

Sledování cirkulace poliovirů a ostatních enterovirů v odpadních vodách v ČR v roce 2021

Surveillance of polioviruses and other enteroviruses in sewage in the Czech Republic in 2021

Petra Rainetová

Souhrn • Summary

NRL pro enteroviry v rámci environmentální surveillace vyšetřuje odpadní vody z čističek 9 měst, 2 pobytových středisek a 3 zařízení pro zajištění cizinců. V roce 2021 bylo vyšetřeno 159 vzorků odpadních vod. 73 vzorků bylo uzavřeno jako negativní, 86 jako pozitivní. Pozitivní vzorky byly určeny jako non-polio-enteroviry (NPEV), viabilních z nich bylo 27 vzorků. Současně bylo všech otestováno 159 vzorků z odpadních vod na přítomnost RNA SARS-CoV-2, z nichž 25 bylo pozitivních.

Within environmental surveillance, the National Reference Laboratory for Enteroviruses screens wastewater from sewage treatment plants in nine cities, two accommodation centres, and three detention facilities for foreigners. In 2021, 159 sewage samples were analysed. Seventy-three samples turned out negative and 86 were positive. The detected viruses were identified as non-polio-enteroviruses (NPEV), remaining viable in 27 samples. The 159 sewage samples were tested for the presence of RNA SARS-CoV-2, of which 25 turned out positive.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2022; 31(3): 107–109

Klíčová slova: odpadní vody, polioviry, enteroviry, SARS-CoV-2

Keywords: sewage, polioviruses, enteroviruses, SARS-CoV-2

Národní referenční laboratoř pro enteroviry (NRL/ENT) ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ) je součástí sítě laboratoří Světové zdravotnické organizace (WHO) vyšetřujících poliomyelitis – Global Polio Laboratory Network (GPLN), která byla WHO založena v roce 1990. GPLN zajišťuje surveillace akutních chabých paréz u dětí do 15 let, enterovirovou a environmentální surveillace.

Environmentální surveillace je uskutečňována odběrem odpadních vod. Metodiku odběru popsal hlavní hygienik ČR v dopise HEM-370-30. 9. 04/18483 z roku 2004. Odběrová místa byla určena dopisem z Ministerstva zdravotnictví HEM-300-20. 7. 2004/20284 [1–5].

V ČR jsou odpadní vody odebírány v 9 městech: Praha, Ostrava, Brno, Hradec Králové, Ústí nad Labem, Plzeň, České Budějovice, Rakovník, Karlovy Vary, ve 2 pobytových střediscích (PoS): Zastávka u Brna, Kostelec nad Orlicí a ve 3 zařízeních pro zajištění cizinců (ZZC): Bělá pod Bezdězem – Jezová, Vyšní Lhoty, Balková [5].

Odběry jsou prováděny 1× měsíčně pracovníky Zdravotních ústavů a Krajských hygienických stanic z hlavní městské kanalizace před čističkou odpadních vod určených měst a z odvodu odpadních vod PoS a ZZC před vyústěním do další kanalizace. Na vybraném místě zhruba 30 cm pod hladinou je odebráno 5 vzorků vody a ty jsou pak vlyty do vymyté plastové nesterilní láhve do objemu 1 litru. Odebraná voda je transportována do NRL/ENT SZÚ

při teplotě 0–8 °C. Pokud není možný okamžitý transport, jsou vzorky uchovávány do doby transportu v chladničce (0–8 °C), nejdéle však 2 měsíce [1–5].

WHO určila postup odběru odpadních vod, metodiku zpracování a typ tkáňových kultur na kultivaci v publikaci WHO „Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation“ (World Health Organization, Department of Vaccines and Biologicals, 2003, 12–13) [6].

