

Environmentální surveillance poliovirů

MUDr. Petra Rainetová

Eradikace poliomyelitis

- 1990 – Světová zdravotnická organizace
- **WHO - Global Polio Eradication Initiative (GPEI)**
- založila síť polio laboratoří –
Global Polio Laboratory Network (GPLN)

Hlavní cíl : spolupráce na eradikaci poliomyelitis

prostřednictvím – surveillance akutních chabých paréz

- surveillance environmentální

- surveillance enterovirové

Environmentální surveillance

- ČR – 1962 – 1. odběry odpadních vod
- 2004 – systematické určení odběrových míst hlavním hygienikem :
- Města :*Praha* Zařízení pro zajištění cizinců: *Bělá pod Bezdězem-Jezová*
Ostrava *Vyšní Lhoty*
- *Brno*
- *Plzeň*
- *Ústí nad Labem* Pobytová střediska : *Zastávka u Brna*
- *Hradec Králové* *Kostelec nad Orlicí*
- *České Budějovice* *Červený Újezd (uzavřeno)*
- *Rakovník* *Tetčice (uzavřeno)*
Drahovice (uzavřeno)
- 2015 *Karlovy Vary*
- 2017 Zařízení pro zajištění cizinců: *Balková*
- 2022 *Liberec, Jihlava, Pardubice, Olomouc, Zlín*

Metodika odběru

- 1) odběry zajišťují pracovníci ZÚ ve spolupráci s krajskými KHS 1x měsíčně
- 2) odběr se provádí z hlavní městské kanalizace před čističkou odpadních vod
- měst a z odvodu odpadních vod utečeneckých táborů před vyústěním do další kanalizace
- 3) z jednoho místa proudící odpadní vody se odebere 5 vzorků vody zhruba 30 cm pod hladinou a vlijí se do vymyté plastové nesterilní láhve o objemu 1,5 l
- 4) plastová láhev se dopraví při chladničkové teplotě (0-8 C) do NRL pro ENT
- 5) NRL pro ENT nahlásí výsledky příslušné KHS nebo ZÚ do 3 týdnů

Postup zpracování odpadních vod

- ***GPEI – GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES (2015)***
- několik kroků :
 - 1) příprava zásobních roztoků
 - 2) centrifugace
 - 3) neutralizace
 - 4) separace

Algoritmus inokulace vzorku na tkáňové kultury

RD – buněčná linie získaná z lidského rhabdomyosarkomu

L20B – buněčná linie myších geneticky upravených buněk s lidskými receptory pro polioviry

CPE – cytopatický efekt

(u enterovirů typický –

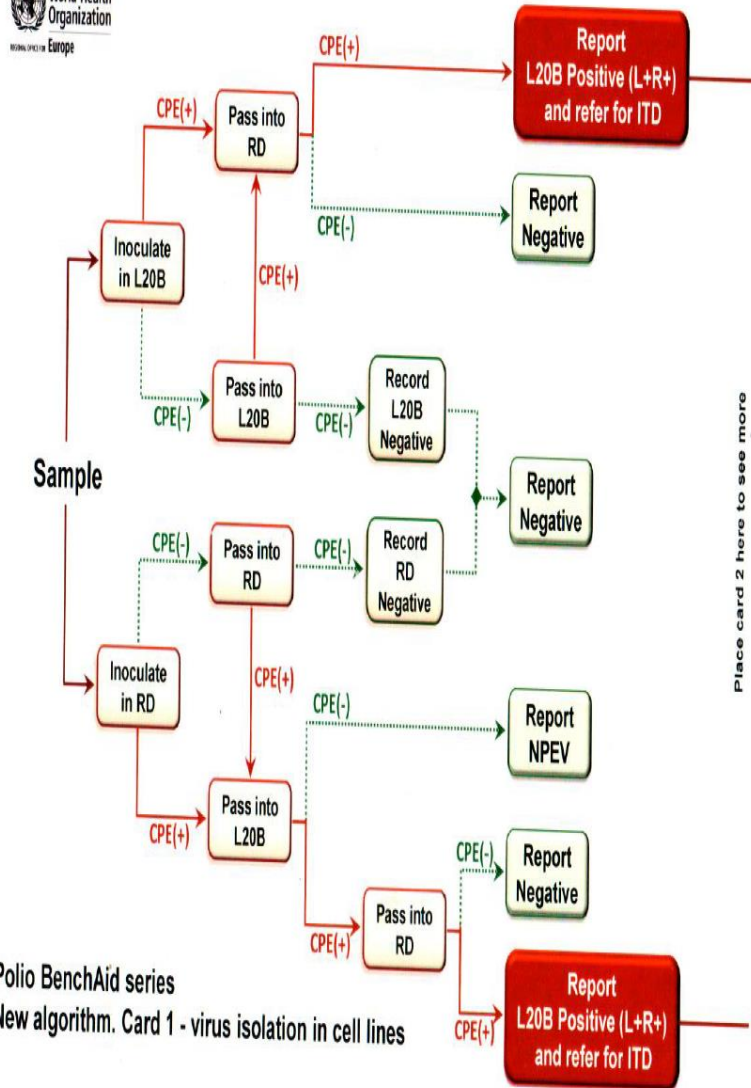
degenerativní změny buněk :

