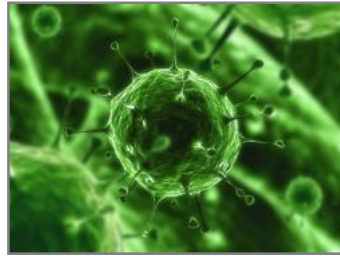


# Výskyt významných virů způsobujících alimentární infekce v povrchových i pitných vodách ČR



**Petra Vašíčková, Michal Šereš, Jakub Hrdý, Petra Innemanová, Petr Králík, Iva Slaná**

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Brno

**Vodárenská biologie 2020**  
5.-6.2.2020 Praha

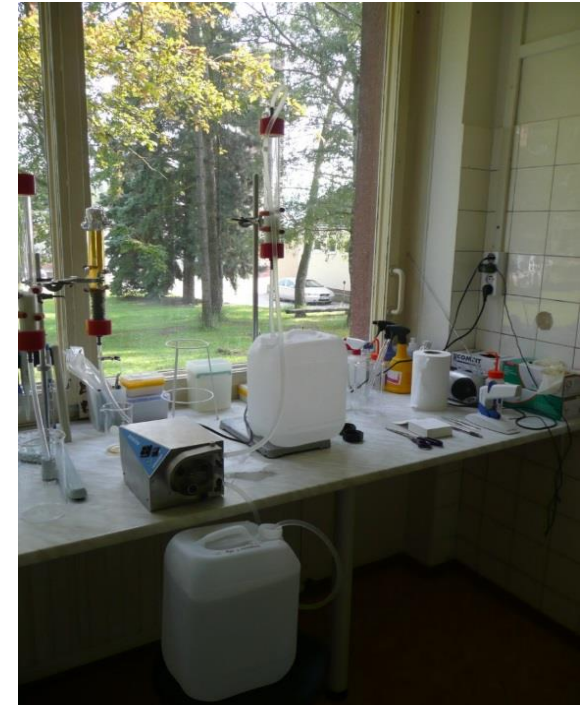
# Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

1. **Virologie a diagnostika**
2. **Bakteriologie**
3. **Imunologie**
4. **Bezpečnost potravin a krmiv**
5. **Genetika a reprodukce**
6. **Chemie a toxikologie**
7. **Farmakologie a imunoterapie**



# Oddělení Bezpečnost potravin a krmiv

1. Mykobakteriální infekce (tuberkulóza, paratuberkulóza, mykobakteriózy zvířat)
2. Parazitologie potravin
3. Bakteriologie potravin
4. Virologie potravin
5. Průkaz falšování potravin



