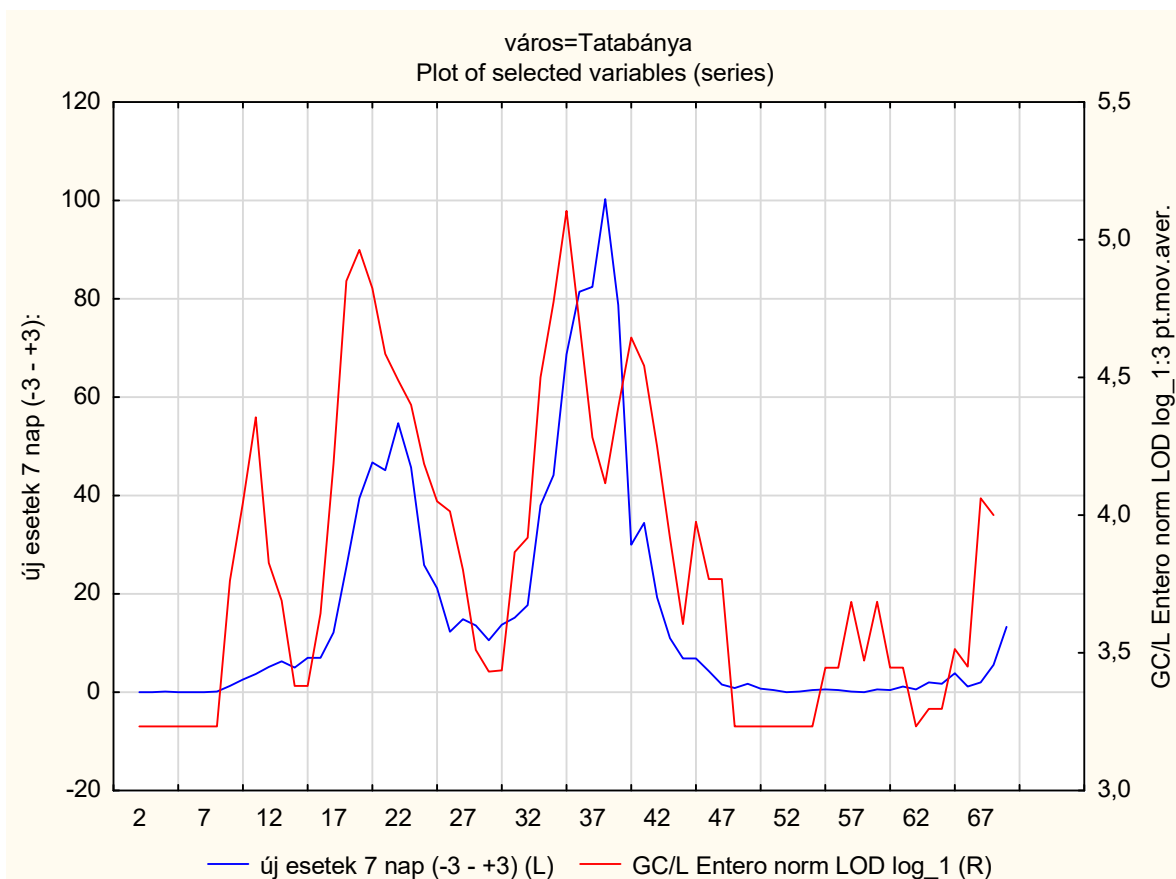
F19. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Szombathely esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F18. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Szombathely esetében

város=Tatabánya Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,6607 R-square= ,4365 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	0,000000006944	0,000000022391	0,310121563231	0,757508568098
1	1,668741244779	0,239762062600	6,959988693298	0,000000002522
2	3,337482482614	0,479524122294	6,959988721004	0,000000002522