zakulacování,

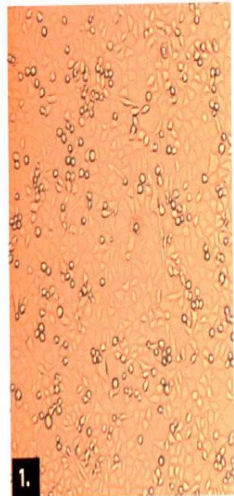
shlukování,

odpadávání)

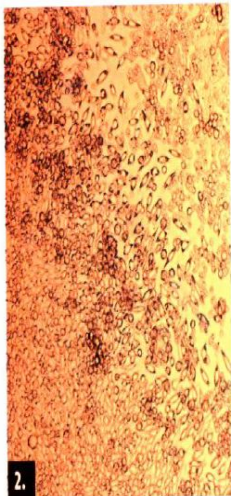
ITD – intratypická diferenciacie



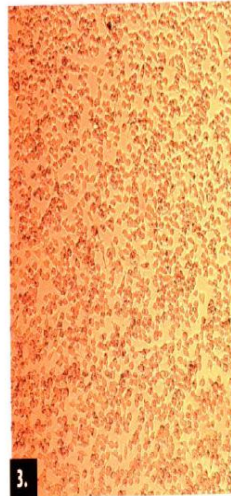
Characteristic appearance of uninoculated and inoculated cell cultures used for poliovirus isolation



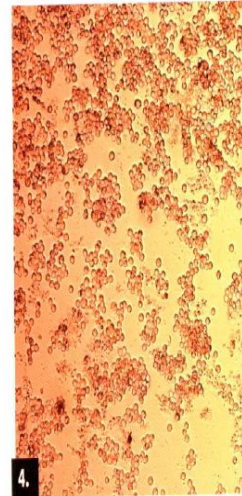
1. L20B: uninoculated



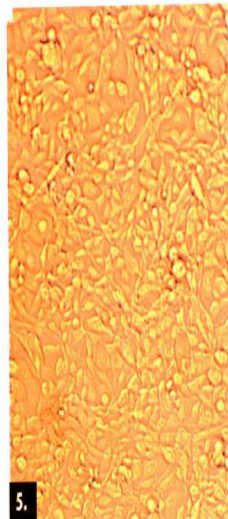
2. L20B: stool inoculation site's toxicity



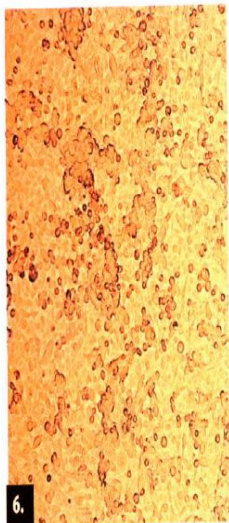
3. L20B: CPE = 2+



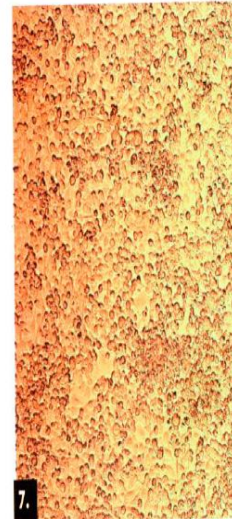
4. L20B: CPE = 4+



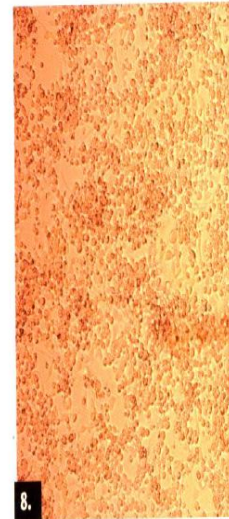
5. RD: uninoculated



6. RD: CPE = 2+



7. RD: CPE = 3+



8. RD: CPE = 4+

WHO/IVB/04.10 - Pullout

- Inokulované tkáňové kultury –
denní pozorování

CPE = 1+ (25% degenerovaných bb)

