

***Cryptosporidium* és *Giardia*, mint vízszennyező patogének Magyarországon**

Plutzer Judit

A doktori értekezés tézisei

ELTE, TTK, Biológia doktori iskola
A doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna

Zootaxonómia, Állatökológia, Hidrobiológia doktori program
A doktori program vezetője: Prof. Dr. Dózsa-Farkas Klára

Témavezető:
Dr. Márialigeti Károly C.Sc (ELTE, Mikrobiológia tanszék, Budapest)

Külső témavezetők:
Dr. Török Tamásné Ph.D (Országos Környezetegészségügyi Intézet, Budapest)
Prof. Dr. Panagiotis Karanis (National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro,
Japán)

Országos Környezetegészségügyi Intézet, Budapest
National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro, Japán

2008

1. Bevezetés

1.1. A *Cryptosporidium* és *Giardia* biológiája

1.1.2. *Cryptosporidium*

A *Cryptosporidium* rendszertanilag az Apicomplexa törzs, Sporozoa osztály, Eucoccidiida rend és Cryptosporidiidae család tagja, ám a legfrissebb biokémiai, genetikai és egyedfejlődési adatok rendszertani kérdéseket vetettek fel, melyek még megoldásra várnak. Jelenleg 17 faja ismert: 2 halakban (*C. molnari*, *C. scophthalmi*), 2 hüllőkben (*C. saurophilum*, *C. serpentis*), 3 madarakban (*C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli*) és 10 emlősökben (*C. parvum*, *C. muris*, *C. hominis*, *C. bovis*, *C. suis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. wairi*, *C. andersoni*) élősökben. Az SSU rRNA alapú molekuláris vizsgálatok alapján megközelítőleg 54 genotípust írtak le, melyek rendszertani helyzete bizonytalan és további vizsgálatokat igényel elhelyezésük. A *Cryptosporidium parvum*ot több szubtípus csoportra különíthetjük el a glikoprotein-60 prekursor fehérjét kódoló DNS szekvencia alapján, melyekből kettő, a IIa és IIb szubtípus csoportok vesznek részt a zoonózisban.

A gazdaszervezetbe jutva a *Cryptosporidium parvum* oocisztából négy fertőzőképes sporozoit szabadul ki epesók és emésztőnedvek hatására, melyek a bél epitelsejtjeinek felszínére tapadnak. A kialakuló trophozoit a fertőzött ileumban az epitelsejt felszínéhez közel, intracellulárisan található, dezmoszómaszerű kapcsolata van a sejtekkel és ezen keresztül veszi fel a gazdasejtől a táplálékot. Ebből alakul ki az 1. típusú meront, melyből 8 merozoit szabadul fel. A merozoitok szétszóródnak, majd a bélfalhoz tapadva 2. típusú meronttá alakulnak. Ezekből 4 merozoit keletkezik, melyekből gametociták fejlődnek. A gametocitákból ostor nélküli makro- és mikrogaméták alakulnak ki. A gaméták összeolvadása után kialakuló vastag falú oociszták a széklettel ürülnek, a vékony falú oocisztából kiszabaduló sporozoitok révén pedig a bélben újabb ciklus indul el.

A kriptosporidiozis a giardiozishoz hasonlóan 2-10 napig tartó erős hasmenést (esetleg hányingert, hányást, fejfájást, izomfájdalmakat, lázat) jelent, előfordulhat kiszáradás és leromlott állapot, elerőtlenedés. Kezelés nélkül spontán gyógyul. A fertőzés immunhiányos betegeknél (AIDS betegek) halált is okozhat. Állatoknál tünetet leginkább akkor okoz, ha az állat fiatal illetve ellenálló képessége lecsökkent (alutápláltság, elválasztás, zsúfoltság, hideg, fröccstej hiánya, egyéb társfertőzések). Tünetmentes oociszta ürítés is lehetséges.

1.1.2. *Giardia*

A *Giardia* egy eukarióta, ostoros, két sejtmagvú egysejtű. Rendszertanilag a Protozoa törzs, Sarcocystophora altörzs, Zoomastigophora osztály, Diplomonadida rend és Hexamitidae család tagja.

