

Stanovení virových agens ve vodě – od odběru vzorku po interpretaci výsledků

P. Vašíčková, J. Hrdý, M. Kubánková, P. Mikel
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Brno

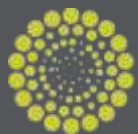


VUVeL

VODÁRENSKÁ BIOLOGIE 2017
1.-2.2.2017, Hotel DAP, Praha

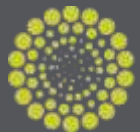
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

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. Bakteriologie potravin
3. Virologie potravin
4. Průkaz falšování potravin
5. Výživa zvířat

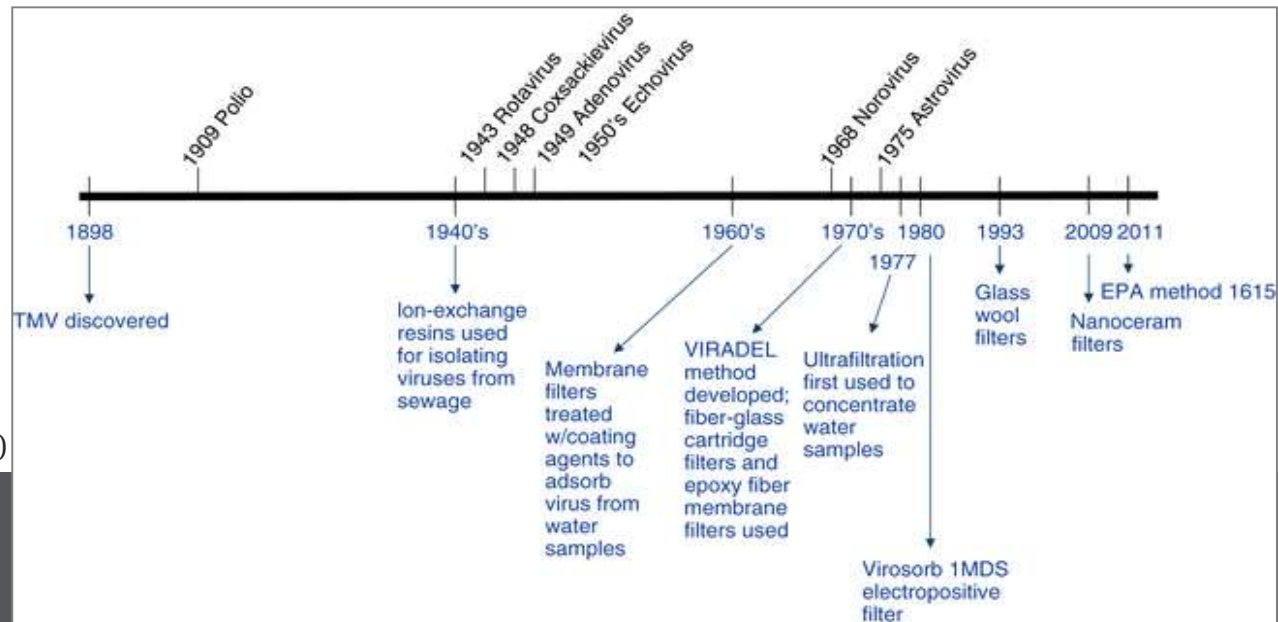


Virologie potravin – VÚVeL Brno

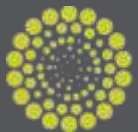
- **Virus hepatitidy E, virus hepatitidy A, noroviry (NoV GI, NoV GII), adenoviry (indikátory fekálního znečištění, AdV 40/41)**
- **Potraviny a prostředí jejich produkce (akreditované metody)**
 - Drobné ovoce (jahody, maliny, ostružiny, borůvky)
 - Zelenina (listový salát, mrkev, okurky, rajčata ...)
 - Vepřové masné výrobky a zvěřina
 - Prostředí (stěry, **voda**)
- **Dosledování zdroje kontaminací**
 - Porovnání sekvencí humánních izolátů, izolátů z prostředí, izolátů od zvířat – molekulární epidemiologie/epizootologie