CPE = 2+ (25-50% degenerovaných bb)

CPE = 3+ (50-75% degenerovaných bb)

CPE = 4+ (75-100% degenerovaných bb)

Pozitivní CPE na tkáňových kulturách

- V algoritmu : **L20B +/RD+** **PV**
- **RD+/L20B+/RD+** **PV**
- (RD+/L20B- NPEV)
- (L20B+/RD- reoviry, adenoviry, NPEV- non-polio-enteroviry)

- Konfirmace : **po zpracování** odpadních vod, stolic, výtěrů z nosohltanu a **po 2. pasáži na TK RD -**
- **IZOLACE NUKLEOVÉ KYSELINY** (kit Zybio, MagNa Pure Compact, Kingfisher) +
- **RT-qPCR** (kit GeneProof)
- Ct po zpracování > 33 – virus se na TK nepomnoží a RT-qPCR po 2.pasáži - negativní

Odlišení NPEV/PV a PV Sabin 1/3

- *intratypická diferenciacce (ITD)* -

1) odlišení poliovirů a non-polio-enterovirů (NPEV)

(s primery PAN EV, PAN PV)

2) odlišení polioviru Sabin 1 a 3

(s primery Sabin 1,3)

RT-qPCR s fluorescenčním kyanidovým barvivem **Sybr Green**

(T_m Calling- křivka tání – určení charakteristické teploty tání

cílové DNA pro PV/NPEV nebo PV Sabin 1/3)

(in house metoda)

Multiplexní PCR

- Současná amplifikace několika různých sekvencí DNA
- WHO – International Reagent Resource
- Kit Poliovirus rRT-PCR ITD 5.1

6 reakcí : *odlišení PV Sabin1 / PV Sabin2/ PV Sabin 3 /PanEV*

PanPoliovirus

WPV1/Qbeta (interní kontrola)

Poliovirus typ 2

WPV3-AFRO

WPV3-SOAS

Kit Poliovirus rRT-PCR ITD VDPV 5.2

S1 VDPV

S3 VDPV

Materiály s PV

- Materiály s **PV** – zaslání do 7 dní do RRL Helsinky – ITD a sekvenace
- Zpětná informace z RRL do NRL o typu **PV**:

Vakcinální PV - Sabin (OPV)

OPV-like virus (>99% <100% shoda s OPV)

VDPV – z vakcíny derivovaný PV (<99% >82% shoda s OPV)

Divoký PV (<82% shoda s OPV)

NRL pro enteroviry – povinnost informovat

***příslušnou Krajskou hygienickou stanicí
nebo Zdravotní ústav,
odbor epidemiologie na MZ,
Národní komisi pro certifikaci polioeradikace***

Typizace enterovirů – dříve virusneutralizační test (VNT)

VNT – zjištění typu enterovirů

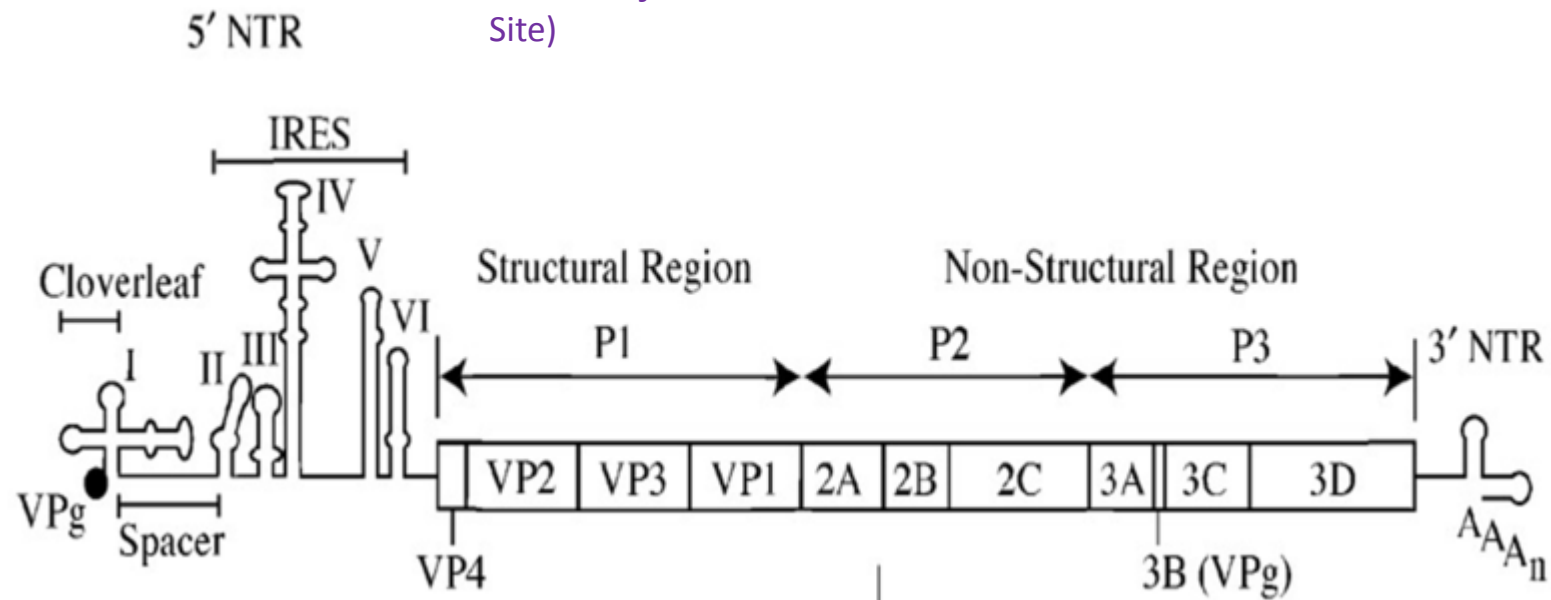
Princip :

