Sledování cirkulace poliovirů, ostatních enterovirů a respiračních virů včetně SARC-CoV-2 v odpadních vodách v ČR v roce 2023

Surveillance of polioviruses, other enteroviruses and respiratory viruses including SARS-COV-2 in sewage in the Czech Republic in 2023

Petra Rainetová

Souhrn • Summary

NRL pro enteroviry (NRL/ENT) v SZÚ vyšetřuje v rámci environmentální surveillance odpadní vody z čističek 15 měst a 5 uprchlických táborů. V roce 2023 bylo vyšetřeno 239 vzorků odpadních vod. 179 vzorků bylo pozitivních. Pozitivní vzorky byly určeny jako non-polio-enteroviry (NPEV).

The National Reference Laboratory for Enteroviruses (NRL/ENT) at the National Institute of Public Health investigates sewage from sewage treatment plants in 15 cities and 5 refugee camps as part of environmental surveillance. In 2023, 239 sewage samples were tested. 179 samples were positive. The positive samples were determined to be non-polio-enteroviruses (NPEV).

Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2024; 33(1): 23–26

Klíčová slova: odpadní vody, polioviry, enteroviry

Keywords: sewage, polioviruses, enteroviruses

Národní referenční laboratoř pro enteroviry (NRL/ENT) v SZÚ je součástí sítě laboratoří Světové zdravotnické organice (WHO) vyšetřujících poliomyelitis – Global Polio Laboratory Network (GPLN), která byla WHO založena v roce 1990. GPLN zajišťuje surveillance akutních chabých paréz u dětí do 15 let věku, environmentální a enterovirovou surveillance [1–6, 9].

Environmentální surveillance Česká republika splňuje odběrem odpadních vod. Techniku odběru popsal hlavní hygienik 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 [1–6, 9].

NRL v rámci tohoto programu sleduje a vyšetřuje odpadní vody z vybraných lokalit - z hlavní městské kanalizace před čističkou odpadních vod v 15 městech Čech a Moravy: Praha, Rakovník, Plzeň, České Budějovice, Ústí nad Labem, Hradec Králové, Brno, Ostrava, Karlovy Vary, Liberec, Zlín, Olomouc, Jihlava, Pardubice, Dubí a z odvodu odpadních vod před vyústěním do další kanalizace 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 [9].

Ze vzorků odpadních vod se na buněčných kulturách izolují enteroviry, které jsou dále charakterizovány parciální sekvenací. Nejdůležitější jsou nálezy poliovirů a jejich zařazení mezi divoké, vakcinační a od vakcinačních odvozené (derivované) kmeny.

Vzorky odpadních vod se odebírají v daných lokalitách v pravidelných intervalech – 1× měsíčně. Do čisté transportní nádoby se odebírá 1 litr odpadní vody. Z jednoho místa proudící odpadní vody zhruba 30 cm pod hladinou se bere vždy pět vzorků. Nádoba se vzorky se následně transportuje při chladničkové teplotě (0–8° C) do NRL [1–6, 9].

WHO určila postup odběru odpadních vod, metodiku zpracování a permisivní buněčné linie pro izolaci polio a enterovirů v publikaci WHO „Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation" (World Health Organization, Department of Vaccines and Biologicals, 2003, 12–13) [7].

Zpracované vzorky se očkují na buněčnou linii RD (buněčná linie získaná z lidského rhabdomyosarkomu) a L20B (buněčná linie geneticky upravených myších buněk).

Enteroviry tvoří v tkáňové kultuře charakteristický cytopatický efekt (CPE), který je provázen zakulacováním a odpadáváním buněk. CPE je popisován škálou od + do ++++ (+ reprezentuje 25 % degenerovaných buněk, ++ 25–50 %, +++ 50–75 %, ++++ 75–100 %). Tkáňové kultury RD jsou vnímavé pro všechny enteroviry. Pouze polioviry vytváří CPE na tkáňových kulturách L20B, to je způsobeno vnesením lidského receptoru CD 155 pro vstup poliviru do buněk, což usnadňuje odlišení poliovirů od ostatních enterovirů.

Obě inokulované tkáňové kultury RD a L20B se denně kontrolují pod mikroskopem po dobu 5 dní. Pokud se do 5 dní nezpozoruje CPE, provede se další pasáž na stejnou buněčnou linii, na které byla předchozí pasáž. Pokud se po dalších 5 dnech neobjeví ani na jedné tkáňové kultuře CPE, uzavře se výsledek jako negativní. Pokud se projeví do 5 dní CPE na tkáňové kultuře RD, provede se pasáž na tkáňové kultuře L20B. V případě výskytu CPE i na L20B se vzorek naočkuje opět na RD. V případě CPE na RD se pozitivní tkáňová kultura zašle do 7 dní do Regionální referenční laboratoře (RRL) WHO v Helsinkách. Pokud je