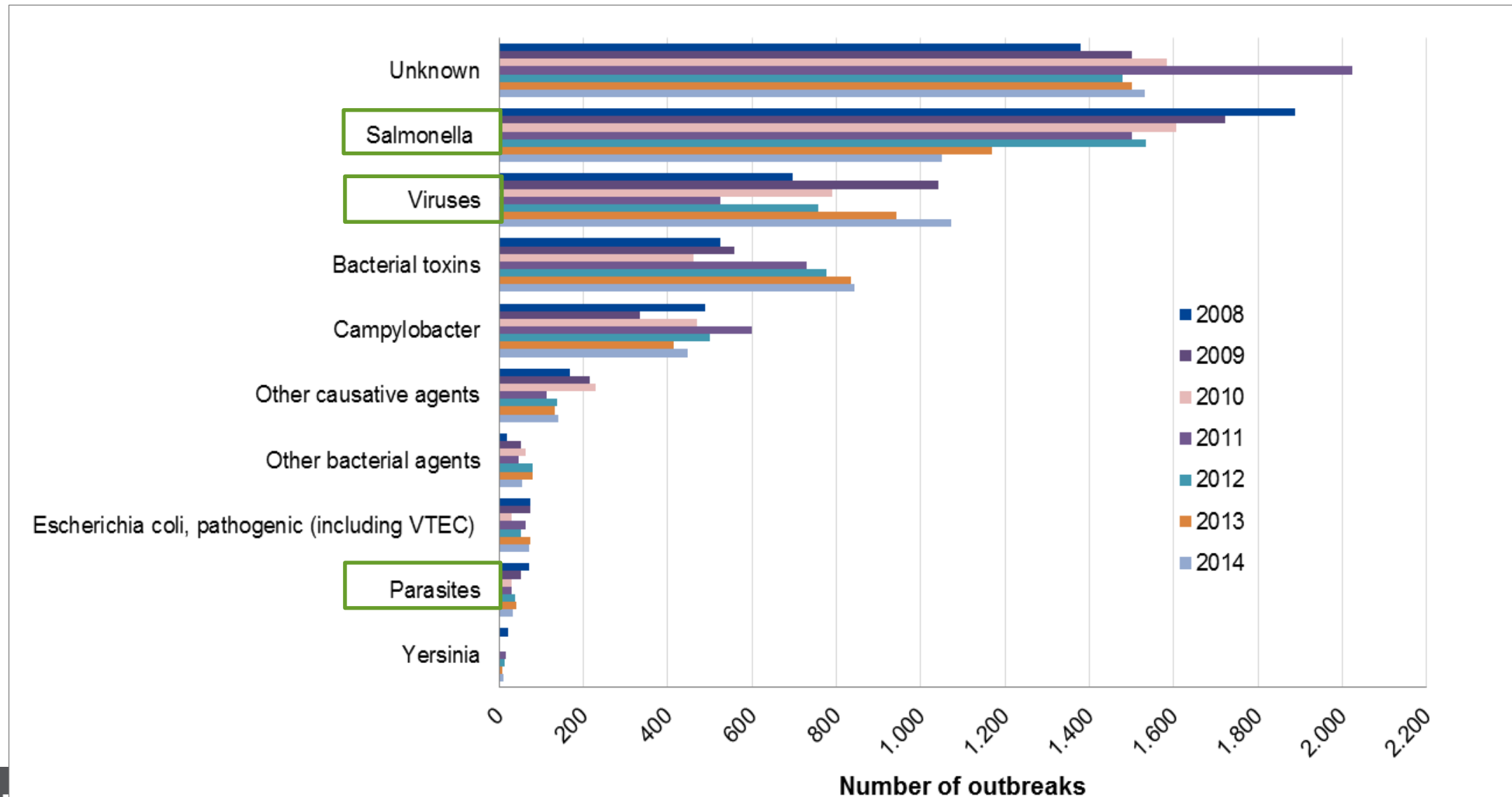
# Pracovní skupina Virologie potravin

- **Noroviry (NoV GI, NoV GII), virus hepatitidy A, virus hepatitidy E, adenoviry (indikátory fekálního znečištění × AdV 40/41)**
- **Potraviny, prostředí jejich produkce (akreditace ISO17025:2005)**
  - Potraviny rostlinného původu
  - Potraviny živočišného původu
  - Prostředí jejich produkce (stěry, voda)
- **Molekulární epidemiologie/epizootologie**
  - Dosledování zdroje kontaminací, vehikula
  - Porovnání sekvencí specifických oblastí genomu prokázaných agens





# Výskyt původců alimentárních onemocnění EU, 2008-2014



# Obecné vlastnosti virů způsobujících alimentární onemocnění

- Infekce po pozření kontaminované potravy/vody (čištění zubů, i aerosol - sprchování)
- **V potravinách/vodě se nemnoží → nemění sensorické vlastnosti**

Matrice	Teplota	Doba „přežití“	Virus
Hlávkový salát, jahody, šunka	4, 10 a 21°C	> 7 dní	NoV
Voda, mléko	63 a 72 °C	10 min	NoV, HAV
Borůvky, maliny, jahody, bazalka, petržel	- 20°C	90 dní	NoV, HAV
Zelí, hlávkový salát	4, 25 a 37°C	21 dní	NoV, HAV
Podzemní voda	10°C	3 roky	NoV

# Obecné vlastnosti virů způsobujících alimentární onemocnění

Proces	Potravina	Vliv
90°C/90 sec	mlži	inaktivace
Oplach	drobné ovoce, listový salát	1,5 log redukce
Tlak 375 MPa/21°C/5 min	ovocné šťávy	4,3 log redukce
UV	ovoce, zelenina, voda	1 - 5 log redukce
Okyselení (pH 3)	ovocné šťávy	téměř bez efektu
Chlorování 0.41 mg/L	voda	2 log redukce (závislost na čistotě vody)

# Role vody v přenosu virů způsobujících alimentární onemocnění

- **Pitná voda**

- ✓ Rozvojové země - nedostatečné hygienické podmínky !!!
- ✓ Mytí, oplach potravin určených k přímé spotřebě



- **Užitková voda**

- ✓ Zavlažování - čerstvé ovoce a zelenina
- ✓ Ústřice





# Původci alimentárních onemocnění

(Harrison and DiCaprio, 2018)

Genom	Čeď	Zástupci	Klinické příznaky
ds DNA	<i>Adenoviridae</i>	adenovirus sérotyp 40/41	zvracení, průjem (zejména děti)
	<i>Polyomaviridae</i>	JC polyomavirus	neurologické příznaky
ds RNA	<i>Reoviridae</i>	rotavirus (genoskupina A)	zvracení, průjem (zejména děti)
-ss RNA	<i>Ortomyxoviridae</i>	virus chřipky	chřipkové příznaky, průjem
+ss RNA	<i>Astroviridae</i>	lidský astrovirus sérotyp 1	zvracení, průjem (zejména děti)
	<i>Caliciviridae</i>	<b>norovirus GI a GII</b>	<b>zvracení, průjem</b>
	<i>Hepeviridae</i>	virus hepatitidy E	hepatitida
	<i>Flaviviridae</i>	virus klíšťové encefalitidy	podobné chřipce, vyrážka, neurologické příznaky
	<i>Picornaviridae</i>	<b>virus hepatitidy A, poliovirus, enterovirus A 71, aichivirus</b>	<b>hepatitida, neurologické příznaky, obrna, myokarditidy, průjem</b>

