Eötvös Lóránd Tudomány Egyetem
Természettudományi Kar
Környezettudományi Doktori Iskola

PATOGÉN AMŐBÁK ÉS SZIMBIONTÁIKNAK VIZSGÁLATA MAGYARORSZÁGI TERMÁL- ÉS GYÓGYFÜRDŐKBEN

Kiss Csaba
ÁNTSZ
Nyugat-dunántúli Reg. Intézete

Témavezetők:

Dr. Márialieti Károly
ELTE
Mikrobiológiai Tanszék

Dr. Vargha Márta
OKI
Vízmikrobiológiai osztály

Bevezetés

Magyarország termál- és gyógyfürdői tekintetében nagyhatalomnak számít

Hatályos magyar rendeletek szerinti egészségügyi kockázatot csökkentő rendszerek

a. visszaforgatott rendszerek

b. töltő-ürítő rendszerek

Az ÁNTSZ által végzett hatósági és az üzemeltetői vizsgálatok nem tárnak fel minden kockázati tényezőt

Bevezetés

Naegleria sp.:

- Primer amőbás meningitis (PAM)
- 6 fajból egy humán patogén (N.flowerii)
- Egészséges, fiatal felnőtt férfiakat támad elsősorban
- Édesvizekben bárhol előfordulhatnak
- Termotoleránsak

Acanthamoeba sp.:

- Amőbás keratitist (AK) 8 faj okozhat
- Granulomás amőbás enkefalitiszt 1 faj okoz
- GAE-t immunszupresszáltaknál
- AK-t egészségeseknél is
- Édesvízi termotoleráns fajok

Termotoleráns patogén prokarióták

- *Mycobacterium sp.*
- *Burkholderia sp.*
- *Chlamydia sp.*
- *Rickettsia sp.*
- *Legionella sp.*

Célkitűzések

- Patogén amőbák és *Legionellák* gyűjtése törzsgyűjtemény létrehozása céljából
- Hatékony gyűjtési és tenyésztési módszerek beállítása amőbák és *Legionellák* kimutatására medencés fürdőkből
- Molekuláris biológiai azonosító és tipizáló módszerek (16S rDNS,18S rDNS PCR, mtDNS RFLP) beállítása
- Amőbák azonosítására szolgáló molkuláris biológiai módszerek fejlesztése
- Szimbiózis vizsgálata mesterséges körülmények közt teszésztéses, FISH, PCR és TEM technikákkal
- A víz biotikus és abiotikus hatásainak vizsgálata a két élőlénycsoportra és szimbiózisukra
- Kolonizáció vizsgálata fürdőkön belül (amőbák fajszintű, *Legionellák* szerotípus szintű meghatározása molkuláris biológiai eszközökkel)
- Összefüggések keresése a termál-, ill. gyógyvíz tulajdonságai és az amőba, *Legionella* szennyezettsége közt
- Szimbiózis vizsgálata a fürdőkben: víz minőségének hatása a szimbiózisra, szimbiózis hatásának vizsgálata a túlélésre a fürdőken alkalmazott fertőtlenítések mellett

Mintavétel

Amőbák

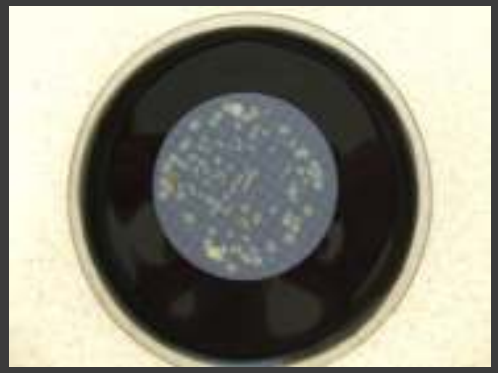
- Biofilmből törletminták alkalmazásával
  a. medence fal
  b. túlfolyó rács
- Víztestből
  1 liter merített víz vétele steril palackba