- virové kmeny vytvářejí na tkáňových kulturách po určité době specifický CPE.
- Přidáním specifických antisér dojde k inaktivaci virového kmene a zábraně CPE.
- **VNT** – není již vhodný – ***náhrada sekvenací***
- ***nepřesnost*** – např. zvířecí antisérum proti CA11 reakce i s CA15,
zvířecí antisérum proti COXA13 i s CA18
- enteroviry 68-71 – nejednoznačné určení
- ***laboratorní náročnost*** – práce se zvířecími antiséry
- ***časová náročnost*** – práce s tkáňovými kulturami

Genom enteroviru

Kódující část genomu – VP1,2,3

Nekódující část-5' NTR – Cloverleaf + IRES (Internal Ribosome Entry Site)



Sekvenace nekódující oblasti 5'NTR

Výhody sekvenace nekódující oblasti :

- metoda robustní (relativní stabilita oblasti)
- primery (z práce z r. 1998) – stále použitelné
- možná typizace enterovirů i přes neustálé
- změny mutacemi a rekombinacemi
- (cirkulace v lidských a zvířecích hostitelích)

Nevýhody sekvenace nekódující oblasti :

- u některých izolátů nelze úplně přesná identifikace
(amplifikace krátkého úseku nekódující oblasti - pro některé enteroviry společná)

Sekvenace kódující oblasti VP1

Výhody sekvenace kódující oblasti :

- přesná identifikace, možnost fylogenetické analýzy

Nevýhody sekvenace kódující oblasti :

- častá nutnost změny primerů (bodové mutace v genech kódujících oblastí)
- např. primery na kódující oblast VP1 z práce M. Oberste - Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing z r. 2003 (již 3 r. nevhodné)

Sekvenace nekódující oblasti 5'NTR

Vyšetřovací metoda :

- RT-qPCR (*pro typizaci vybrán úsek z nekódující oblasti 5'RNA-IRES*)
- Primery (z práce T. Takami a spol., Usefulness of nested PCR and sequence analysis in a nosocomial outbreak of neonatal enterovirus infection. Journal of Clinical Virology 11 (1998) 67-75.) prodloužené o M13 sekvence
- Amplifikační produkt – 197 bp – kontrola pomocí ELFO
- Vyhodnocení sekvencí centrální databázi GenBank

Sekvenace kódující oblasti VP1

Vyšetřovací metoda :

- RT-qPCR – metoda doporučená WHO – Antwerpy - 2015
- *(pro typizaci vybrán úsek z kódující oblasti VP1)*

3 kroky :

- RT (4 primery-AN32, AN33, AN34, AN35),
- 1. PCR (2 primery-SO224,SO222),
- 2. PCR (2 primery-AN89, AN88)
- sekvenační amplifikace (2 primery-AN232, AN233 – nyní náhrada pool E2F, E2R)
- Amplifikační produkt – 762 bp po 1. PCR,
- 348-393 bp po 2. PCR – kontrola pomocí ELFO