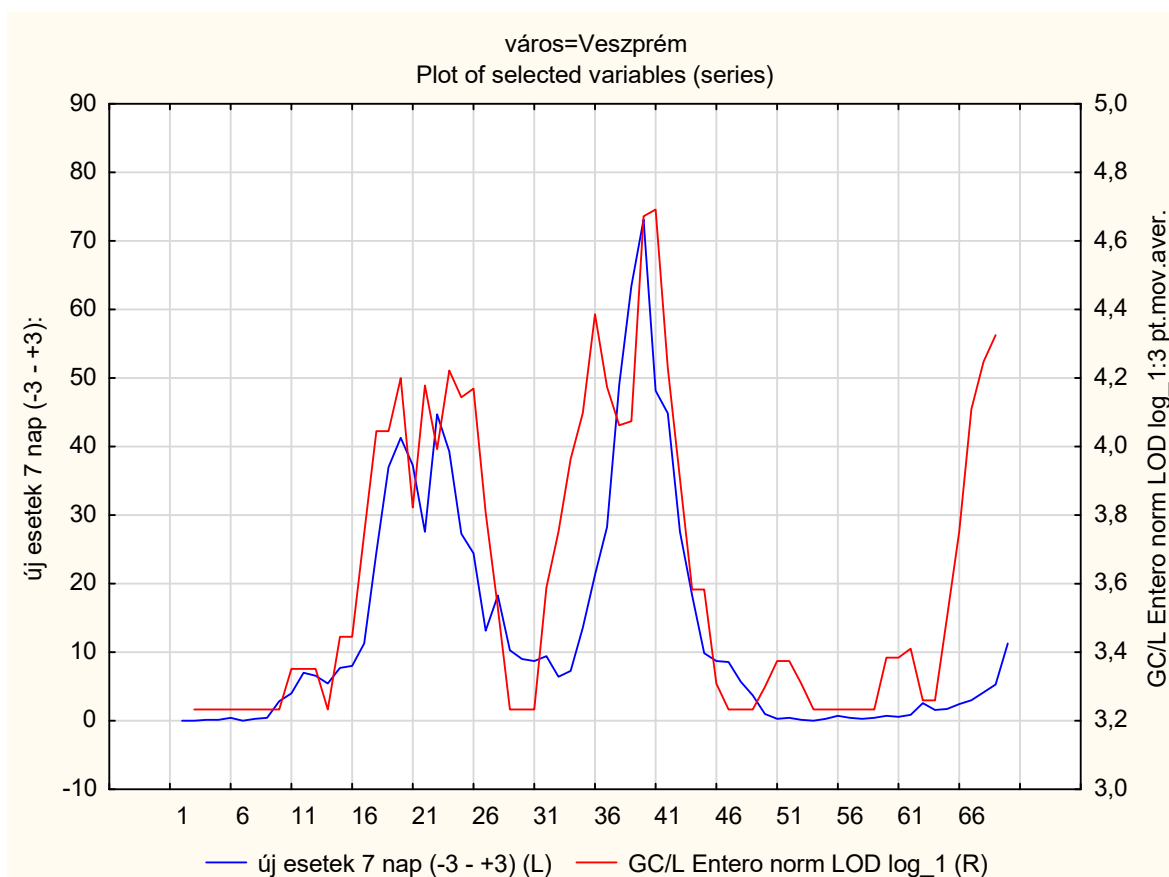
F20. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Tatabánya esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F19. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Tatabánya esetében

város=Veszprém Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,6920 R-square= ,4788 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	2,343523095619	6,534215898461	0,358654065314	0,721072316045
1	1,381805276992	0,183143983247	7,544912218762	0,000000000244
2	0,420087458365	6,574353960664	0,063897907061	0,949257089663