Viry v souvislosti s přenosem vodou

- **1945** – průkaz přenosu polioviru vodou (infekce potkanů; Toomey, 1945)
- **1955 – 1956** – epidemie VHE New Delhi, Indie (cca 30 000 infikovaných, 73 úmrtí; Dhopeshwakar et al., 1957)
- **1965** – symposium „Transmission of Viruses by Water Route“
- **1979** – working group on Bacteriological and Virological examination of water (WHO, 1979)
- **1981** – 15th edition of Standard Methods for Examination of Water and Wastewater
- **2013** - ISO/TS 15216

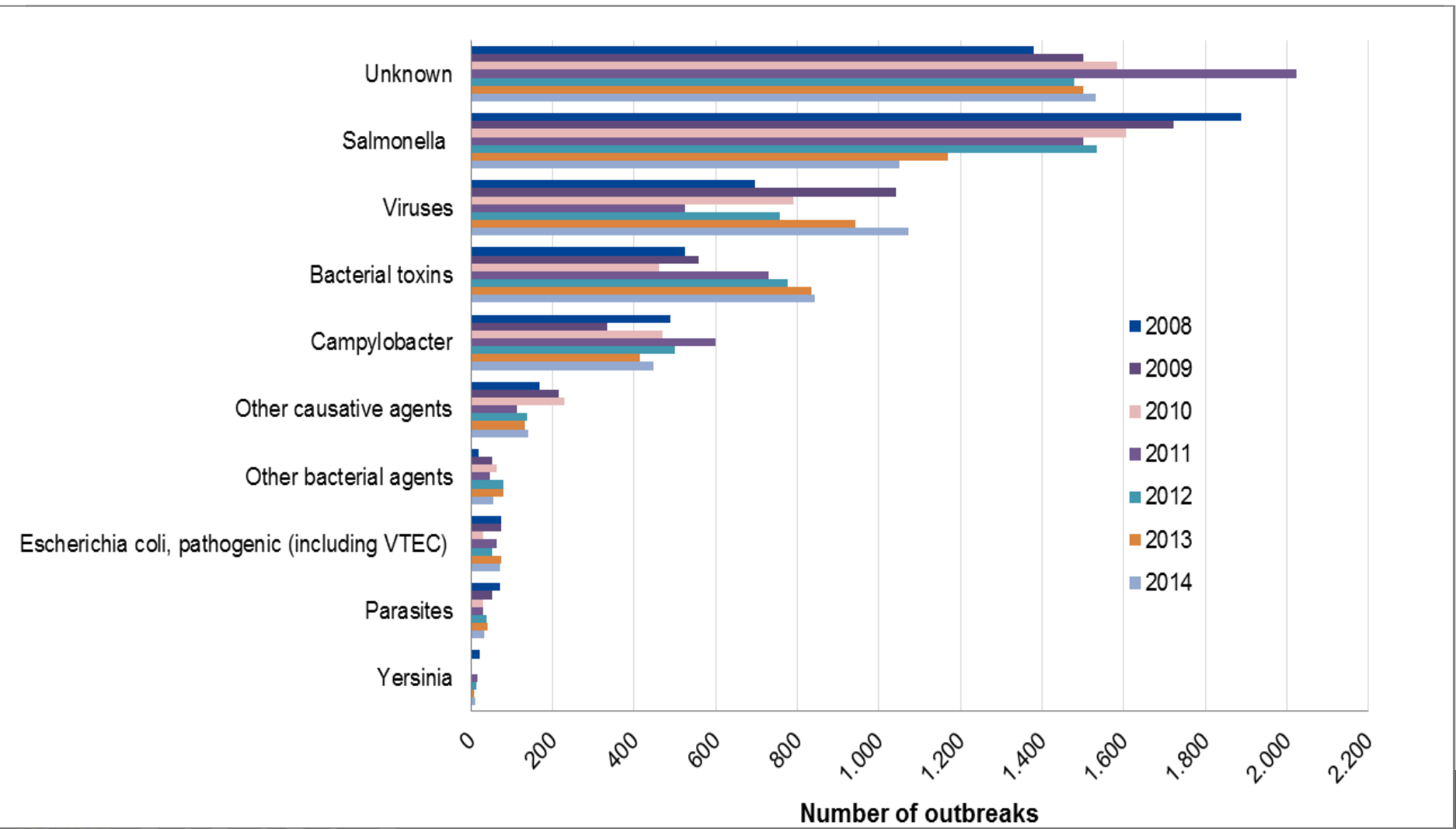


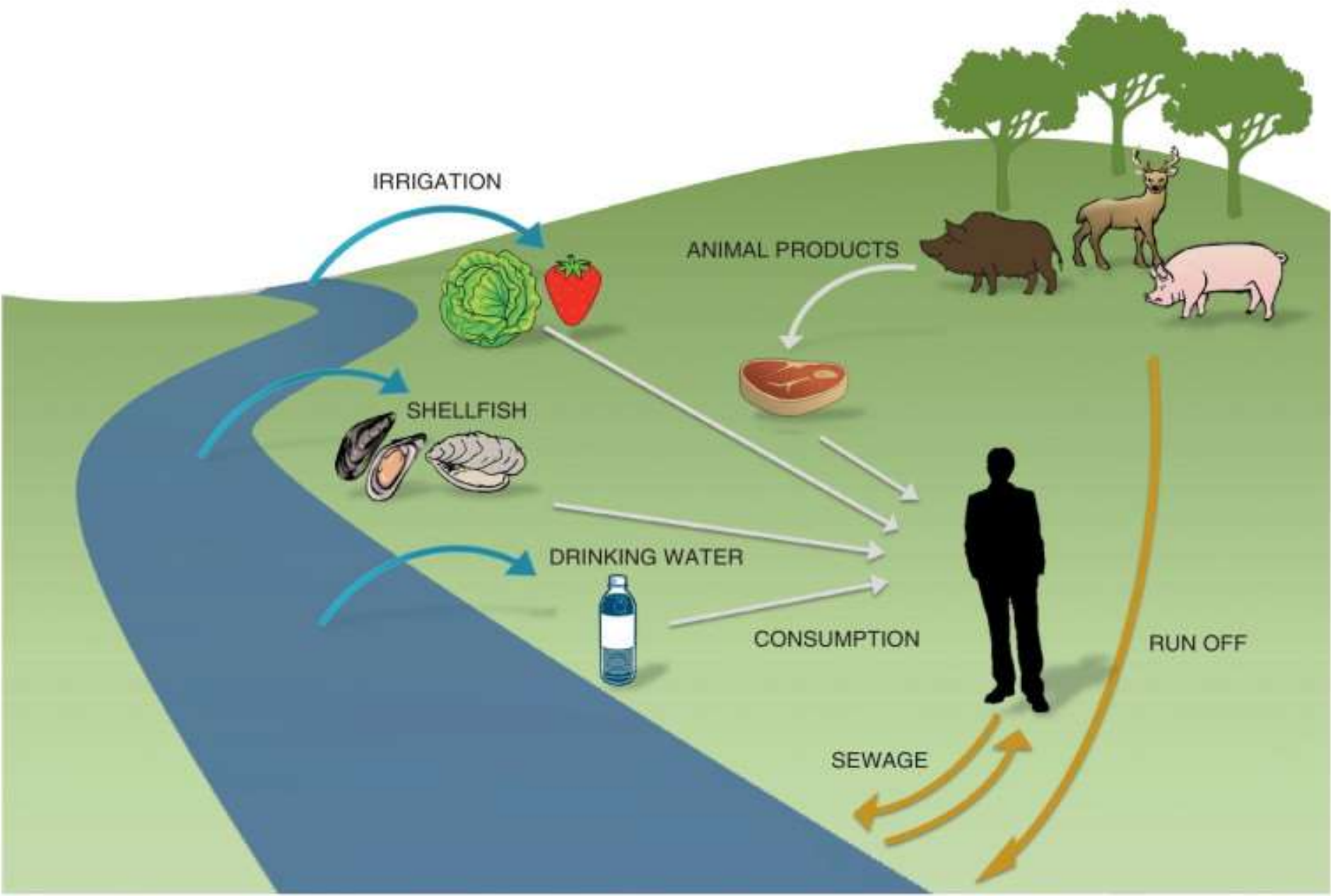
(Cashdollar and Wymer, 2013)