Jelenleg 6 fajt ismerjük, melyből 1 kétélűekben (*G. agilis*), 2 madarakban (*G. ardeae*, *G. psittaci*), 1 főként egerekben (*G. muris*) és 1 egerekben, patkányokban (Cricetidae család) (*G. microti*), míg a hatodik faja egyéb emlős gazdáiban élősökben (*G. duodenalis* syn. *G. lamblia* vagy *G. intestinalis*). Ez utóbbi faj genetikailag meglehetősen heterogén: az Assemblage A-t és B-t emberben és emlősökben, az Assemblage C-t és az Assemblage D-t kutyákban, az Assemblage E-t háziállatokban (főképpen szarvasmarháiban), az Assemblage F-et macskákban, az Assemblage G-t pedig patkányokban találták meg. Az A és B genotípusokon belül további szubgenotípusok különíthetők el.

A *Giardia* sejt a fertőzött vékonybél kezdeti szakaszán, epicellulárisan található. Ez a vegetatív alak szívófelületével a bélhámsejtekre tapad. Növekedés, osztódás után

encisztálódik. Ezt a folyamatot az organizmus számára kedvezőtlen körülmények, illetve a gazdaszervezet immunválasza indukálják. Az új szervezetbe került ciszta vegetatív formává alakul és kezdődik a folyamat előlről.

Sárga, bűzös hasmenés, puffadás, hányinger, étvágytalanság, gyengélkedés, esetleg láz, a székletben megjelenő vér a heveny giardiozis velejárója. A tünetek elhúzódhatnak (kezelés nélkül akár 2-3 évig is), fokozódhatnak, enyhülhetnek. A fertőzés krónikus formába is átmehet. A giardiozis harmadik típusa a nagyon enyhe tünetekkel járó illetve tünetmentes forma. Állatoknál fejlődési visszamaradást okozhat, de halálos kimenetelű giardiozistról is beszámoltak már.

1.2. *Cryptosporidium* és *Giardia* előfordulása vízellátókban

A *Cryptosporidium* és *Giardia* fertőzés terjedhet emberről emberre fekál-orál úton, állatról emberre a hordozó állatoktól. A indirekt, vízzel közvetített fertőzésnek kiemelt a jelentősége, mivel fürdőzéskor vagy ivás során a kórokozó közvetlenül a bélcsatornába juthat. A vizek szennyeződését a szennyvizek szabadba vagy fogadóba engedése okozza, illetve a hordozó főként fiatal állatok ürülékéből kerülhetnek a protozoonok cisztái, oocisztái a nyersvízbe. Ennek kockázata az állattartó telepek környékén, tavasszal, az esőzések miatti árvizek idején a legnagyobb, ekkor az újszülött állatok száma is nagy.

Számos tényező hozzájárul a vízeredetű járványok, fertőzések kialakulásához: A *Cryptosporidium* és *Giardia* (oo)ciszták fertőző dózisa kicsi (1-10 ciszta illetve oociszta). A *Cryptosporidium* oociszták mérete csupán 4-6 µm, könnyen átjuthatnak a víztisztítás során a szűrőkön. Az eltávolítás csak koaguláció és mikroszűrés (0,1-5 µm nagyságú részecskék eltávolítása) vagy ultraszűrés (0,1-0,01 µm nagyságú részecskék eltávolítása) alkalmazásával hatékony. Az (oo)ciszták nagyon ellenállóak, mind vízben, mind talajban hetekig életképesek maradnak. Az a fertőtlenítőszer koncentráció, ami baktériumokhoz elegendő, a protozoonokhoz nem, az (oo)ciszták életképtelenné tételéhez különleges eljárás, ózon illetve UV alkalmazása szükséges. Ezek a technológiák a legtöbb kis vízműnél nem találhatók meg.

1.3. Célkitűzés

Ahhoz, hogy a *Giardia* és *Cryptosporidium* vízben való jelenlétének jelentőségét felbecsüljük rendszerszemléletre van szükség: a protozoonok vízből való pontos kimutatása mellett szükség van a vízgyűjtő területek védelmére, a víztisztítás optimalizálására és a tisztított ivóvíz védelmére egészen a fogyasztói felhasználásig.