Legionellák

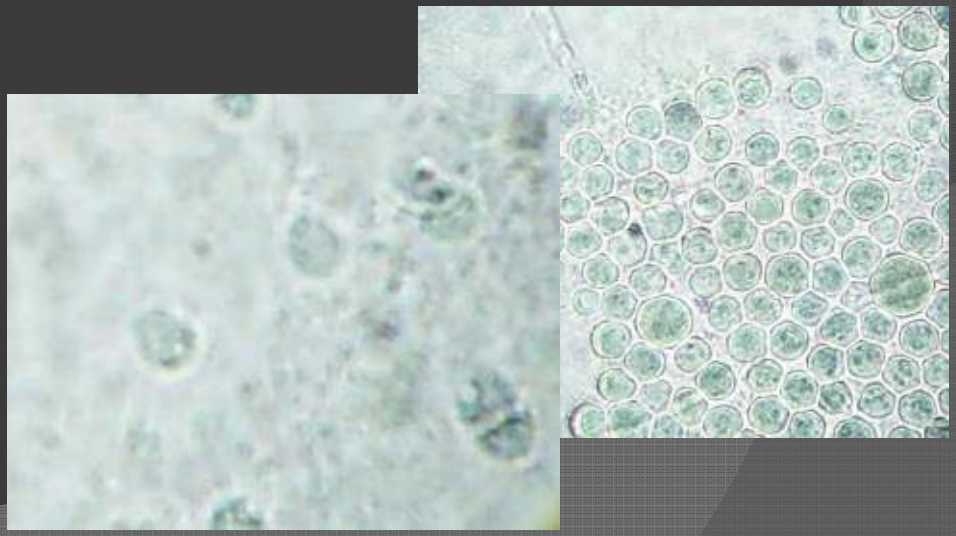
- Biofilmből vett törletminták alkalmazása
  a. medence fal
  b. túlfolyó rács
- Víztestből vett minták alkalmazása
  a. 1 liter merített víz vétele szűrőpapírról történő DNS kivonáshoz
  b. 500 ml merített minta vétele hagyományos tenyésztéhez

Tenyésztési módszerekek

- *Legionellák*
  0,5 liter vízminta szűrése
  GVPC szelektív táptalajra



- Amőbák
  - PYG tápoldat alkalmazása
  - NNA agar hővel inaktivált
    E.coli-val szélesztve



Módszer beállítás

Amőbák azonosítására szolgáló módszerek fejlesztése

Mikroszkópos és genus specifikus PCR módszerek

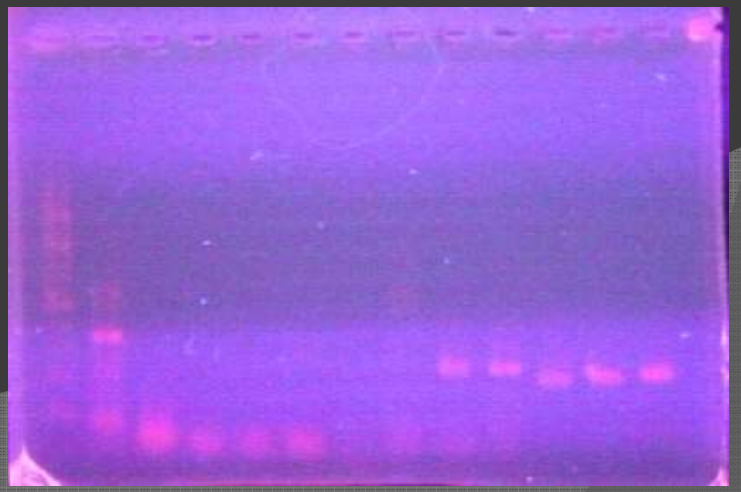
⇓

Cél:

Egy univerzális primerrel molekuláris biológiai

eszközökkel faji szintű azonosítás

Primer páros	Hőfok	Eredmény
SSU1 ; SSU2	60 °C	Negatív
Worml. ; sb	54 °C	Negatív
SSU1 ; P1R	59 °C	Negatív
SSU1 ; sb	61 °C	Negatív
P1F; sb	59 °C	Pozitív