Tabulka 1: Vyšetřování enterovirů a SARS-CoV 2 v odpadních vodách – 2023

Pořadí	Odběrové místo	Počet odběrů	Pozitivní záchyt NPEV – viabilní	Pozitivní – NPEV – neviabilní	Pozitivní záchyt RNA – SARS-CoV-2 (mutace)
1.	ÚČOV Praha (Troja)	12	8	4	9
			2x CVB4, 2x CVB5		(7x N501Y, 7x K417N, 2x E484A) XBB.1.5like
2.	ČOV Rakovník	12	8	2	4
			1x CVA6,2x CVB4		(3x N501Y, 4x K417N,1x P681R) omicron-like, BA.2.86like
3.	ČOV Plzeň (Jateční)	12	8	4	7
			1x CVB2,1x CVB5,1x E11		(4x N501Y, 5x K417N,1x E484A,1x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
4.	ČOV pro Č. Budějovice (Hrdějovice)	12	7	5	5
			1x CVB4, 2x CVB5		(2x N501Y, 2x K417N,1x E484A,1x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
5.	ČOV Ústí nad Labem	12	6	4	3
			1x CVB4,1x CVB5,1x E25		(2x N501Y, 3x K417N, 2x E484A,1x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
6.	ČOV Hradec Králové	12	7	4	2
			1x CVA4,1x CVB3, 2x CVB4,1x E7		(1x N501Y,1x K417N,1x P681R) BA.2.86like
7.	ČOV Kostelec nad Orlicí – PoS	12	1	1	1
			1x CVB5		(1x P681R) BA.2.86like
8.	ČOV – Bělá pod Bezdězem (Jezová) – ZZC	12	4	3	2
			2x CVB4,1x CVB5		(1x N501Y) omikron-like
9.	ČOV Brno (Modřice)	12	5	6	2
			1x CVB4		(1x N501Y, 2x K417N,1x E484A,1x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
10.	ČOV Zastávka u Brna – PoS	12	3	0	0
			2x CVB4		
11.	ČOV Ostrava (Oderská)	13	7	6	7
			1xCVB2,1xCVB4		(5x N501Y, 5x K417N,1x E484A) XBB.1.5like
12.	ČOV Karlovy Vary (Drahovice)	12	3	6	4
			1x CVB4		(3x N501Y, 3x K417N) omikron-like
13.	ČOV Vyšní Lhoty – ZZC	12	3	1	0
			1x CVB5		
14.	ČOV Balková – ZZC	12	1	2	1
			1x CVB4		(1x N501Y,1x K417N,1x E484A) XBB.1.5like
15.	ČOV Liberec	11	4	7	4
			1x CVB4		(3x N501Y,3x K417N, 2x E484A, 2x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
16.	ČOV Zlín	12	8	4	5
			1x CVB3,1x CVB4,1x E7,1x E11		(2x N501Y,2x K417N,1xE484A,1x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
17.	ČOV Olomouc	11	6	5	3
			1x CVA4,1x CVB2		(2x N501Y, 2x K417N,1x P681R) XBB.1.5like, BA.2.86like
18.	ČOV Jihlava	12	5	6	4
			1x CVA5, 3x CVB4		(2x N501Y, 3x K417N) omikron-like
19.	ČOV Pardubice (Semtín)	12	8	4	6
			1x CVA6, 2x CVB4, 2x CVB5,1x E11		(4x N501Y, 5x K417N,1x E484A) XBB.1.5like
20.	ČOV Dubí	12	2	1	0
			1x CVB4		
	Celkem	239	104	75	69

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

CPE na RD negativní, jednalo se o reoviry, adenoviry nebo jiné non-polio-enteroviry (NPEV) a výsledek je hlášen jako negativní na polioviry. Pokud se CPE vyskytne na L20B, provede se pasáž na RD. Při výskytu CPE na RD se vzorek také odešle do RRL [1–6, 9].

U všech vzorků odpadních vod je provedena RT – qPCR po zpracování metodou dvojfázové koncentrace a po 2. pasáži vzorků na tkáních RD za účelem zjištění viability viru.

Všechny výsledky se hlásí WHO v Laboratorním monitoracím datovém systému (LMDS) pro poliomyelitis.

Systémem několika PCR a parciální sekvenace se v NRL/ENT detekují a charakterizují enteroviry a polioviry, jak divoký tak vakcinální či od vakcinálního kmene derivovaný, včetně určení, zda se jedná o atenuovaný kmen pocházející z OPV (orální poliomyelitické vakciny). V NRL jsou všechny vzorky pozitivní na enteroviry dále zařazeny do genotypů dle parciální sekvenace povrchových proteinů VP1.

Všechny vzorky s podezřením na přítomnost polioviru se odesílají na konfirmaci a další charakterizaci do RRL:.

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 %, tak se jedná o divoký kmen polioviru. VDPV vznikají v důsledku opakované cirkulace vakcinačního kmene polioviru, v nedostatečně imunní populaci, kdy dochází k bodovým mutacím, které se týkají jednoho nebo dvou nukleotidů za týden, 1–2 % nukleotidů za rok.