Munkánk célja,

- hogy bevezessük és rutinszerűen használjuk a modern *Cryptosporidium* oociszta és *Giardia* ciszta kimutatási technikákat: a különböző vízkonzentrálási módszereket (Filta-Max szivacs-szűrés, membránszűrés és flokkuláció), immunomagnetikus szeparációt (IMS), immunofluoreszcensz tesztet (IFT), polimeráz láncreakciót (PCR), Real-time PCR-t, Restriktions Fragmenthossz analízist (RFLP)
- rendszeresen monitorozzuk a budapesti vízellátás nyers vizét, a Dunát Budapestnél, a budapesti ivóvizet a parti szűrés után, valamint a felszíni vízműveket és veszélyeztetett vízbázisokat, különleges időjárási és vízállási adatokat is figyelembe véve
- tanulmányozzuk a víztisztítási technológiákat, és felmérjük azok hatékonyságát a fent említett protozoonok szempontjából

- a PCR termékek szekvencia analízise segítségével meghatározzuk a jelenlevő *Giardia* és *Cryptosporidium* fajokat, genotípusokat és szubgenotípusokat, mely alapján megállapíthatjuk, hogy emberre nézve milyen veszélyt jelentenek
- a szubgenotípus meghatározással a szennyező forrásokat is nyomon kövessük
- felmérést végezzünk a szarvasmarha tartó telepeken, hogy a hígrágya kibocsátás milyen veszélyt jelenthet a környező vizekre és a vízellátásra a fenti protozoonok szempontjából
- a releváns településeken epidemiológiai felmérést végezzünk
- kapcsolatot tartsunk a vízművekkel annak érdekében, hogy az esetlegesen felmerülő protozoon szennyeződési problémákat megoldjuk

2. Anyagok és Módszerek

1. A paraziták vízből történő koncentrálásához speciális Filita-Max szivacs szűrést és Millipore illetve Macherey-Nagel membránszűrést alkalmaztunk, nagy turbiditású vizek esetén pedig kalcium-karbonátos flokkulációt. A szivacs szűrőből illetve a membránszűrőről az (oo)cisztákat foszfátpufferrel mostuk le. Centrifugálással a mintákat tovább koncentráltuk, végül az (oo)cisztákat immunomagnetikus szeparációval (IMS) választottuk el a törmeléktől.
2. A *Cryptosporidium* (oo)ciszták széklethől történő koncentrálásához éter-foszfátpufferes szedimentációt és cukorgradiens centrifugálást végeztünk. A *Giardia* ciszták dúsításához immunomagnetikus szeparációt.
3. A mikroszkópos azonosítás előtt a cisztákat, oocisztákat FITC, DAPI festékekkel festettük.
4. A mikroszkópos vizsgálathoz epifluoreszcensz és differenciál interferencia kontraszt mikroszkópiát használtunk.
5. A *Giardia* GSA 65 nevű fehérje antigén kimutatása székletmintákból a Prospect T *Giardia* microplate assay-el történt a gyártó utasításai szerint.
6. A DNS extrahálást Qiagen Stool kittel és Mini kittel végeztük a gyártó utasításai szerint, 10 olvasztási és fagyasztási ciklus beiktatásával az (oo)ciszták szétroncsolására.
7. Nested illetve seminested PCR módszert alkalmaztunk mindkét protozoon esetében. A PCR targetjei: a *Cryptosporidium* SSU rRNS 850 illetve 435 bp hosszú szakaszai a faj és genotípus meghatározáshoz, a *Cryptosporidium* glikoprotein 60 prekursor fehérjét kódoló gén 850 bp hosszú szakasza a szubgenotípus meghatározáshoz, illetve a *Giardia* 18S rRNS 292 bp hosszú szakasza faj és Assemblage meghatározáshoz és a glutamát-dehidrogenáz (*gdh*) enzimet kódoló gén 432 bp hosszú fragmentje a szubtípusok meghatározáshoz. A keletkezett termékek azonosságát gélelektroforézissel ellenőriztük.
8. *Giardia* Assemblage B specifikus Real-time PCR-hez a trifoszfát-izomeráz enzimet kódoló 141 bp hosszú génszakaszt szaporítottuk fel a Power SyBrGreen PCR Master mix és ABI 7300 Real-time PCR készülék felhasználásával. A keletkezett termék azonosságát olvadáspont analízissel ellenőriztük.
9. Restriktív Fragmenthossz analízist (RFLP) a *Cryptosporidium* 850 bp hosszú SSU rRNS PCR termékeken végeztünk SspI és MboII restriktív enzimek felhasználásával, valamint a 432 bp hosszú *Giardia* *gdh* PCR termékeken NlaIV és RsaI restriktív enzimek felhasználásával. A keletkezett termékeket gélelektroforézissel és Agilent Chip DNS analízissel a Bioanalyser 2100 készüléken végeztük a gyártó utasításai szerint.
10. A PCR termékek tisztítását a Qiagen Gel Extraction Kittel végeztük a gyártó utasításai szerint.
11. A PCR termékek plazmidba ligálása Promega pGEM-T vektor felhasználásával történt a gyártó utasításai szerint, majd a plazmidot transzformáltuk *Escherichia coli* DH5a sejtekbe és a sejteket felszaporítottuk.