# Původci alimentárních onemocnění (EU, 2016)

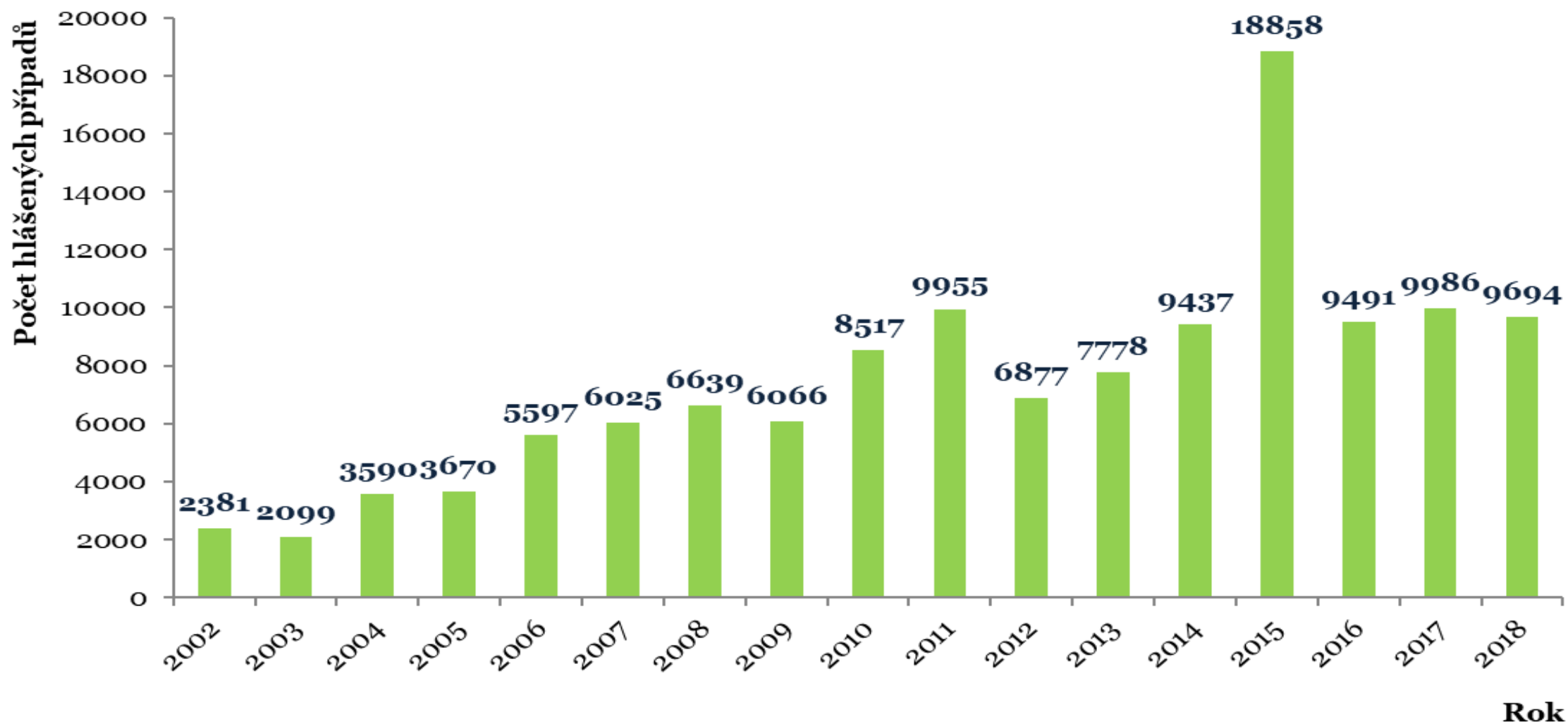
Patogen		Počet hlášených epidemií	Počet hlášených případů		
			N	Hospitalizace (%)	Úmrtí (%)
Bakterie	<i>Campylobacter</i>	461	4 606	140 (3,0)	0 (0)
	<i>Listeria</i>	5	25	14 (56,0)	2 (8,0)
	<i>Salmonella</i>	1 067	9 061	1 766 (19,5)	10 (0,1)
	<i>E. coli (STEC)</i>	42	735	125 (17,0)	3 (0,4)
	<i>Vibrio</i>	8	76	50 (65,8)	0 (0)
	<i>Yersinia</i>	8	41	3 (7,3)	0 (0)
	Jiné	30	279	51 (18,3)	1 (0,4)
	<b>Celkem</b>	<b>1 621</b>	<b>14 823</b>	<b>2 149 (14,5)</b>	<b>16 (0,4)</b>
Bakteriální toxiny	<i>C. botulinum</i>	18	49	39 (79,6)	0 (0)
	Jiné bakteriální toxiny	830	8 918	362 (4,1)	1 (<0,1)
	<b>Celkem</b>	<b>848</b>	<b>8 967</b>	<b>401 (4,5)</b>	<b>1 (&lt;0,1)</b>
Viry	<b><i>Caliciviridae (noroviry)</i></b>	<b>379</b>	<b>11 993</b>	<b>404 (3,4)</b>	<b>1 (&lt;0,1)</b>
	<b>Virus hepatitidy A</b>	<b>16</b>	<b>155</b>	<b>63 (40,6)</b>	<b>0 (0)</b>
	<b>Jiné/ nespecifikováno</b>	<b>75</b>	<b>937</b>	<b>97 (10,4)</b>	<b>0 (0)</b>
	<b>Celkem</b>	<b>470</b>	<b>13 085</b>	<b>564 (4,3)</b>	<b>1 (&lt;0,1)</b>
Parazité	<i>Cryptosporidium</i>	6	62	0 (0)	0 (0)
	<i>Trichinella</i>	5	14	9 (64,3)	0 (0)
	Jiná/ nespecifikováno	7	17	0 (0)	0 (0)
	<b>Celkem</b>	<b>18</b>	<b>93</b>	<b>9 (9,7)</b>	<b>0 (0)</b>
Jiná agens	<b>Celkem</b>	<b>106</b>	<b>489</b>	<b>74 (15,1)</b>	<b>0 (0)</b>
Neurčená agens	<b>Celkem</b>	<b>1 723</b>	<b>12 493</b>	<b>672 (5,4)</b>	<b>2 (&lt;0,1)</b>
<b>Celkem (EU)</b>		<b>4 786</b>	<b>49 950</b>	<b>3 869 (7,7)</b>	<b>20 (&lt;0,1)</b>