Vzorky zpracované předepsaným postupem WHO jsou vždy očkované paralelně na dané dva typy tkáňových kultur, na buněčné linie získané z lidského rhabdomyosarkomu (RD) a na geneticky upravené myši buněčné linie, které mají lidský receptor pro polioviry (L20B). Přítomnost enterovirů se projevuje cytopatickým efektem (CPE) na tkáňových kulturách (TK). Pro CPE enterovirů je typické zakulacování a odpadávání buněk. Tkáňové kultury RD jsou vnímavé pro všechny enteroviry, L20B pouze pro polioviry. Tato odlišnost je dána přítomností lidského receptoru na L20B TK a usnadňuje odlišení poliovirů od ostatních enterovirů (non-polio-enterovirů-NPEV). CPE je popisován škálou od + do ++++ (+ reprezentuje 25 % degenerovaných buněk, ++ 25-50 %, +++ 50-75 %, ++++ 75–100 %) [7].

Tkáňové kultury RD a L20B s inokulovanými vzorky jsou prohlíženy v mikroskopu denně po dobu 5 dní. Pokud do pěti dní není pozorován cytopatický efekt, tak je provedena další pasáž na stejnou tkáňovou kulturu, na které byla předchozí pasáž. Pokud po dalších pěti dnech není objeven ani na jedné tkáňové kultuře CPE, je výsledek uzavřen jako negativní. Pokud je do pěti dní pozorován CPE na tkáňové kultuře RD a je roven nebo větší než +++, musí být udělána pasáž na druhém typu tkáňové kultury – L20B.

Tabulka 1: Vyšetřování odpadních vod – 2021

Pořadí	Odběrové místo	Počet odběrů	Výsledky – pozitivní –NPEV-viabilní	Výsledky – pozitivní –NPEV-neviabilní	Výsledky – pozitivní – RNA SARS-CoV2
1.	ÚČOV PRAHA TRÓJA	12	3	8	2
2.	ČOV RAKOVNÍK	12	3	5	4
3.	ČOV PLZEŇ (Jateční)	9	1	6	2
4.	ČOV pro ČESKÉ BUDĚJOVICE (Hrdějovice)	12	2	7	1
5.	ČOV ÚSTÍ NAD LABEM	12	1	6	4
6.	ČOV HRADEC KRÁLOVÉ	12	3	4	1
7.	ČOV – KOSTELEČ NAD ORLICÍ – PoS	12	2	1	0
8.	ČOV BĚLÁ POD BEZDĚZEM –JEZOVÁ – ZZC	12	2	1	0
9.	ČOV BRNO (Modřice)	12	2	6	3
10.	ČOV ZASTÁVKA U BRNA – PoS	12	2	1	2
11.	ČOV OSTRAVA (Oderská)	12	1	6	2
12.	ČOV KARLOVY VARY (Drahovice)	13	2	5	3
13.	ČOV VYŠNÍ LHOTY – ZZC	10	3	1	0
14.	ČOV BALKOVÁ – ZZC	7	0	2	1

legenda: ÚČOV = ústřední čistička odpadních vod; ČOV = čistička odpadních vod; PoS = pobytové středisko; ZZC = zařízení pro zajištění cizinců

To samé platí pro CPE na L20B. Pokud je objeven CPE až ve 2. pasáži, postupujeme stejně [7].

Tkáňové kultury L20B s CPE jsou pasážovány v RD TK, pokud se vyskytne do pěti dní CPE i na RD TK, musí být vzorek zaslán do WHO Regionální referenční laboratoře (RRL) v Helsinkách. V RRL je provedena intratypická diference (ITD). V případě negativního CPE na RD TK, výsledek je hlášen jako negativní na polioviry [7].

Pozitivní tkáňové kultury RD jsou inokulovány na L20B TK. Pokud není pozorován CPE, je do hlášení WHO v Laboratorním monitoracím datovém systému (LMDS) pro poliomyelitis zaznamenáno NPEV. V případě, když je objeven CPE, je provedena další pasáž v RD TK. Pokud je negativní CPE do hlášení, zadáváme negativní. V případě pozitivního CPE je vzorek zaslán k ITD do RRL [7].

Celý složitý algoritmus je prováděn jednak k odlišení poliovirů od NPEV, ale i k vyloučení přítomnosti adenovirů a reovirů, neboť tyto viry mohou také způsobit CPE v 1. pasážích.