12. A plazmid izolálása a felszaporított *Escherichia coli* DH5 α sejtekből a Qiagen Plazmid Mini Kit felhasználásával történt a gyártó utasításai szerint.

13. A plazmidba ligált PCR termék szekvenálása plazmid specifikus primerek (T7 és M16) felhasználásával, a PCR termékek közvetlen szekvenálása a PCR primerek felhasználásával BigDye terminator V.3.1 cycle sequencing kittel ABI Prism 3100 szekvenáló berendezésen történt.

14. A szekvencia elemzéséhez és szerkesztéséhez a Chromas programot, a szekvenciák összehasonlításához a ClustalW programot, filogenetikai fák létrehozásához a www.clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html weboldalt használtuk.

15. Az egyedi illetve reprezentatív szekvenciákat feltöltöttük a génbankba és a génbankból referencia szekvenciákat is felhasználtunk a saját szekvenciák elemzéséhez.

3. Eredmények és következtetések

3.1. *Cryptosporidium* és *Giardia* előfordulása hazai nyers és ivóvizekben: az első országos felmérés eredményei

2000-től 2005-ig 233 vízmintát gyűjtöttünk és vizsgáltunk meg flokkuláció/szűrés, IMS és festés után mikroszkóposan *Giardia* és *Cryptosporidium* protozoonokra (31 nyers vizet, 44 ivóvizet, 87 Duna vizet és 71 parti szűrés utáni vizet). A parti szűrés hatékonyságának ellenőrzése során a Dunában rendszeresen kimutattunk *Giardiát* és *Cryptosporidiumot*, a parti szűrésű kutakból sosem, ami a parti szűrés hatékonyságát jelzi a protozoonok eltávolítása szempontjából. Emellett országos felmérést végeztünk a veszélyeztetett vízbázisoknál: a 16 felszíni vizet feldolgozó vízmű nyers és hálózatra menő vizét vizsgáltuk minimum 2 alkalommal, egy szárazabb és egy esős időszakot kiválasztva, 3 olyan forrást és 3 karszt kutat, ahol a környéken legeltetési állattartás van, és megvan a lehetőség a kontaminációra, 2 mélyfúrású kutat pedig azért mert az egyik esetben az ellátott településen giardiozis járvány volt, a másik esetben a bakteriológiai eredmények kontaminációt jeleztek. Az eredmények alapján 2 forrásban tudtunk kimutatni *Giardiát* és *Cryptosporidiumot* (2 *Giardia* ciszta/100 L, 4 *Cryptosporidium* oociszta és 3,5 *Giardia* ciszta/100 L). 10 vízmű nyers vizét találtuk szennyezettnek mindkét protozoával (5-50 *Cryptosporidium* oociszta/100 L és 0,3-1030 *Giardia* ciszta/100 L), 8 vízmű ivóvizében tudtunk azonosítani *Giardiát* (0,2-63,6 ciszta/100 L) és *Cryptosporidiumot* (0,1-3 oociszta/100 L). A magasabb ciszta és oociszta előfordulás összefüggésben van a kommunális szennyvíz befogadókkal, illetve erdős, vadakban gazdag területekkel.

3.2. *Cryptosporidium* és *Giardia* kimutatása és molekuláris analízise magyarországi nyers, felszíni és szennyvizekben

16 nyersvíz mintát gyűjtöttünk molekuláris vizsgálatra a felszíni vízműveinkből (Duna, Tisza, Keleti főcsatorna, Lázberc, Komravölgy, Köszörűvölgy, Hasznos, Csórrét, Mátrafüred, füzéri Nagy-patak, Bódva folyó Sajóecsegnél és Borsodsziráknál), valamint 20 vízmintát, szintén molekuláris vizsgálatra, olyan felszíni vizekből és szennyvizekből, melyek hatással lehetnek az ivóvíznyerő helyek szennyezettségére, ezek: Balatonba ömlő kisvízfolyások, árkok (balatonfüredi Kéki- patak, keszthelyi Büdös-árok, balatonfüzfői Séd, ábrahámhegyi Burnót-patak, vörösberényi Séd, Keleti-Bozót), balatoni szennyvíztisztítók (Zánka, Keszthely, Balatonújlak, Révfülöp), a tassi parti szűrésű kutak felett közvetlenül a Dunába ömlő rácalmási szennyvíz, a dunaújvárosi ivóvízkivétel felett 1 km-re a dunaújvárosi kommunális szennyvíz, budapesti szennyvíz, a szolnoki vízkivétel felett a Tiszába ömlő tiszadorogmai