# Noroviry

- Inkubační doba 12 – 48 hod
- Průjmy a zvracení 1 – 3 dny
- Problém dehydratace (děti, senioři)
- 16 - 30 % infekcí bez příznaků
- Virus vylučován i po odeznění příznaků
- Infekční dávka 10 – 100 virových částic
  
- Diskutován zoonotický přenos



## Virové střevní infekce (A08), počet hlášených onemocnění v ČR, Epidat (2002-2018)



# Virové hepatitidy

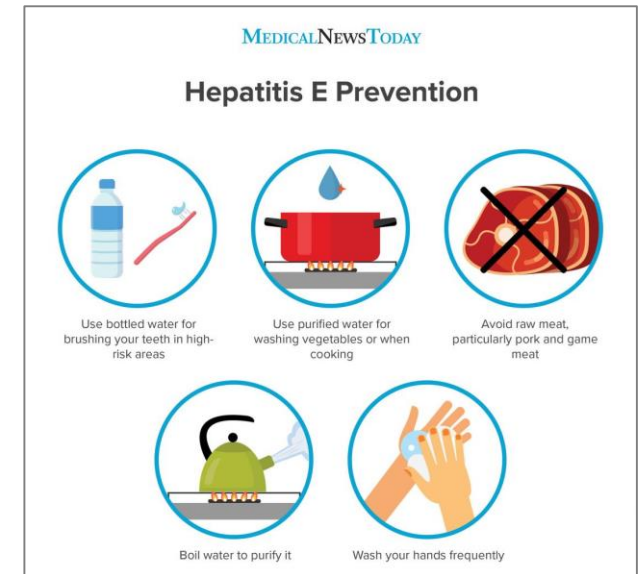
## ➤ Virus hepatitidy A

- **ANTROPONÓZA**

## ➤ Virus hepatitidy E

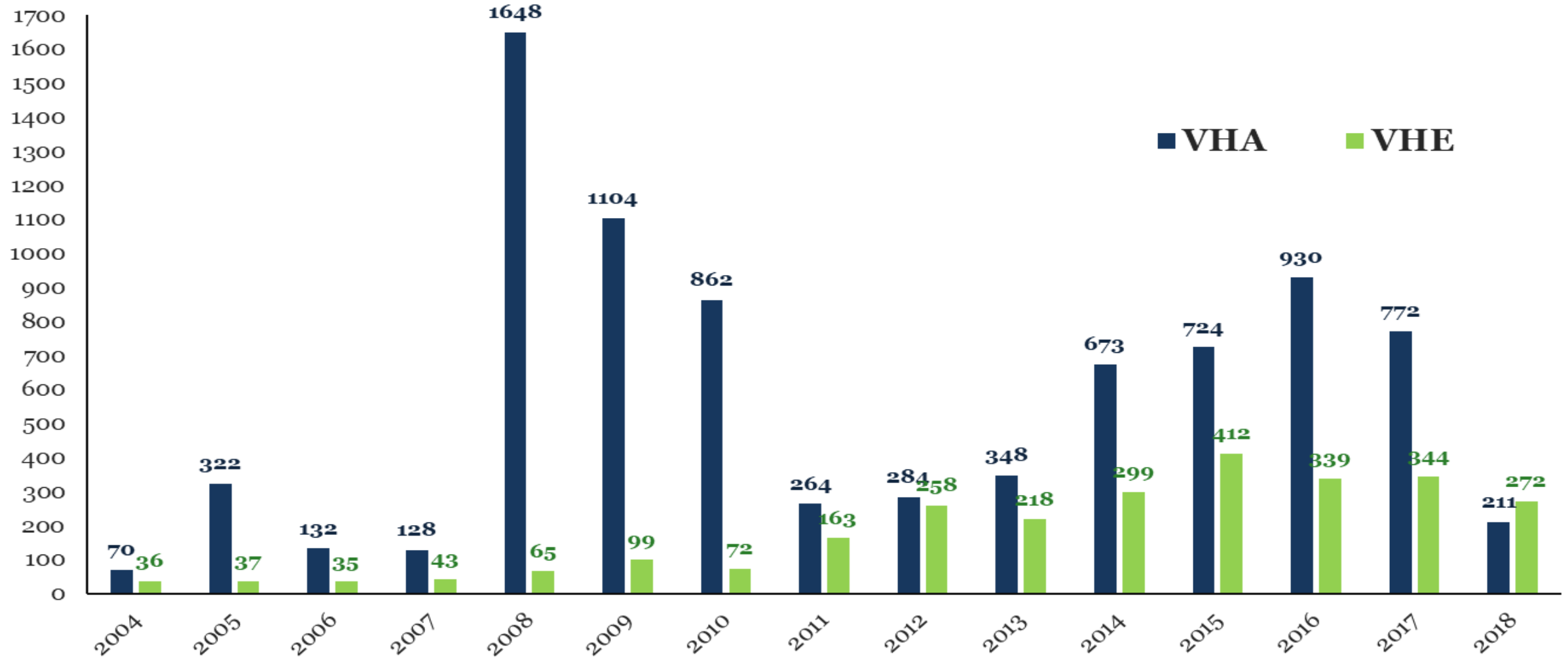
- **ZOONÓZA** (rezervoár prasata domácí, divoká a jelenovití)