VUVeL

Patogeny v souvislosti s onemocněním z potravy a vody (EFSA, 2014)





Viry přenosné vodou

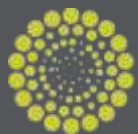
- Přenos vodou a potravinami popsán u více jak 100 enterických virů (Newell et al., 2010; Koopmans and Duizer, 2004)

Viry přenosné vodou

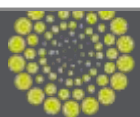
Genom	Čeď	Zástupci	Klinické příznaky
ds DNA	<i>Adenoviridae</i>	adenovirus sérotyp 40/41	zvracení, průjem, hlavně u dětí
	<i>Polyomaviridae</i>	JC polyomavirus	neurologické příznaky
ds RNA	<i>Reoviridae</i>	rotavirus (genoskupina A)	zvracení, průjem, hlavně u dětí
-ss RNA	<i>Ortomyxoviridae</i>	virus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

Původci gastroenteritid

- **Norovirus** (kaliciviry, Norwalk)
 - **Rotavirus**
 - **Astrovirus**
 - **Adenovirus**
-
- Inkubační doba 1-2 dny
 - Průjmy a zvracení 1-3 dny
 - Problém dehydratace (děti, senioři)
 - 30 % infekcí bez příznaků
-
- Diskutován zoonotický přenos



Virové střevní infekce (A08), Česká republika počet hlášených onemocnění v Epidatu 2002-2015