Do RRL je nutno pozitivní izoláty poslat do sedmi dní od detekce. Dále je NRL/ENT povinná nález oznámit příslušné Krajské hygienické stanici nebo Zdravotnímu ústavu, Ministerstvu zdravotnictví a Národní komisi pro certifikaci polioeradikace.

RRL podle výsledku ITD informuje NRL, zda se jedná o poliovirus vakcinační, od vakcinačního derivovaný (VDPV) nebo divoký (WPV). VDPV se shodují s atenuovanými kmeny OPV (orální poliomyelitické vakciny) v méně než 99, 5 %, ale více než 82 %. Pokud se

polioviry shodují s kmeny OPV v méně než 82 %, jedná se o divoký kmen polioviru. VDPV vznikají v důsledku cirkulace vakcinačního kmene v nedostatečně proočkováné populaci. Při přenosu dochází k bodovým mutacím, které se týkají jednoho nebo dvou nukleotidů za týden, 1–2 % nukleotidů za rok. Výsledek je opět nutno nahlásit příslušné Krajské hygienické stanici nebo Zdravotnímu ústavu, Ministerstvu zdravotnictví a Národní komisi pro certifikaci polioeradikace.

Každý vzorek odpadní vody po zpracování metodou dvojfázové koncentrace je konfirmován pomocí RT-qPCR, která se provádí u všech vzorků po zpracování a po 2. pasáži vzorků na tkáních RD. V případě pozitivního výsledku vzorku po zpracování a negativního po pasážích na tkáňových kulturách se provádí ještě intratypická diference poliovirů typů Sabin 1 a 3 pomocí PCR v reálném čase s detekcí DNA Sybr Green.

Tento další test se provádí k vyloučení přítomnosti neviabilních poliovirů v odpadních vodách, neboť zvýšené používání dezinfekčních prostředků v současné době ovlivňuje životaschopnost virů.

V LMDS musí být záznam o všech vzorcích vyšetřovaných odpadních vod. Do LMDS se jako pozitivní označují pouze vzorky pozitivní na tkáňových kulturách.

V roce 2021 NRL vyšetřila celkem 159 vzorků odpadních vod (viz tabulka). Negativních bylo 73 vzorků. V 86 vzorcích byl zjištěn non-polio-enterovirus (NPEV), pozitivních viabilních, schopných se pomnožit na tkáňových kulturách RD bylo 27 vzorků. Čtyři vzorky (ÚČOV

Trója – Praha, ČOV Modřice – Brno, ČOV – ZZC Vyšní Lhoty, ČOV Jateční - Plzeň) se podařilo osekvenovat. Prokázaným non-polio-enterovirem byl 1× Coxsackievirus B3 (CVB3), 2× ECHO virus 11 (E11) a 1× ECHO virus 24 (E24).

Díky současné epidemiologické situaci vyšetřujeme koncentrát odpadní vody (vzorek po zpracování před inokulací na tkáňové kultury) rovněž na přítomnost RNA SARS-CoV-2.

V roce 2021 bylo otestováno všech 159 vzorků odpadních vod na přítomnost RNA SARS-CoV-2. Ve 25 vzorcích byla zjištěna metodou RT-qPCR přítomnost RNA SARS-CoV-2.

LITERATURA

- [1] Rainetová P. Vyšetřování odpadních vod na přítomnost polio a ostatních enterovirů v ČR v roce 2016. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2017; 26(3): 115–116
- [2] Rainetová P. Sledování cirkulace poliovirů a ostatních enterovirů v odpadních vodách v ČR v roce 2017. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2018; 27(3-4): 90–92
- [3] Rainetová P. Sledování cirkulace poliovirů a ostatních enterovirů v odpadních vodách v ČR v roce 2018. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2019; 28(4): 146
- [4] Rainetová P. Environmentální surveillance 2019. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2020; 29(5): 210-211
- [5] Rainetová P. Odpadní vody 2020, Environmentální surveillance. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2021; 30(4): 121
- [6] Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, Vaccines and Biologicals, WHO, 2003
- [7] Enterovirus surveillance guidelines, WHO, 2015

MUDr. Petra Rainetová
NRL pro enteroviry, CEM SZÚ