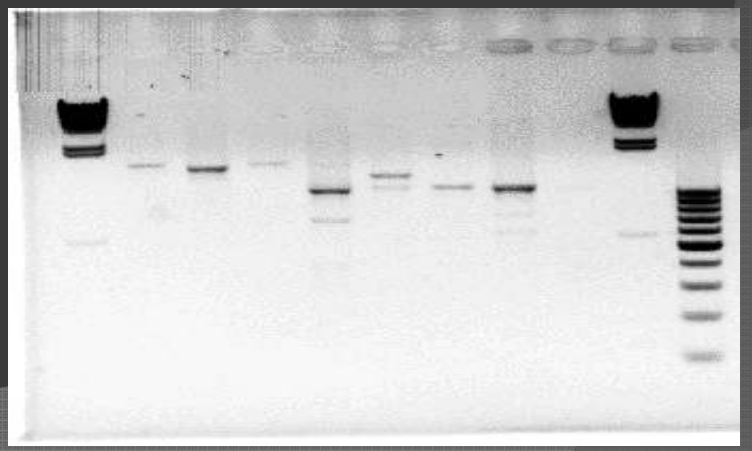


Módszer beállítás

Amőbák azonosítására szolgáló módszerek fejlesztése

P1F;sb primer párossal kapott szakasz szekvencia analízise: *Hartmannella vermiformis*

92%-os egyezéssel



További 13 minta elemzése

Módszer beállítás

Amőbák azonosítására szolgáló módszerek fejlesztése

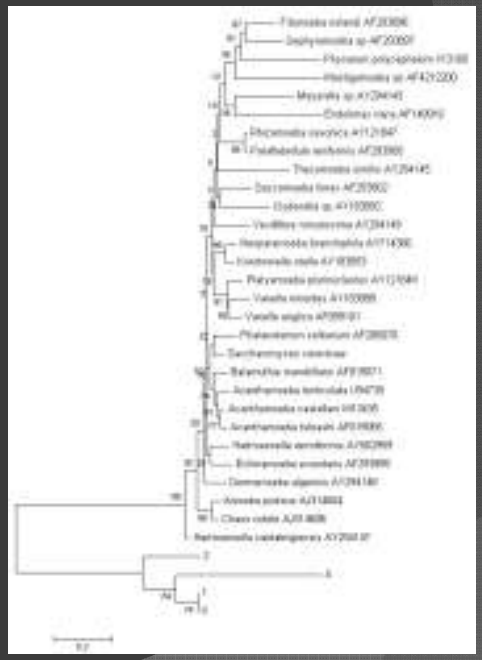
Szekvencia analízis eredménye

- A szekvenciák összehasonlító elemzése

  nagyon heterogén eredményt hozott
- A szekvenciákat törzsfába illesztettük,

  de teljesen elkülönülő csoportot adott

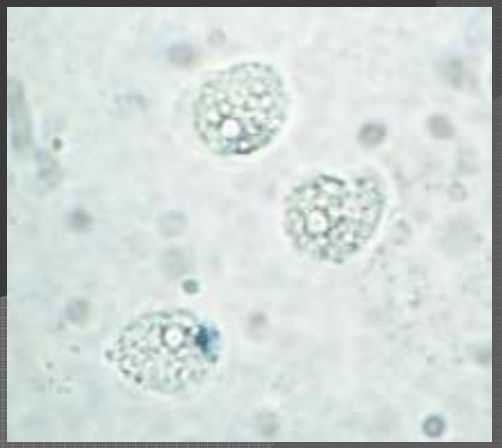
A módszer további finomítása szükéges!



Módszer beállítás

Amőbák genus szintű azonosítására

- Genus-specifikus 18S rDNS alapján történő azonosítás
- 3 amőba genus kiválasztása identifikálás céljából (*Hartmannella, Acanthamoeba, Naegleria*)
- A módszer előnye, hogy relatív specifikus eredményt kapunk
- A módszer hátránya, hogy az összes mintára le kell futtatni mind a 3 PCR-reakciót



Legionella izolátumok azonosítása

Genus szintű identifikálás klasszikus mikrobiológiai eszközökkel

- tenyésztéses módszerrel
- azonosítás cisztein auxotrófia és telepmorfológia alapján

törtüveg telepmorfológia

Molekuláris biológiai azonosítás

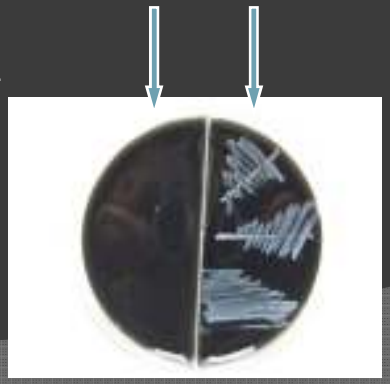
- 16S rDNS alapján történő azonosítás (JFP/JRP) genus szintű
- ERIC PCR – faj alatti szintű