szennyvíz, a lázbérci vízkivételről 16 km-re, a Bán-patakba (Lázbérc) ömlő szilvásvárad szennyvíz és a sajóecsegi vízkivételről 10 km-re, a borsodsziráki vízkivételről 5 km-re a Bódvába ömlő edelényi szennyvíz. Az összesen 36 mintából a protozoon koncentráció után a minták feléből festés után mikroszkópos azonosítást végeztünk, majd a minták második feléből DNS extrahálás után a *Cryptosporidium* és *Giardia* SSU rRNS gén egy szakaszát szaporítottuk fel külön PCR reakcióban. A PCR termékeket szekvenáltuk, majd a kapott szekvencia analízise során állapítottuk meg a jelenlevő *Giardia* illetve *Cryptosporidium* fajt illetve genotípust. *Giardia* esetében a szubtypusok meghatározására a glutamát dehidrogenáz kódoló PCR termékeket is analizáltuk. A 36 mintából 24 (67%) volt *Giardia* pozitív és 15 (42%) *Cryptosporidium* pozitív az IFT-vel. PCR-rel 13 minta (36%) volt *Giardia* pozitív és 10 minta (28%) *Cryptosporidium* pozitív. 12 *Giardia* és 2 *Cryptosporidium* PCR terméket tudtunk szekvenálni. 7 mintában *G. duodenalis* Assemblage A, 1 mintában Assemblage B, 4 esetben A és B Assemblage is kimutatható volt. 1 mintában *C. parvum*ot és egy másik mintában *C. meleagridis*t mutattunk ki. A szekvencia analízis alapján egy a Balatonba ömlő kisvízfolyásban (Séd) új szubtypust azonosítottunk a *G. duodenalis* komplexen belül, mely a *gdh* filogenetikai analízis alapján az Assemblage A csoporthoz mutatott a legnagyobb hasonlóságot. Mindegyik megtalált faj humán patogén. A molekuláris analízis alapján a szennyvizek hatása az ivóvíznyerő helyekre jól nyomon követhető. Néhány helyen a szennyezés forrása ismeretlen.

3.3. Hasmenéses borjából izolált *Cryptosporidium* genotípus és szubgenotípus analízise

Magyarországon a közegészségügyi parazitológiai laboratóriumokban és egyes kórházak mikrobiológiai laboratóriumaiban folynak széklet parazitológiai vizsgálatok. A *G. duodenalis* vonatkozásában a prevalencia az egyes megyékben meglehetősen egyenlőtlen, és előfordulása hazánkban mind a beteganyagban (székletminták), mind a vizekben jóval gyakoribbnak tűnik, mint a *Cryptosporidium*é, ám bár lehetséges, hogy a *Cryptosporidium* által megbetegedettek jelentős része rövid ideig tartó, magától gyógyuló hasmenésben szenved, amellyel nem fordul orvoshoz. Hazai állatorvosi felmérések és irodalmi adatok alapján a hasmenéses borjak nagy szerepet játszanak a kriptosporidiózis terjesztésében. Előző vizsgálataink *Cryptosporidium* oociszták és *C. parvum* jelenlétét is igazolták a vizekben. Annak kiderítésére, hogy hazánkban lehet-e szerepe az állattartó telepeknek, tehenészeteknek a vízszennyezésben, és azon keresztül az emberi megbetegedésekben, 2006-ban 79 hasmenéses borjú székletmintát gyűjtöttünk 52 állattartó telepről, különböző megyékből. Oociszta dúsítás és mikroszkópos oociszta azonosítás után a pozitív mintákat molekuláris analízisnek vetettük alá. Elsőként felszaporítottuk PCR-rel az SSU rRNS gén egy szakaszát és RFLP analízissel faj és genotípus meghatározást, majd a glikoprotein 60 génszakasz amplifikálása után szekvencia és filogenetikai analízist végeztünk. 21 mintában *Cryptosporidium parvum*ot, 1 mintában *Cryptosporidium deer-like* genotípust tudtunk azonosítani. A 21 *C. parvum* izolátumból IIA A16G1R1 szubgenotípust találtuk a minták 70%-ában. IIA A17G1R1 szubgenotípus 3 esetben, IIA A22G1 és IIA A19G1 szubgenotípusok 1-1 esetben voltak kimutathatók, továbbá egy új IIA A18G1R1 szubgenotípust is azonosítottunk. A fenti szubgenotípusok közül hármat emberi székletből is azonosítottak Európában, ami igazolja azt a feltételezést, hogy a *Cryptosporidium* IIA és IID csoportba tartozó szubgenotípusok vesznek részt a zoonózisban.