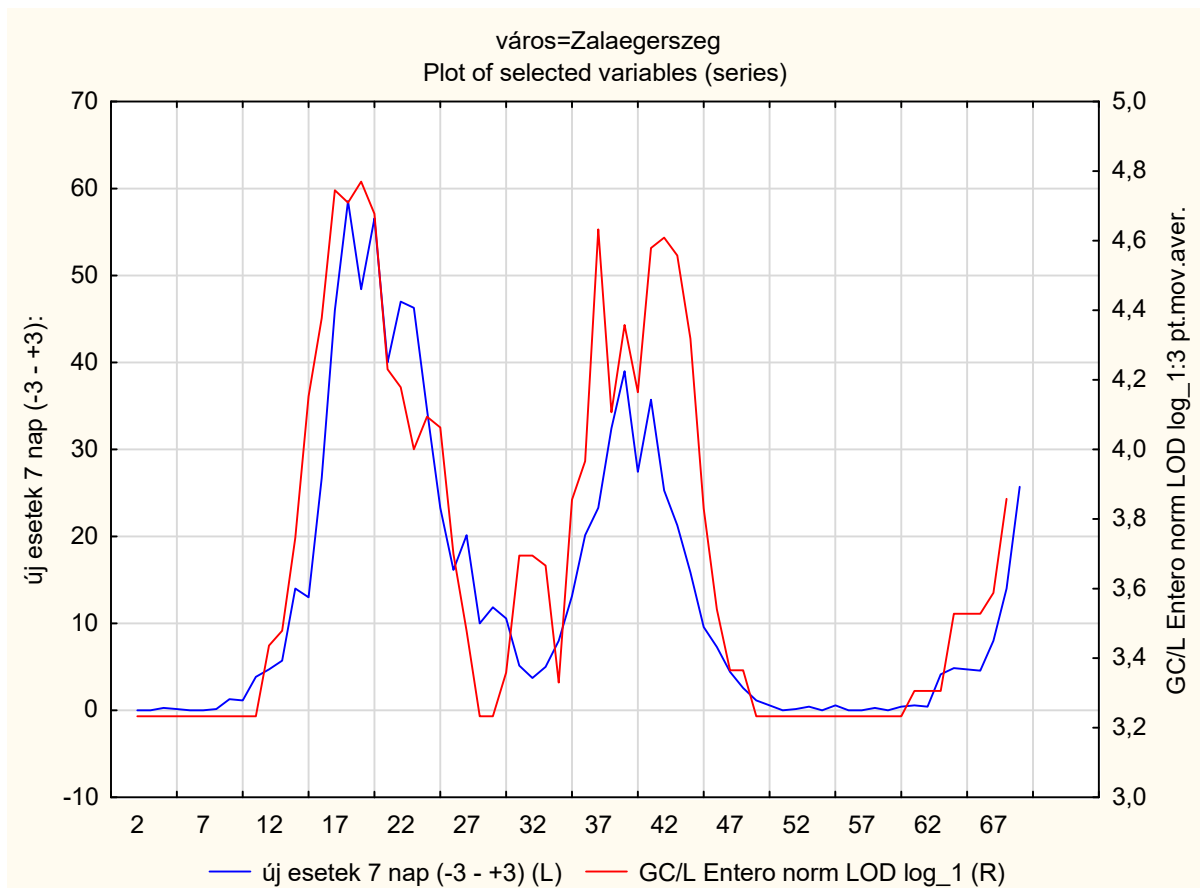
F21. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Veszprém esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F20. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közötti időszakban Veszprém esetében

város=Zalaegerszeg Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (Smoothing Transformations) Indep: GC/L Entero norm LOD log_1: 3 pt.mov.aver Dep: új esetek 7 nap (-3 - +3) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7408 R-square= ,5487 N: 65				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(62)	p
0	-0,000000010354	0,000000014604	-0,708982489184	0,480992883438
1	1,392119796711	0,162430310212	8,570566631876	0,000000000004
2	2,784239603776	0,324860618632	8,570566711030	0,000000000004

F22. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei Zalaegerszeg esetében a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma közötti összefüggés vizsgálata esetében



F21. ábra: a szennyvíz SARS-CoV-2 kópiaszáma (Enterococcusra normalizált, simított) és a szennyvíztelep ellátási területén regisztrált COVID 19 megbetegedések száma a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban Zalaegerszeg esetében

hullám=2 Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságárányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: új esetek 7 napos átlaga (csütörtök) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,8371 R-square= ,7007 N: 24				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(21)	p
0	-705,844098204	654,7933970481	-1,07796459370	0,293276823562
1	166,806612204	23,2742239972	7,16701069063	0,000000457982
2	1039,457322611	660,9186968026	1,57274612996	0,130723713261