Szerológiai azonosítás

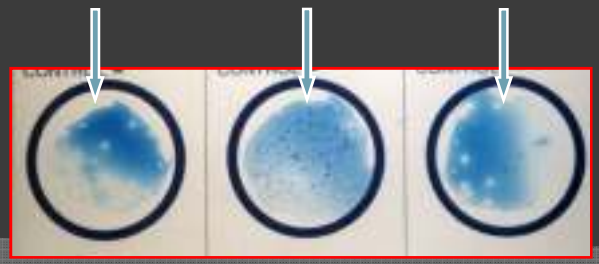
- Faj és faj alatti szintű

Cisztein auxotrófia vizsgálata

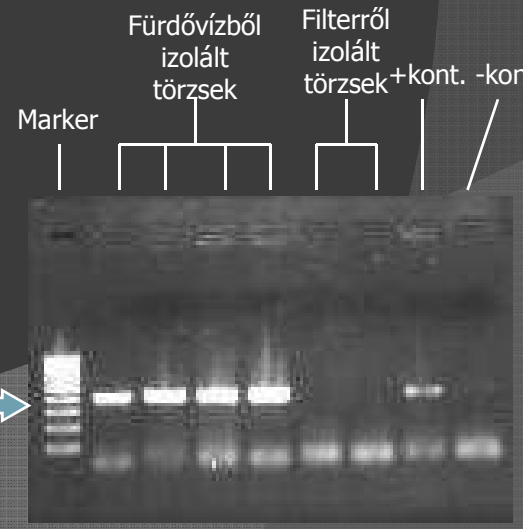
cisztein mentes ciszteint tartalmazó



Legionella neg. *L. pneumophila* *Legionella* 2-14



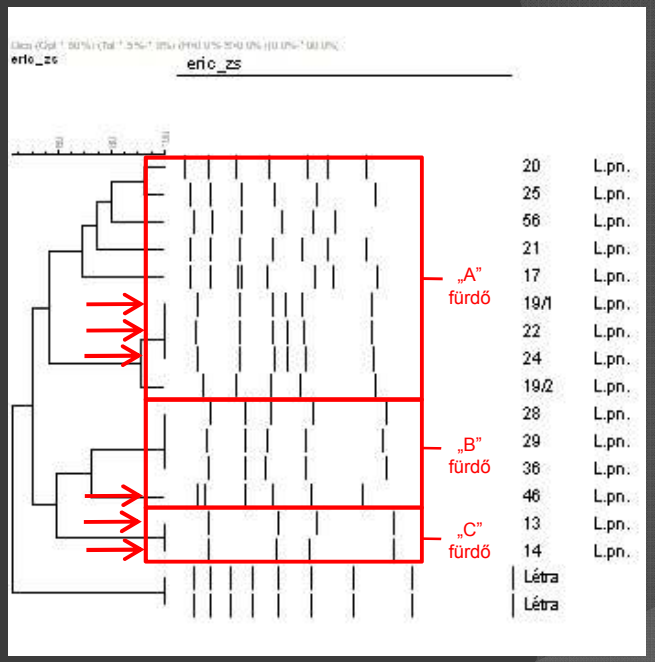
386bp nagyságú PCR termék

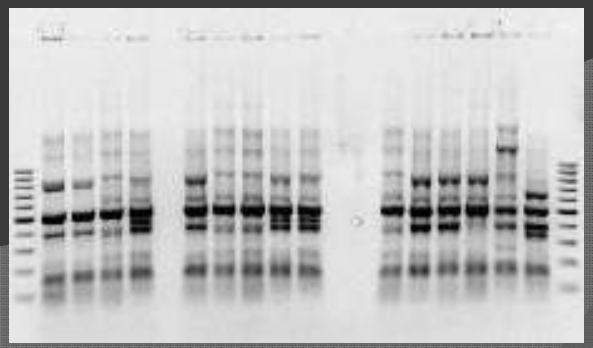


Módszer beállítás

Legionellák faji szint alatti azonosítása molekuláris biológiai eszközökkel

- Az ERIC-PCR a genom konzervatív, ismétlődő szekvenciáira nézve specifikus. Ezek száma és elhelyezkedése faji szint alatti felbontást tesz lehetővé
- Az eddig izolált minták vizsgálata során jól elkülönülnek az egyes fürdők és esetenként markáns különbségek vannak a szerotípusok közt is.
- A módszer alakalmasnak tűnik a törzsek faj alatti szintű azonosításához és a szerotipizálással együtt az esetleges epidemiológiai vonatkozások tisztázására fürdők vonatkozásában is