- Inkubační doba 2-8 týdnů
- Únavnost, zvýšená teplota, horečka, nechutenství, zvracení, ikterus, zvýšené hladiny jaterních enzymů
- Onemocnění 3-4 týdny
- Infekce často bez příznaků



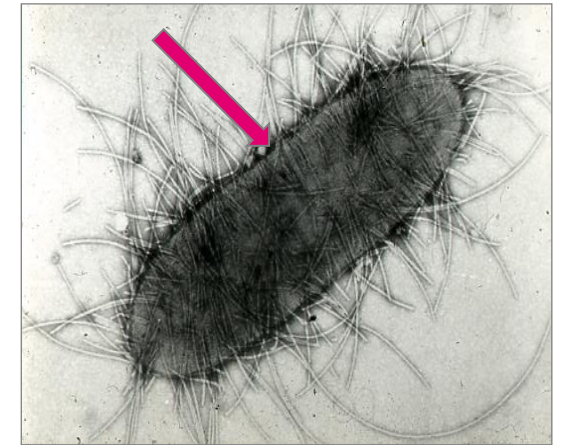


## Hepatitida A (B15) a hepatitida E (B17.2), počet hlášených případů v ČR, Epidat (2004-2018)



# Průkaz virů ve vodě

- V prostředí/potravinách malé množství virových částic → potřeba dostatečně citlivé metody
- Problémové kultivace virů na buněčných liniích → molekulárně biologické metody (PCR, RT-PCR)



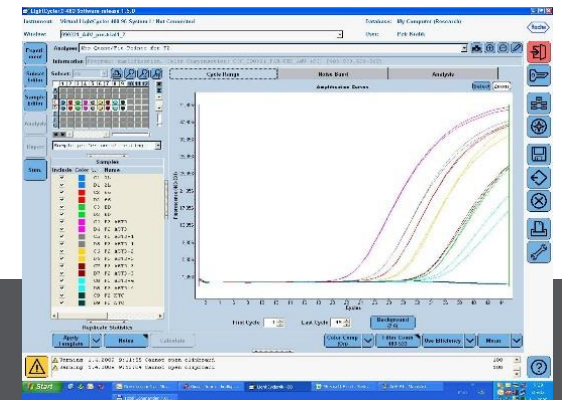
# Průkaz virů ve vodě

- **Adsorpce virových částic na negativně nabitě filtry**
  - 10 l
  - Limit detekce 10 000/l virových částic
- **Přímá flokulace**
  - 200 ml, silně znečištěná voda
  - Limit detekce 50 000/l virových částic



# Průkaz virů ve vodě

- **Molekulární metody - qPCR, RT-qPCR**
    - Průkaz genomu agens
    - Kvantifikace – DNA/RNA koncentrační gradient
    - Problém s falešně negativními výsledky – inhibiční faktory (externí kontrola analýzy, interní amplifikační kontrola)
  - **Humánní adenoviry – indikátory fekálního znečištění**
  - **Noroviry (NoV GI, NoV GII), virus hepatitidy A, virus hepatitidy E, adenovirus**
- 40/41
- Molekulární epidemiologie – charakteristika genomu agens