3.4. *Giardia* epidemiológiai felmérés két településen

Az epidemiológiai felmérés célja a *Giardiával* fertőzött ivóvíz fogyasztása és az aszimptomatikus giardiozis kialakulása közötti lehetséges kapcsolat kimutatása volt. A

felmérésben 3 település vett részt. Közülük kettő, Füzér és Mátrafüred nyers- ill. ivóvíze a szabványos USEPA 1623 módszerrel végzett korábbi vizsgálatok során pozitívnak bizonyult mindkét protozoonra. Budapest szolgált kontrollként, mivel ennek ivóvizében a rutin vízminőség vizsgálatok soha nem mutatták ki a protozoonok jelenlétét.

A vizsgálat céljaira a három település állandó lakosaitól 100-100 székletmintát gyűjtöttünk. A mintaadással egyidőben a vizsgálati alanyok egy életkörülményekre és szokásaikra vonatkozó validált kérdőívet is kitöltöttek. Ezzel párhuzamosan a települések nyers- és ivóvizéből is történt mintavétel, amelyet a fent leírt módszerekkel vizsgáltunk a protozoonok jelenlétére.

A három településen gyűjtött humán székletminták közül a fent leírt antigén kimutatási teszttel és immunofluorescens mikroszkópiával Füzéren 4, a mátrafüredi és budapesti széklet mintákban 1-1 esetben volt *Giardia* pozitív a vizsgálat. A négy pozitív székletmintában Füzéren egyszer Assemblage A, egyszer Assemblage B és kétszer koinfekció volt kimutatható. Ezzel ellentétben Mátrafüreden és a kontroll városban (Budapest) egy-egy székletmintában *G. duodenalis* Assemblage A-t mutattunk ki. A kontroll városban a fertőzött személy valószínűleg utazásai során Ázsiában betegedett meg, míg a két faluban a fertőzött személyek nem számoltak be külföldi tartózkodásról. Füzéren, ahol az ivóvízforrásban a *G. duodenalis* Assemblage B PCR módszerrel is detektálható volt, magasabb volt az aszimptomatikus giardiozis aránya, mint a másik két településen. Az eredmények egy specifikus epidemiológiai szituációt mutatnak és jelentős információt hordoznak az aszimptomatikus giardiozissal kapcsolatban.

4. A vizsgálatok jelentősége, összefoglalás

A giardiozis és kriptosporidiozis elterjedése az emberi populációban egyre nagyobb problémát jelent világszerte. Ezeknek a patogéneknek a cisztái, oocisztái megjelenhetnek az ivóvízellátásban, rekreációs helyeken, a mezőgazdasági felhasználású vizekben. Fejlett országok nagyobb sikerrel kontrollálják ezeknek a protozoonoknak a jelenlétét, bár a vízminőségi problémák – ha kisebb számban is – de jelen vannak. A megvizsgált nyersvizek 55%-ában és az ivóvizek 34%-ában tudtuk kimutatni *Giardiát* és *Cryptosporidiumot*. 2 vízmű vízkezelése bizonyult nem megfelelőnek a protozoonok eltávolítása szempontjából, egyik vízmű sem alkalmaz flokkulációs víztisztítási technológiát. A vizsgálataink alapján azok a vízművek, amelyek nyersvizében a *Giardia* vagy *Cryptosporidium* szennyeződés előfordulhat és kockázatot jelent, részletes tájékoztatást kaptak, elkezdték a rendszeres kontroll vizsgálatokat. A PCR-es vizsgálatok megerősítették, hogy a megvizsgált vizek 36%-a *Giardia* pozitív volt illetve 28%-a *Cryptosporidium* pozitív. Továbbá humán patogén *Giardia duodenalis* csoportokat és *Cryptosporidium* fajokat valamint egy új *Giardia* szubtypust azonosítottuk. Az eredmények nagymértékben hozzájárulnak az ember egészségének védelmében teendő intézkedések meghatározásához.