Helyszíni mintavételek eredményei

- Eddig 21 fürdőben végeztünk mintavételt, melyekben különböző egyéb elemekkel (jodid ion, kovasav, fluor, kálcium, magnézium) dúsított alkáli-hidrogénkarbonátos használnak a medencékhez
- Ezen fürdők közül tizenkettő nagyobb volt 5-25 medencével és kilenc kisebb 1-3 medencével
- A medencék 31% töltő-ürítő rendszerű volt, a maradék 69% pedig fertőtlenített medence

Helyszíni mintavételek eredményei

- 21 fürdőben 152 medencét mintáztunk meg melyből 105 fertőtlenített és 47 töltő-ürítő rendszerű volt
- *Legionellára* 125 mintát dolgoztunk fel
- Amőbára 138 mintát dolgoztunk fel
- Rutin bakteriológiai vizsgálatok:

  E.coli, P.aeruginosa, S.aureus, Coccus-szám (408 vizsgálat)
- Rutin kémiai vizsgálatok:

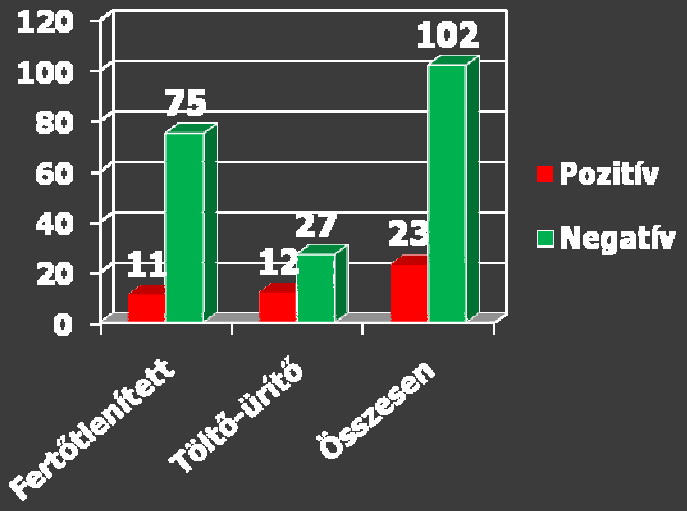
  KOI, Klorid, Nitrát, Nitrit, Ammónium,Keménység,

  Lúgosság,pH,H_2O_2, Dewan50, Szabad és kötött klór,

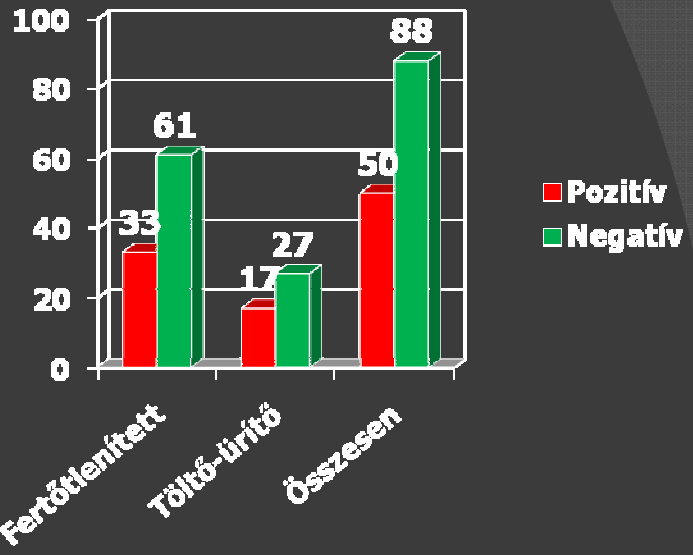
  Fe, Mn, Al (1277 vizsgálat)