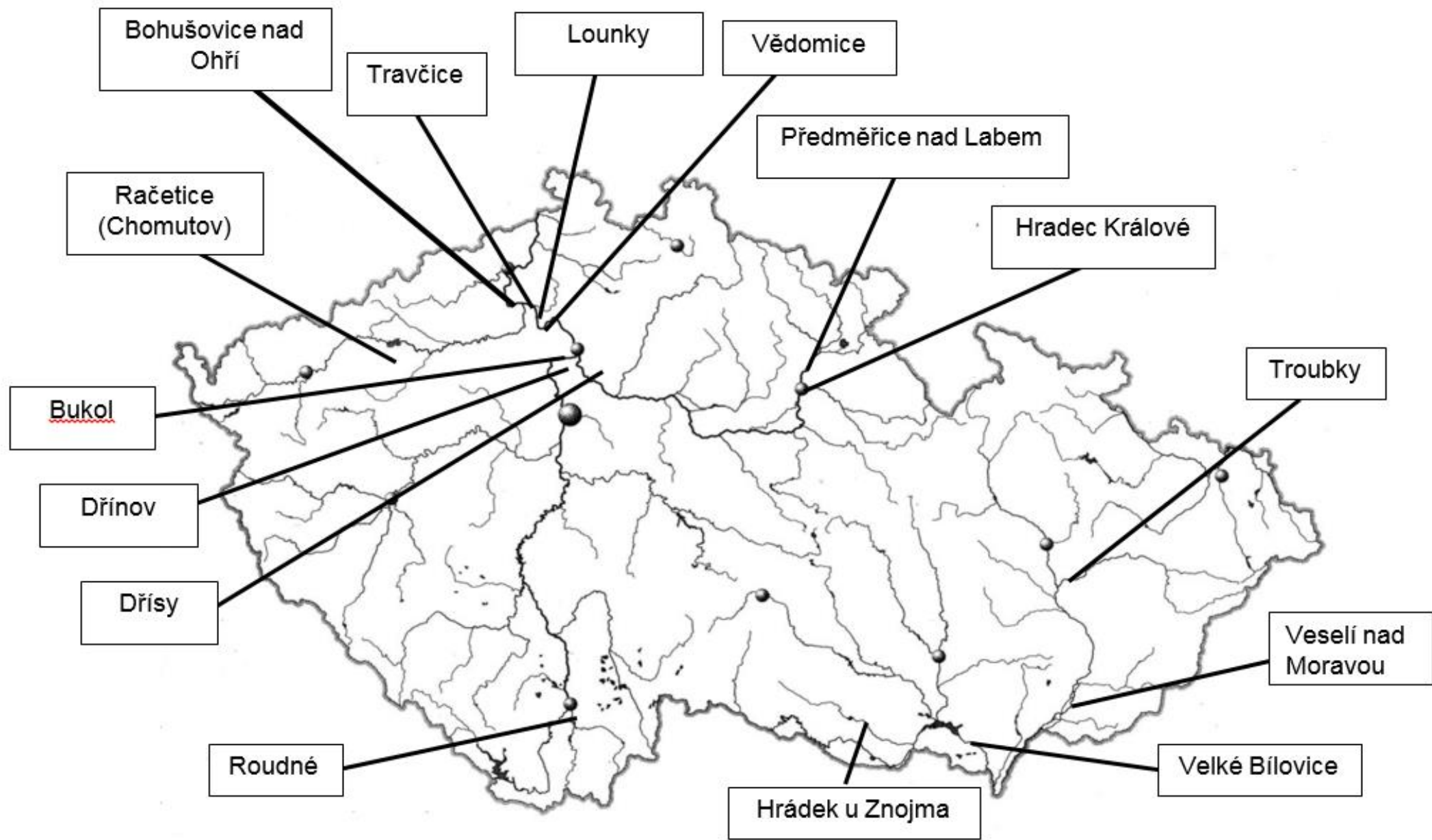


# Voda ČR (v souvislosti s ovocem a zeleninou, 2013-2016)

Farmy	NoV	HAV
Zelenina	<b>1/318</b>	<b>0/318</b>
Voda	<b>1/12</b>	<b>0/12</b>
Prostředí (stěry)	<b>0/58</b>	<b>0/58</b>
Bylinky	<b>4/115</b>	<b>0/115</b>
Voda	<b>5/14</b>	<b>0/14</b>
Prostředí (stěry)	<b>2/80*</b>	<b>0/80</b>
Jahody	<b>2/156</b>	<b>0/156</b>
Voda	<b>3/23</b>	<b>0/23</b>
Prostředí (stěry)	<b>3/218*</b>	<b>0/218</b>







# Povrchová voda ČR (odběr jaro × podzim, 2018-2019)

Lokalita	AdV		AdV 40/41		NoV GI		NoV GII		HAV		HEV	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
I	+/+	-/+	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
II	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
III	+/+	+/+	+/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
IV	+/-	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
V	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
VI	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
VII	+/+	+/-	-/+	+/-	-/+	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
VIII	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
IX	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
X	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
XI	+/+	+/+	+/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
XII	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
XIII	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
XIV	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
XV	+/+	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

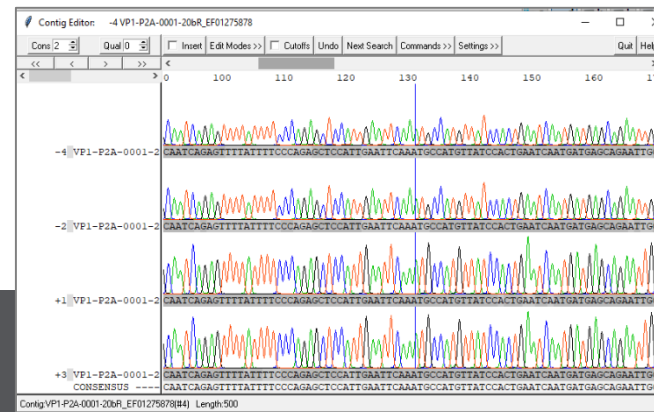
(Projekt Mze QK1810212)

# ČOV (odběr vzorků - vstup × výstup, 4×, 2019)

Agens	Lokalita 1 (vstup/výstup)				Lokalita 2 (vstup/výstup)				Lokalita 3 (vstup/výstup)				Lokalita 4 (vstup/výstup)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
AdV	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
AdV 40/41	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+
NoV GI	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/-
NoV GII	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
HAV	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
HEV	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

# Sledování kontaminací pitné vody (epidemiologické souvislosti)

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<b>NoV GI</b>	5 / 10	2 / 14	6 / 32	6/40	3/26	2/23	2/44
<b>NoV GII</b>	5/10	1/ 14	9 / 32	5/40	0/26	1/23	1/44



# Molekulární epidemiologie

- Dosledování zdroje kontaminací, vehikula
- Porovnání sekvencí specifických oblastí genomu prokázaných agens → potvrzení × vyvrácení

## zdroje

MX: Alignment Explorer (CZNoV\_GI-unikatni-VUVE-vse.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrev

1. NoV\_GI-1260-19  
2. NoV\_GI-1251-19  
3. NoV\_GI-1087-19  
4. NoV\_GI-1054-19  
5. NoV\_GI-1051-19  
6. NoV\_GI-1050-19  
7. NoV\_GI-1011-19  
8. NoV\_GI-0598-19  
9. NoV\_GI-1058-18  
10. NoV\_GI-1015-18  
11. NoV\_GI-1057-18  
12. NoV\_GI-0953-18  
13. NoV\_GI-0951-18  
14. NoV\_GI-0950-18  
15. NoV\_GI-0887-18  
16. NoV\_GI-0683-18  
17. NoV\_GI-0673-18  
18. NoV\_GI-0340-18  
19. NoV\_GI-0145-18  
20. NoV\_GI-0134-18  
21. NoV\_GI-0132-18  
22. NoV\_GI-0122-18  
23. NoV\_GI-0121-18  
24. NoV\_GI-0120-18  
25. NoV\_GI-0114-18  
26. NoV\_GI-0113-18  
27. NoV\_GI-0111-18  
28. NoV\_GI-1829-17  
29. NoV\_GI-1827-17  
30. NoV\_GI-1824-17  
31. NoV\_GI-1820-17  
32. NoV\_GI-1819-17