Vyhodnocení sekvencí centrální databázi GenBank

Počet odběrů a výsledky, 2014 - 2020

	2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020	
Praha	24	1 poz ECHO11/13/ENT86/COX85	24	1 poz ECHO 11	24		24	1 poz COX 85	13	4 poz COX B2,5, A5, EV-A 71	10	2 poz NPEV	10	7 poz NPEV
Ostrava	15		13		12		11	3 poz NPEV, COX B5, ECHO25	12	4 poz EV-B4,COX B3, ECHO30	10	2 poz NPEV	15	9 poz NPEV
Brno	11		13	1 poz NPEV	12		12	1 poz NPEV	12	2 poz ECHO25	12	2 poz NPEV	12	3 poz NPEV
Plzeň	12		12	1 poz ECHO 7	11	3 poz NPEV	11	6 poz ECHO14, EV B, EV C, COX B5, ECHO 6/14, ECHO 25/6	12	5 poz COX A4,6, ECHO30	11	2 poz NPEV	5	1 poz NPEV
Ústí n. L.	12		12		12		11	1 poz EV C	12	5 poz ECHO 6, 14	12	3 poz NPEV	13	7 poz NPEV
H. Králové	12		12	1 poz NPEV	12		12	2 poz NPEV, ECHO 14	12	6 poz COX B5, ECHO6, 11, 30	12	2 poz NPEV	11	7 poz NPEV
Kostelec n. O.	12		12		12		12	4 poz COX B5, ENT B a C	12		12	2 poz NPEV	11	
Balková	0		0		0		12	4 poz COX B5, 10, ECHO 6,9,11, NPEV	12	1 poz NPEV	10	2 poz NPEV	11	2 poz NPEV
Č. Budějovice	12	1 poz NPEV	12		13	1 poz NPEV	11	1 poz COX A10, ECHO6	12	1 poz COX A6, ECHO14	12		12	8 poz NPEV
Rakovník	12		12		12	1 poz NPEV	11	5 poz ECHO 6, RhinoA 54, NPEV	12	4 poz COX B4,5 a A10, ECHO 30	12	2 poz NPEV	11	8 poz NPEV
K. Vary	0		6		12		12	1 poz RhinoA	12	5 poz COX B2, ECHO 11, 14, 30	11	2 poz NPEV	7	3 poz NPEV
Jezová	12	1 poz NPEV	12	1 poz NPEV	12	1 poz NPEV	12	4 poz ECHO 6,14, COX A10, EV B, NPEV	12	2 poz ECHO 14, COXA10	12		12	2 poz NPEV
Vyšší Lhoty	0		3		13	1 poz ECHO30	11	4 poz COX B5, NPEV	12	1 poz ECHO 18	12		11	2 poz NPEV
Zastávka u Brna	11		14	1 poz NPEV	12	1 poz NPEV	12	5 poz COX B5, NPEV	12	7 poz COX A6, EV B75	12	2 poz NPEV	12	3 poz NPEV

Environmentální surveillance – ENT/POLIO/SARS-CoV2-2021

Pořadí	Odběrové místo	Počet odběrů	Pozitivní – NPEV-viabilní	Pozitivní – NPEV-neviabilní	Pozitivní RNA – SARS-CoV-2
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 Č. 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 Kostelec 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

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

Environmentální surveillance – ENT/POLIO/SARS-CoV2-2022

Pořadí	Odběrové místo	Počet odběrů	Pozitivní – NPEV-viabilní	Pozitivní – NPEV-neviabilní	Pozitivní RNA – SARS-CoV-2
1.	ÚČOV Praha Trója	10	6	3	4
2.	ČOV Rakovník	10	4	2	3
3.	ČOV Plzeň (Jateční)	10	4	3	2
4.	ČOV pro Č. Budějovice (Hrdějovice)	9	2	3	1
5.	ČOV Ústí nad Labem	10	3	2	3
6.	ČOV Hradec Králové	9	3	1	4
7.	ČOV Kostelec nad Orlicí - PoS	9	1	0	0
8.	ČOV – Bělá pod Bezdězem Jezová - ZZC	9	3	2	2
9.	ČOV Brno (Modřice)	9	3	3	0
10.	ČOV Zastávka u Brna - PoS	9	3	1	0
11.	ČOV Ostrava (Oderská)	10	3	2	0
12.	ČOV Karlovy Vary (Drahovice)	10	2	2	2
13.	ČOV Vyšní Lhoty - ZZC	10	1	1	2
14.	ČOV Balková - ZZC	8	1	1	1
15.	ČOV Liberec	6	3	1	2
16.	ČOV Zlín	6	2	2	2
17.	ČOV Olomouc	5	0	3	1
18.	ČOV Jihlava	6	2	1	0
19.	ČOV Semtín (Pardubický kraj)	5	3	1	1

Děkuji za pozornost

Kontakt : MUDr. Petra Rainetová

Tel. : 267082333

E-mail : petra.rainetova@szu.cz