Helyszíni mintavételek eredményei

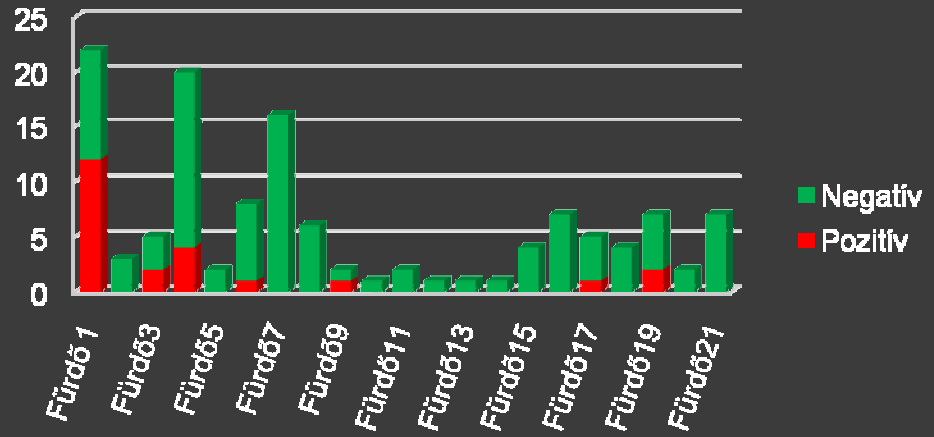
Legionella minták megoszlása medence típusok közt



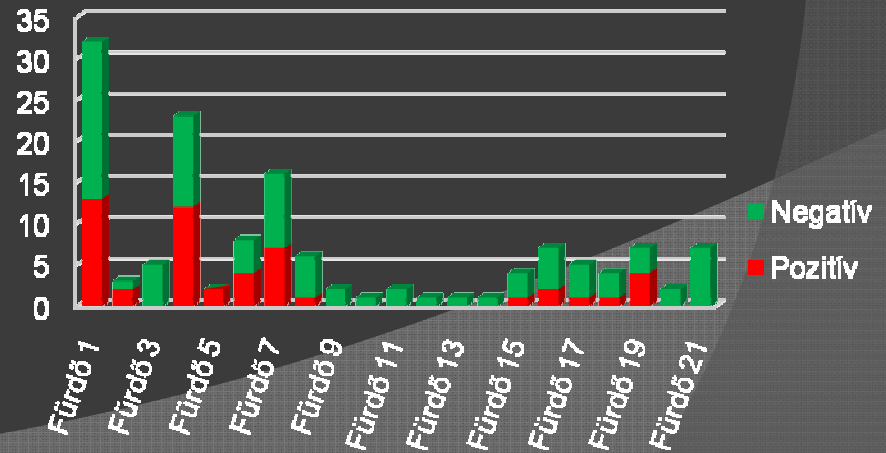
Amőba minták megoszlása medence típusok közt



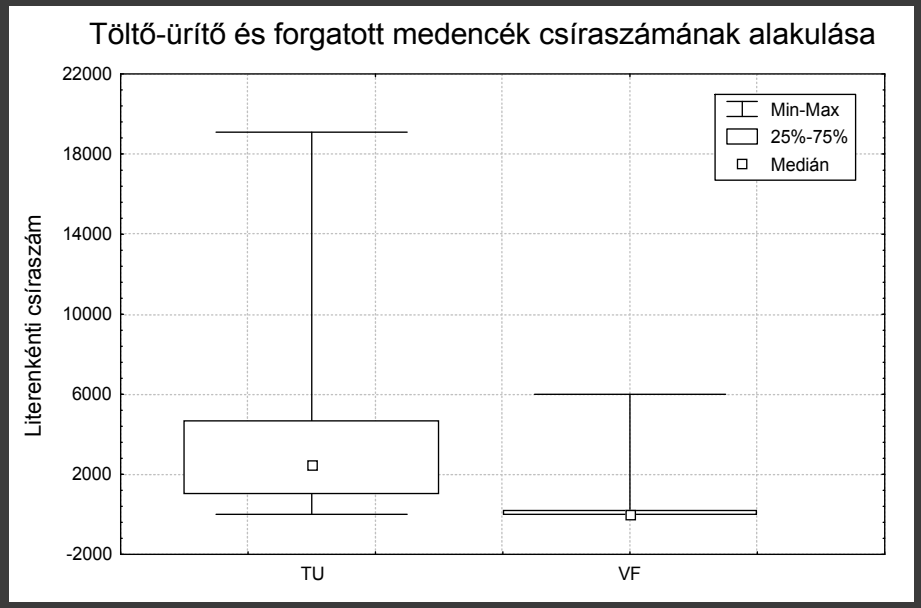
***Legionella* pozitív minták a fürdőkben**