# Molekulární epidemiologie

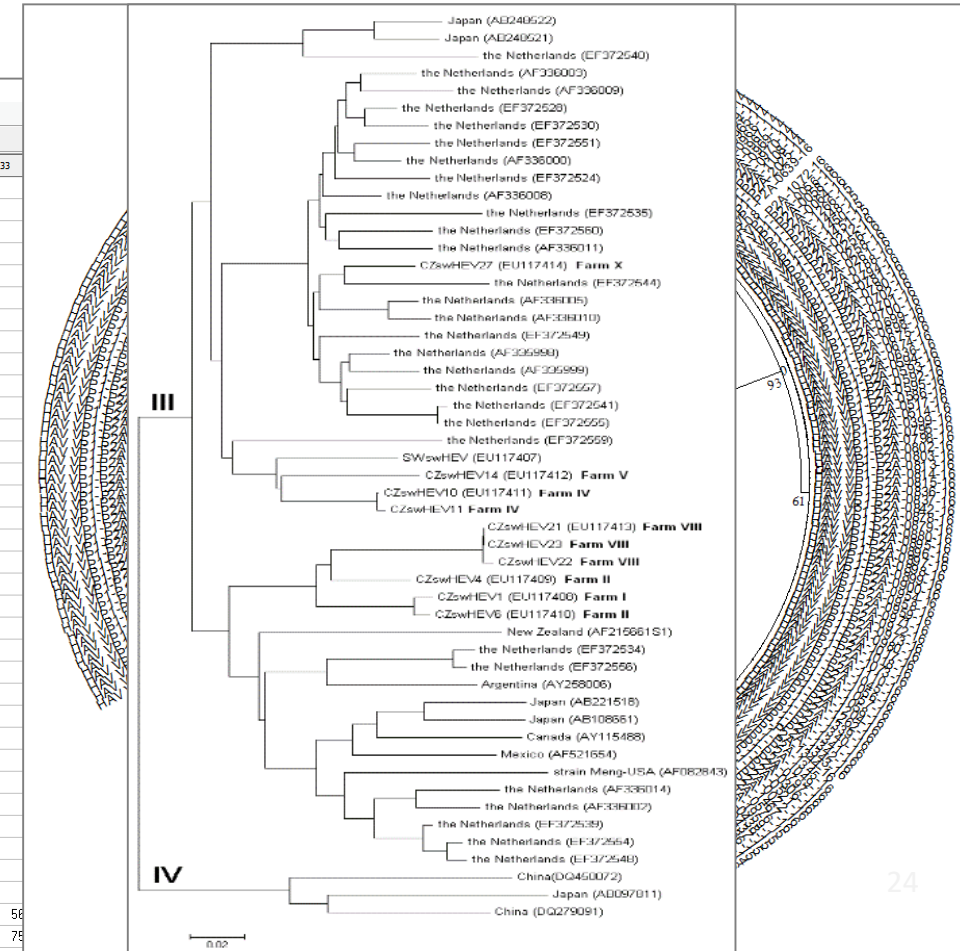
- Dosledování zdroje kontaminací, vehikula
- Porovnání sekvencí specifických oblastí genomu prokázaných agens → potvrzení × vyvrácení

## zdroje

MX: Pairwise Distances (PhyloAnalysis.meg)