A jelenlegi tanulmány elsőként alkalmazza a *Giardia* és *Cryptosporidium* szimultán kimutatását és genotípezálását a magyar vízellátókban. Ugyanakkor azt is bemutatja, hogy milyen nehéz az igen alacsony számban előforduló protozoonok különböző vizekből és fekáliából történő kimutatása. A leírt és bevezetett detektálási technikák ma rutinszerűen alkalmazhatók. Mivel a bemutatott módszerek mind klinikai, mind környezeti, sőt élelmiszer mintákhoz is használhatók, segítségünkre lesznek a jövőben az állati és emberi fertőzőforrások meghatározásához, *Cryptosporidium* illetve *Giardia* szubtypusok állatról emberre való terjedésének, és az átterjedés dinamikájának meghatározásához.

A biztonságos, patogénmentes ivóvíz mindenki számára létfontosságú. A *Cryptosporidium* és *Giardia* elterjedése a magyarországi vizekben eddig nem volt ismert. Felmérések és

tudományos munka (volt) szükséges, hogy jobban megérthessük ezeknek a protozoonoknak a természetét vizeinkben.

5. A témához kapcsolódó publikációk

5.1. Teljes cikkek

Plutzer J. (2001) *Giardia* és *Cryptosporidium* paraziták kimutatásának lehetőségei vízből. Magyar Hidrológiai Társaság Duna-Tisza Medence Víz és Környezetvédelmi Nemzetközi Konferencia kiadványa, 599-603. old.

Plutzer J. (2003) Felszíni és ivóvizeink vizsgálata új nézőpontból– *Giardia* és *Cryptosporidium* paraziták előfordulása vizeinkben. Hidrológiai Közöny 83:120-121.

Plutzer J, Takó MH, Márialigeti K, Törökné A, Karanis P. (2007) First investigations into the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in Hungarian drinking waters. J Water Health. 5: 573–584. („ISI confirmed in March 2007 that the Journal of Water and Health has been accepted for inclusion in the Science Citation Index Expanded and Current Contents/Agriculture, Biology and Environmental Sciences starting with volume 5 (1) 2007. Because of the way the impact factor is calculated (2 years of citations), they will not have a formal figure for 2 years” IF about 1.5 – 2.5)

Plutzer J, Karanis P. (2007) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. Vet Parasitol. 31:357-362. IF: 1.9

Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökné A, Márialigeti K. (2008) Detection and characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. Int J Hyg Environ Health. In press. IF: 1.733

Plutzer J, Törökné A, Szénási Z, Kucsera I, Farkas K, Karanis P. (2008) Epidemiological study on *Giardia* in two Hungarian villages and genotype analysis of the *Giardia* isolates detected in drinking water and in humans. Environ Res. Under review.

Plutzer J, Karanis P. (2007) Molecular identification of a *Cryptosporidium saurophilum* from corn snake (*Elaphe guttata guttata*). Parasitol Res. 101:1141-1145. IF: 1.14

Karanis P, Plutzer J, Halim NA, Igori K, Nagasawa H, Ongerth J, Liqing M. (2007) Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. Parasitol Res. 101:1575-1580. IF:1.14

Burenbaatar B, Bakheit MA, Plutzer J, Suzuki N, Igarashi I, Ongerth J, Karanis P. (2008) Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. Parasitol Res. 102:901-905. IF:1.14

Halim NA, Plutzer J, Bakheit MA, Karanis P. (2008) First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Malaysian cattle. Vet Parasitol. 152:325-329. IF: 1.9

5.2. Nemzetközi Konferenciák

Törökné A, Plutzer J. First data on *Cryptosporidium* and *Giardia* survey in Hungarian water supply. Waterborne pathogenes címmel megrendezett AWWA konferencia, Cascais, Portugal, 2002. 09. 22-25. (Poszter előadás, absztrakt kötet)

Vargha M, Berki O, Plutzer J, Török A, Kádár M. Factors influencing the water quality of Lake Balaton. 1st Central European Forum for Microbiology and the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 2005. 10. 26-28. (Absztrakt kötet 52:123. oldal)

Plutzer J, Török A. Are the Hungarian drinking waters contaminated with *Giardia* and *Cryptosporidium* protozoa? 1st Central European Forum for Microbiology and the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 2005. 10. 26-28. (Absztrakt kötet 52: 170. oldal)

Plutzer J, Takó MH, Márialigeti K, Törökné A, Karanis P. First investigations on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in Hungarian drinking waters and species genotyping. The 15th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases, Obihiro, Japan, 2006. 09. 26. (Absztrakt kötet)

5.3. Hazai konferenciák

Plutzer J. *Giardia* és *Cryptosporidium* paraziták kimutatásának lehetőségei vízből. Magyar Hidrológiai Társaság Vándorgyűlése, Gyula, 2001. 07. 4-5. (Absztrakt kötet)

Plutzer J. *Giardia* és *Cryptosporidium* paraziták kimutatásának lehetőségei vízből. Duna-Tisza Medence Víz- és Környezetvédelmi Konferencia, Debrecen, 2001. 09. 19-21. Meghívott előadás.