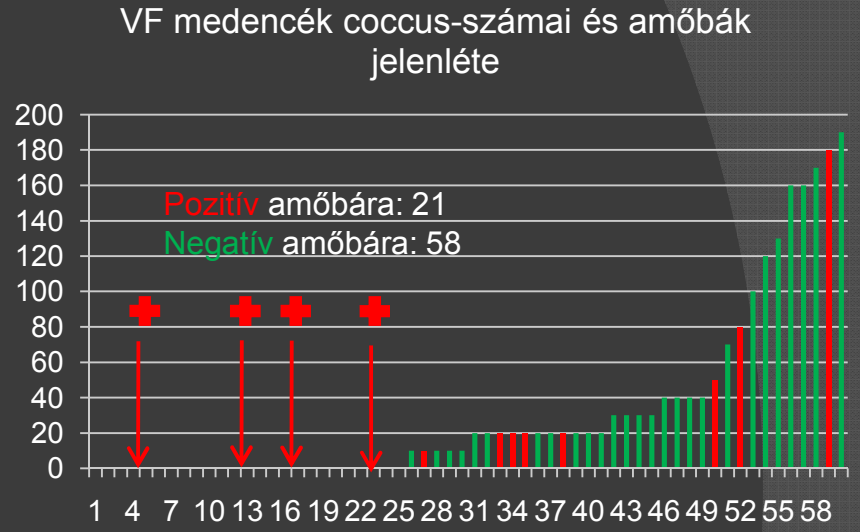


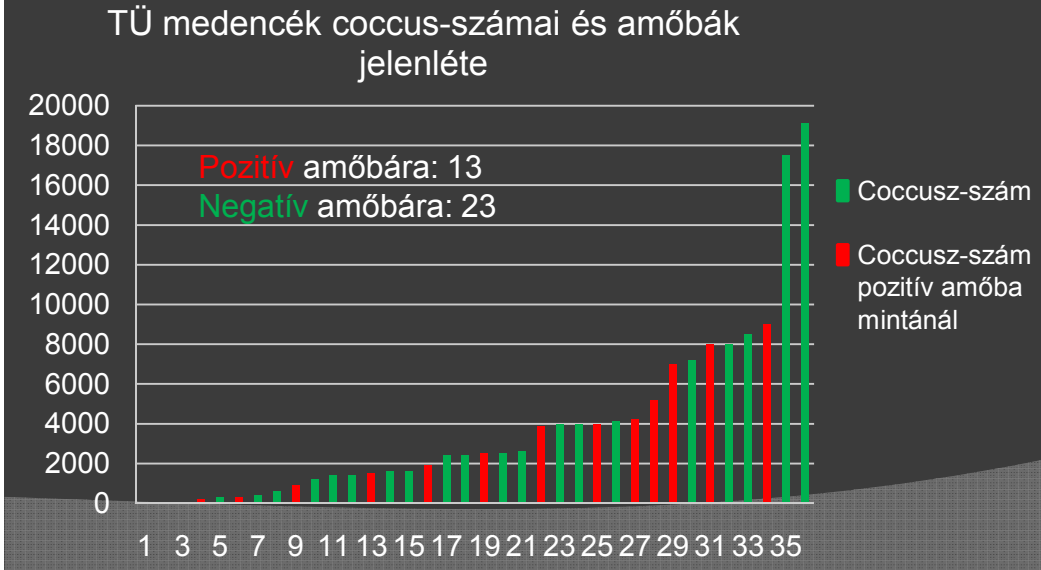
Amőba pozitív minták a fürdőkben

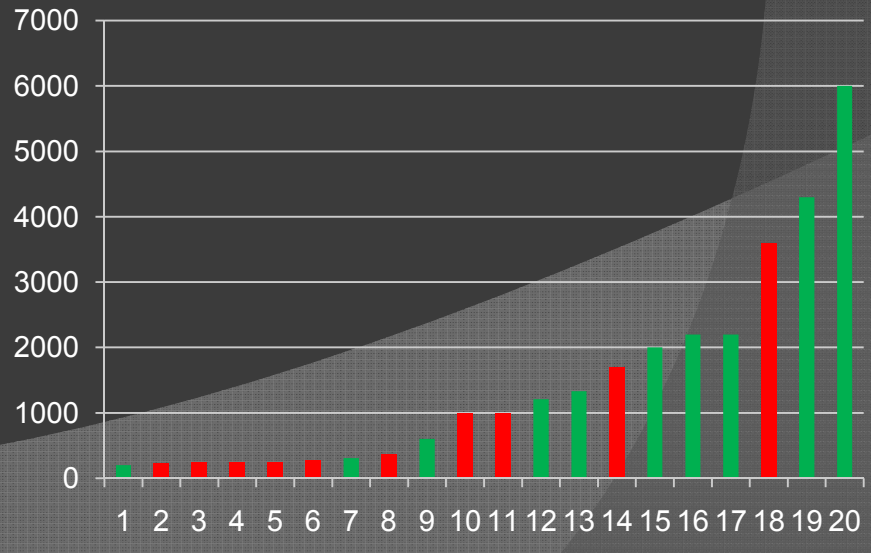


Helyszíni mintavételek eredményei









További lépések

- További mintákkal bővíteni a törzsgyűjteményeket és az elemzett minták számát a 2009-as nyári fürdőszezonban
- Mesterséges körülmények közt a szimbiózis kialakítása a két élőlény csoport közt (FISH, TEM, PCR vizsgálatok)
- Vizsgálni kívánjuk a víz paraméterinek mesterséges változtatásának hatását a két élőlény csoportra, valamint szimbiózisukra (pH, hőmérséklet, vezetőképesség baktérium-szám)

Összefoglalás

- Mind a két csoportra beállítottuk a mintavételi és tenyésztéses eljárásokat
- *Legionellák* esetében genus, faji és faj szint alatti identifikáló módszereket állítottunk be és alkalmaztunk
- Amőbák tekintetében mikroszkópos módszerrel vizsgáljuk az izolátumokat, a 18S rDNS alapján történő identifikálás eredményei kiértékelés alatt vannak