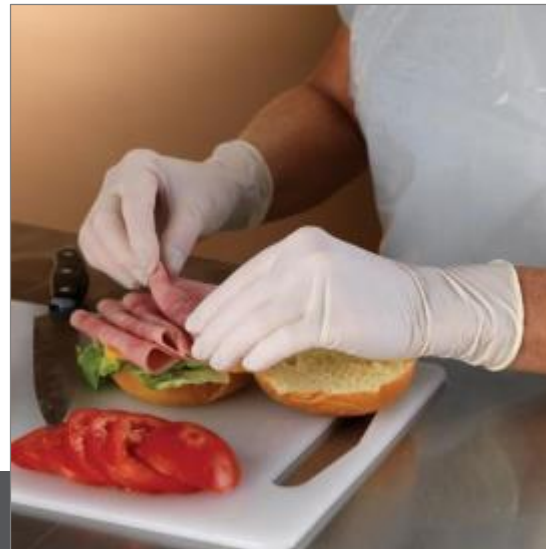
File Display Average Caption Help

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
1. NoV GI-1260-19	1																																		
2. NoV GI-1251-19	60	1																																	
3. NoV GI-1087-19	59	5	1																																
4. NoV GI-1054-19	59	5	0	1																															
5. NoV GI-1053-19	60	6	1	1	1																														
6. NoV GI-1051-19	59	6	1	1	2	1																													
7. NoV GI-1050-19	58	6	1	1	2	2	1																												
8. NoV GI-1011-19	58	6	1	1	2	2	2	1																											
9. NoV GI-0994-19	13	67	67	67	68	67	66	66	66	1																									
10. NoV GI-0598-19	53	59	59	59	59	59	58	58	56	2	61																								
11. NoV GI-1058-18	14	72	71	71	72	71	70	70	2	61																									
12. NoV GI-1015-18	15	75	74	74	75	74	73	73	1	62	3																								
13. NoV GI-1057-18	14	74	73	73	74	73	72	72	2	61	2	1																							
14. NoV GI-0953-18	14	74	73	73	74	73	72	72	2	61	2	1	0																						
15. NoV GI-0951-18	14	74	73	73	74	73	72	72	2	61	2	1	0	0																					
16. NoV GI-0950-18	14	74	73	73	74	73	72	72	2	61	4	1	2	2	2																				
17. NoV GI-0887-18	15	75	74	74	75	74	73	73	1	62	3	0	1	1	1	1																			
18. NoV GI-0683-18	15	75	74	74	75	74	73	73	1	62	3	0	1	1	1	1	0																		
19. NoV GI-0673-18	75	70	66	66	65	66	65	65	67	59	71	72	71	71	71	73	72	72																	
20. NoV GI-0340-18	57	50	55	55	56	56	55	56	53	56	61	62	63	63	63	61	62	62	71																
21. NoV GI-0145-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	62	66	69	68	68	68	70	69	69	56	58															
22. NoV GI-0134-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	62	66	69	68	68	68	70	69	69	56	58	0														
23. NoV GI-0132-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	62	66	69	68	68	68	70	69	69	56	58	0	0													
24. NoV GI-0122-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	61	66	69	68	68	68	70	69	69	56	59	1	1	1												
25. NoV GI-0121-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	61	66	69	68	68	68	70	69	69	56	59	1	1	1	0											
26. NoV GI-0120-18	69	63	59	59	58	58	58	58	61	62	67	70	69	69	69	71	70	70	57	60	2	2	2	1	1										
27. NoV GI-0115-18	64	60	57	57	56	56	56	56	60	58	63	65	64	64	64	66	65	65	56	56	1	1	1	0	0	1									
28. NoV GI-0114-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	61	66	69	68	68	68	70	69	69	56	59	1	1	1	0	0	1	0								
29. NoV GI-0113-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	62	66	69	68	68	68	70	69	69	56	58	0	0	0	1	1	2	1	1							
30. NoV GI-0111-18	68	62	58	58	57	57	57	57	60	61	66	69	68	68	68	70	69	69	56	59	1	1	1	0	0	1	0	0	1						
31. NoV GI-1829-17	80	67	67	67	67	68	66	66	72	63	77	78	77	77	77	79	78	78	41	63	57	57	57	57	57	58	57	57	57	57					
32. NoV GI-1827-17	68	62	58	58	57	57	57	57	60	62	66	69	68	68	68	70	69	69	55	58	1	1	1	2	2	3	2	2	1	2	57				
33. NoV GI-1824-17	80	67	67	67	67	68	66	66	72	63	77	78	77	77	77	79	78	78	41	63	57	57	57	57	58	57	57	57	57	0	57				
34. NoV GI-1820-17	66	60	56	56	55	55	55	55	58	61	64	67	66	66	66	68	67	67	54	58	2	2	2	2	3	2	2	2	56	3					
35. NoV GI-1819-17	18	74	73	73	74	73	72	72	4	61	6	3	4	4	4	4	3	3	69	63	68	68	68	68	68	69	64	68	68	68	75	68	75		



# Prevence alimentárních infekcí

- **Základ zdravá a nekontaminovaná surovina**
- Dodržování správné hygienické praxe při produkci a zpracování surovin/potravin
- Zabránění manipulace s potravinami infikovaným osobám
- Používání rukavic



# Prevence alimentárních infekcí

- **Použití prověřených zdrojů pitné vody**
  - Voda k zavlažování možný problém u zeleniny, u drobného ovoce často nedochází ke kontaktu vody a souplodí/plodu
  - Možný problém voda „z vlastních zdrojů“ určená k oplachům
- **Vhodná tepelná úprava**
  - Zamražení viry konzervuje, chladničková teplota prodlužuje dobu jejich přežívání, okyselení a tepelné opracování při mírných teplotách vede k malému snížení počtu virionů!!!

# Závěry

- V rámci stanovení mikrobiologické kvality vody zavést sledování také výskytu virových agens (vhodnější indikátory fekálního znečištění, nejčastější původci)
  - Indikátory fekálního znečištění - bakteriofág MS2, adenoviry, polyomaviry
  - Možnost rozlišit zdroj fekálních kontaminací – humánní × zvířecí (prasata, skot)
- *Codex Alimentarius* – sledování kvality vody určené k zavlažování se zaměřením na virová agens
- Zlepšit dostupné metody (citlivost, stanovení infekčních virových agens, multiplexní metody)
- Stanovit rizika spojená s kontaminovanou vodou - připravit a zveřejnit nápravná opatření

## Co nabízíme:

- **Konzultace**
- **Vyšetření vzorků (akreditované metody)**
  - Ovoce
  - Zelenina
  - Humánní vzorky (stolice, sérum, ...)
  - Masné výrobky, žluč, jaterní tkáň, trus
  - Voda
  - Stěry
  - „Mořské plody“
- **Patogeny**
  - Virus hepatitidy E
  - Virus hepatitidy A
  - Noroviry
  - Adenoviry
  - Po domluvě i jiné viry
- **Molekulární epidemiologie**

## Kontaktní údaje:

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Oddělení Bezpečnost potravin a krmiv  
Hudcova 70  
Brno  
621 00

-----  
Tel.: +420 777 786 756  
-----

E-mail: [vasickova@vri.cz](mailto:vasickova@vri.cz)  
[www.vri.cz](http://www.vri.cz)