Plutzer J. Felszíni és ivóvizeink vizsgálata új nézőpontból– *Giardia* és *Cryptosporidium* paraziták előfordulása vizeinkben. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2002. 10. 2-4.

Plutzer J, Törökné A. A balatoni kis vízfolyások vizsgálata *Giardia* és *Cryptosporidium* patogén protozoonok szempontjából. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. 10. 6-8. (Poszter előadás, absztrakt kötet)

Plutzer J. A *Cryptosporidium* és a *Giardia* elterjedése az ivóvízben. A vízmikrobiológusok IV. Országos Konferenciája, OKI, Budapest, 2005. 11. 15. (Absztrakt kötet)

5.4. Nem publikált tudományos jelentések

Csanády M, Törökné A, Plutzer J, Kádár M, Chalmers R. *Cryptosporidium* és *Giardia* detektálásának kidolgozása és hazai előfordulásának felmérése. Az Egészségügyi Minisztérium 2000-2002. évi tárcaszintű kutatási témáinak beszámolója (ETT T08-076), 2004.

Törökné A, Plutzer J. Jelentés a „2004. évi miniszteri konferencia nyilatkozatából, CEHAPE dokumentumból adódó feladatok” című projekt keretén belül az egyedi kutak és kistérségi

vízellátás biztonságosságának felmérésére végzett vizsgálatokról. Országos Tisztifőorvosi Hivatal, 2005. 07. 18.

Törökné A, Plutzer J. Jelentés a Balaton védelmét szolgáló középtávú terv keretében végzett kórokozó parazita protozoonok kutatásáról. Miniszterelnöki Hivatal, 2004. 12. 13.

Plutzer J, Törökné A. Assessment of human health impacts from emerging microbial pathogens in drinking water by molecular and epidemiological studies. HEALTHY-WATER EU- Project, FP 6, Environment & Health Program (FOOD-CT-2006-036306), 2007. 10. 31.

Plutzer J, Törökné A. Patogén protozoonok klinikai és környezeti diagnosztikájának fejlesztése és beillesztése a vízzel terjedő megbetegedések surveillance rendszerébe. GVOP AKF 3.1.1 (0517), 2008. 02. 25.

5.5. Tudományos intézetekben tartott szakmai előadások

5.5.1. Angol nyelvű előadások

Plutzer J, Törökné A. First investigation into the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Hungarian water treatment plants. Water-born Parasitic Diseases, a 'Johan Béla' Országos Epidemiológiai Központnak és a Fodor József' Országos Közegészségügyi Központnak a PHARE által támogatott Tudományos Ülése nemzetközi részvétellel, OKI, Nagytanterem, 2005. 11. 23.

Plutzer J, Törökné A, Szénási Z, Kucsera I, Farkas K. Genotype analysis of *Giardia* isolated from water and human in Hungary. (HEALTHY-WATER) EU- Project meeting, UK, Norwich, University of East Anglia, 2007. október 25.

Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökné A, Márialigeti K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples. (HEALTHY-WATER) EU- Project meeting, OKI, Budapest, 2008. április 24.

Farkas K, Törökné A, Domokos K, Varró M, Plutzer J. Seroepidemiology of cryptosporidiosis in inhabitants of Füzér and Mátrafüred in Hungary. (HEALTHY-WATER) EU- Project meeting, OKI, Budapest, 2008. április 24.

5.5.2. Magyar nyelvű előadások

Plutzer J. *Cryptosporidium* és *Giardia* előfordulása hazai felszíni vizekben és ivóvízben. OKI, Nagytanterem, 2002. 05. 14.

Plutzer J. *Giardia* és *Cryptosporidium* mikroszkópos és molekuláris kimutatása és az SSUrRNS, *gdh* gékjeik szekvencia analízise hazai felszíni, nyers- és szennyvizekben valamint *Giardia* epidemiológiai felmérés két magyarországi településen. OKI, Nagytanterem, 2008. 02. 19.