F23. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az Enterococcusra normalizált, simított szennyvíz eredmények és az új megbetegedések száma között a második járványhullámban a 2020. július eleje és 2021. október vége közti időszakban

hullám=2 Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságárányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: kórházi ápolásra szoruló heti átlaga Lag: 4 Polyn. order: 1 R= ,8813 R-square= ,7766 N: 22				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(17)	p
0	-1001,15693103	524,1260699089	-1,91014526562	0,073133636391
1	-406,35473963	260,6246521598	-1,55915695719	0,137380411888
2	188,44745176	22,6754202877	8,31064868358	0,000000216447
3	783,24964316	269,2118743176	2,90941714642	0,009765657378
4	1378,05183455	532,7361308177	2,58674370826	0,019198954126

F24. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az Enterococcusra normalizált, simított szennyvíz eredmények és a kórházi kezelésre szoruló száma között a második járványhullámban

hullám=3 Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságárányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: új esetek 7 napos átlaga (csütörtök) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7954 R-square= ,6327 N: 22				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(19)	p
0	2316,69686248	1988,149402914	1,165252902568	0,258337893563
1	248,47548309	42,606925750	5,831809704917	0,000012854536
2	-1819,74589631	1963,571172138	-0,926753214822	0,365677994832

F25. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az Enterococcusra normalizált, simított szennyvíz eredmények és az új megbetegedések száma között a harmadik járványhullámban

hullám=3 Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságárányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: kórházi ápolásra szoruló heti átlaga Lag: 4 Polyn. order: 1 R= ,8817 R-square= ,7774 N: 20				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(15)	p
0	3391,46069039	1192,700442666	2,84351423800	0,012327147032
1	1836,36613839	604,012348959	3,04027912932	0,008265715519
2	281,27158639	35,556234376	7,91061233913	0,000000988620
3	-1273,82296562	576,050631680	-2,21130382567	0,042958060395
4	-2828,91751762	1164,706474208	-2,42886734148	0,028186371862

F26. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az Enterococcusra normalizált, simított szennyvíz eredmények és a kórházi kezelésre szoruló száma között a harmadik járványhullámban

hullám=4 Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságarányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: új esetek 7 napos átlaga (csütörtök) Lag: 2 Polyn. order: 1 R= ,7967 R-square= ,6348 N: 14				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(11)	p
0	2767,98422687	1090,937294774	2,53725327765	0,027614649420
1	-2,66114967	24,250693529	-0,10973499235	0,914595918184
2	-2773,30652621	1132,197451815	-2,44949016778	0,032274961449

F27. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az *Enterococcusra* normalizált, simított szennyvíz eredmények és az új megbetegedések száma között a negyedik járványhullámban

hullám=4 Almon Polyn. Distr.Lags; Regression Coefficients (országos adatok) Indep: szennyvíz lakosságarányos súlyozott átlag (log, simított) Dep: kórházi ápolásra szoruló havi átlaga Lag: 4 Polyn. order: 1 R= ,8384 R-square= ,7029 N: 12				
Lag	Regressn Coeff.	Standard Error	t(7)	p
0	1401,16318868	643,2119751495	2,17838479819	0,065797428606
1	696,13151261	312,9979915956	2,22407661167	0,061506126230
2	-8,90016346	18,4681442466	-0,48191975032	0,644565331548
3	-713,93183954	347,6228326835	-2,05375416231	0,079090918566
4	-1418,96351561	677,8417419249	-2,09335517105	0,074599545882

F28. táblázat: az Almon-féle polinomiális eloszlású késleltetés modell eredményei az *Enterococcusra* normalizált, simított szennyvíz eredmények és a kórházi kezelésre szoruló havi átlaga között a negyedik járványhullámban