Mimo povinnosti zaslání pozitivních izolátů do RRL je nutno nález oznámit příslušné Krajské hygienické stanici nebo Zdravotnímu ústavu, Ministerstvu zdravotnictví a Národní komisi pro certifikaci polioeradikace.

V roce 2023 NRL vyšetřila celkem 239 vzorků odpadních vod (viz **tabulka 1**). Negativních bylo 60 vzorků. Ve 179 vzorcích byl zjištěn non-polio-enterovirus (NPEV), z nich pozitivních viabilních, schopných se pomnožit na

Tabulka 2: Vyšetřování respiračních virů v odpadních vodách – 2023

Pořadí	Odběrové místo	Počet odběrů	Chřipka A H1N1	Chřipka A H3N2	Chřipka B	Respirační syncytiální virus	Rhinovirus	Bocavirus	Parainfluenza	Adenovirus	Parechovirus	Sezónní koronavirus	Lidský metapneumovirus
1.	ÚČOV Praha (Troja)	6	0	0	0	0	1	3	1	4	2	0	0
2.	ČOV Rakovník	8	0	0	0	0	1	3	1	4	3	0	0
3.	ČOV Plzeň (Jateční)	6	0	0	0	0	1	4	1	5	1	0	0
4.	ČOV Č. Budějovice (Hrdějovice)	7	0	0	0	0	0	2	1	2	3	0	0
5.	ČOV Ústí nad Labem	7	0	0	0	0	1	1	0	4	1	0	0
6.	ČOV Hradec Králové	6	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	0
7.	ČOV Kostelec nad Orlicí – PoS	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	ČOV Bělá pod Bezdězem Jezová– ZZC	7	0	0	0	0	3	1	1	1	0	0	0
9.	ČOV Brno (Modřice)	7	0	0	0	0	2	5	4	6	0	0	0
10.	ČOV Zastávka u Brna – PoS	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
11.	ČOV Ostrava (Oderská)	8	0	0	0	0	1	4	0	5	5	0	0
12.	ČOV Karlovy Vary (Drahovice)	9	0	0	0	0	2	3	4	5	4	0	0
13.	ČOV Vyšní Lhoty – ZZC	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	ČOV Balková – ZZC	8	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0
15.	ČOV Liberec	7	0	0	0	0	0	6	0	5	4	0	0
16.	ČOV Zlín	8	0	0	0	0	0	2	2	5	5	0	0
17.	ČOV Olomouc	8	0	0	0	0	1	3	2	8	3	0	0
18.	ČOV Jihlava	8	0	0	0	0	3	2	5	7	4	0	0
19.	ČOV Pardubice (Semtín)	8	0	0	0	0	2	5	1	5	4	0	0
20.	ČOV Dubí	8	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
	Celkem	**147**	**0**	**0**	**0**	**0**	**23**	**44**	**23**	**71**	**42**	**0**	**0**

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

tkáňových kulturách RD bylo 104 vzorků.

Osekvenovat se podařilo 51 vzorků. Prokázaným non-polio-enterovirem byl 2× Coxsackievirus A4 (CVA4), 1× Coxsackievirus A5 (CVA5), 2× Coxsackievirus A6 (CVA6), 3x Coxsackievirus B2 (CVB2), 2× Coxsackievirus B3 (CVB3), 23× Coxsackievirus B4 (CVB4), 11× Coxsackievirus B5 (CVB5), 2× ECHO virus 7 (E7), 3× ECHO virus 11 (E11) a 1x ECHO virus 25 (E25).

V roce 2023 byly všechny vzorky odpadních vod testovány na také přítomnost RNA SARS-CoV-2. V 69 pozitivních vzorcích byly zjištěny metodou diskriminační PCR sledovány SNP (záměny jednoho nukleotidu vedoucí k záměně aminokyseliny) - N501Y, K417N, E484A, E484K, P681R, L452R a T547K (viz **tabulka 1**). Kombinace mutací a znalost epidemické situace umožňuje hrubé rozlišení majoritně zastoupených variant v OV a jejich přiřazení k linii BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, XBB.1.5 – respektive EG.5.1 a BA.2.86 - respektive JN.1.

Nově se v roce 2023 ve vybraných vzorcích odpadních vyšetřovaly i respirační viry (viz **tabulka 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] Rainetová P. Sledování cirkulace poliovirů a ostatních enterovirů v odpadních vodách v ČR v roce 2021. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2022; 31(3): 107

[7] Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, Vaccines and Biologicals, WHO, 2003

[8] Enterovirus surveillance guidelines, WHO, 2015

[9] Rainetová P. Odpadní vody 2022. Environmentální surveillance 2022. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2023; 32(4): 172–174

MUDr. Petra Rainetová
NRL pro enteroviry, CEM SZÚ