- Amőbák azonosítása során megpróbáltuk egy új módszer kidolgozásával, ám ez további fejlesztésre szorul
- Összesen 21 fürdőben vettünk mintát (12 fürdőben volt amőba, 7-ben *Legionella*, minták 36 %-a pozitív amőbára, 18 % *Legionellára,*
- Mind a két csoport a töltő-ürítős rendszerekben vannak leginkább elterjedve, s az amőbák terjedésében antropogén hatás figyelhető meg jelen adatok alapján
- 23 *Legionella* és 50 amőba törzset izoláltunk
- *Legionellák* faji szint alatti azonosítására beállított ERIC-PCR módszer eddigi vizsgálataink alapján alkalmas fürdők *Legionella* közösségeinek elkülönítésére is

Köszönetnyílvánítás

- Dr. Török Júliának az amőba vizsgálatok terén nyújtott tengernyi szakmai segítséghez
- Barna Zsófiának és az OKI Vízmikrobiológiai Osztály valamennyi dolgozójának a szakmai segítséget, valamint a lehetőséget, hogy az Osztályon dolgozzak
- Az ÁNTSZ Ny-d. R. I.-nek Laboratóriumi Osztályán dolgozó valamennyi kollegámnak
- Témavezetőimnek dr. Vargha Mártának és dr. Márialigeti Károlynak az egész témámhoz nyújtott segítséget

Köszönöm a figyelmet!