Původci hepatitid

➤ Virus hepatitidy A

- ANTROPONÓZA

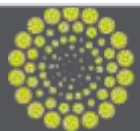
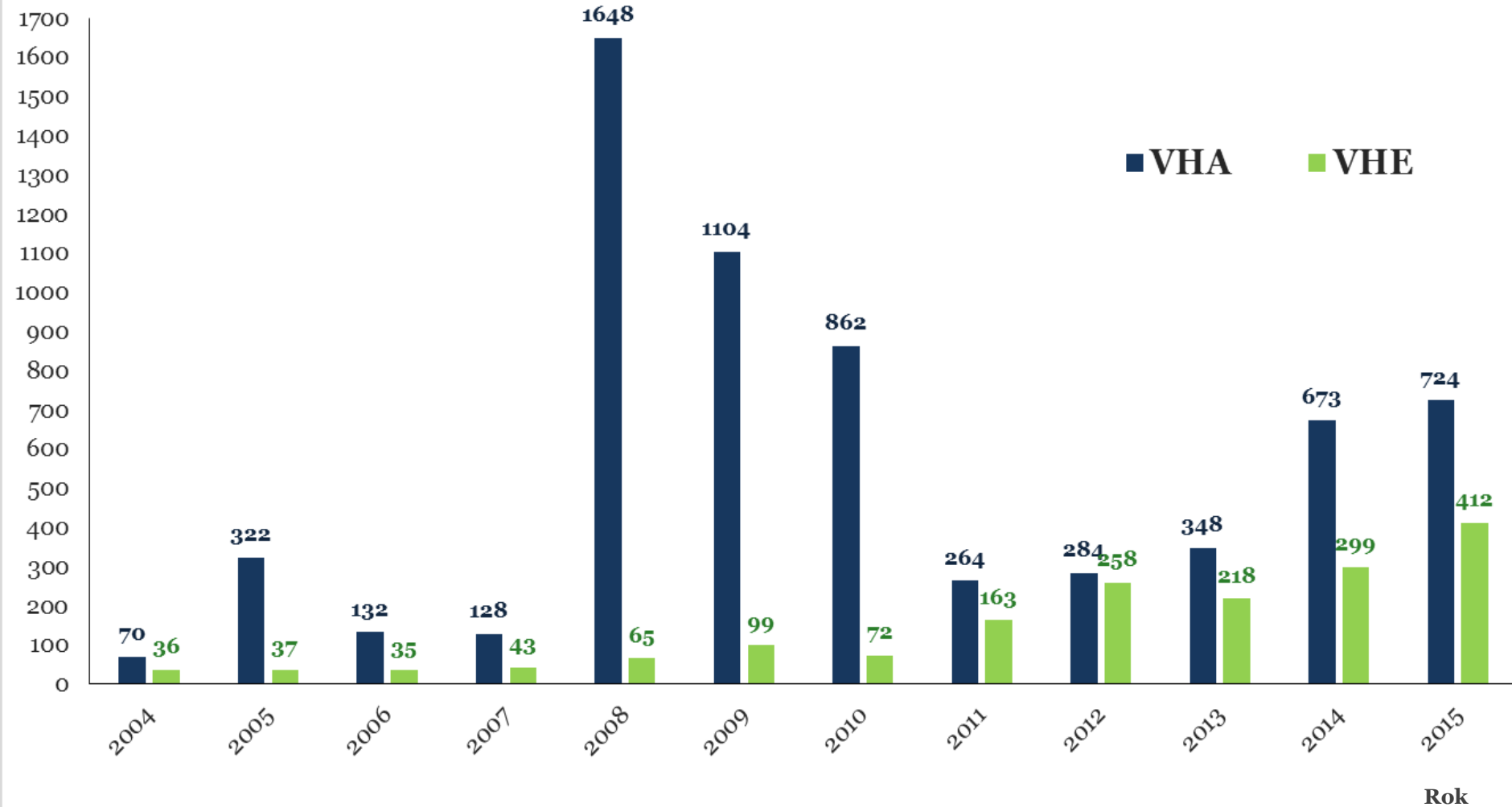
➤ Virus hepatitidy E

- 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
- Kontaminovaná voda – zejména rozvojové země



Hepatitida A (B15) a hepatitida E (B17.2), Česká republika počet hlášených onemocnění v Epidatu 2004-2015



Obecné vlastnosti

- Infekce po pozření kontaminované vody (i aerosol - sprchování)
- Vylučování stolicí, zvratky, slinami a močí ve vysokém množství (virová nálož 10^{11} /g stolice)
- Ke vzniku infekce stačí 10-100 částic
- Problém – asymptomatické infekce

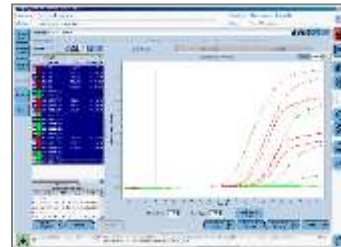
- Ve vodě/potravinách se nemnoží → nemění senzorycké vlastnosti

Obecné vlastnosti

- Odolnost vůči vlivům vnějšího prostředí (chlad, acidorezistence) → persistence dny, měsíce
- V pozemní vodě chráněn před vlivy vnějšího prostředí (opakovaně prokázány rok)
- Odstranění v rámci ČOV nedostatečné (průkaz NoV GI a NoV GII v odtoku, Kaevska et al., 2016)

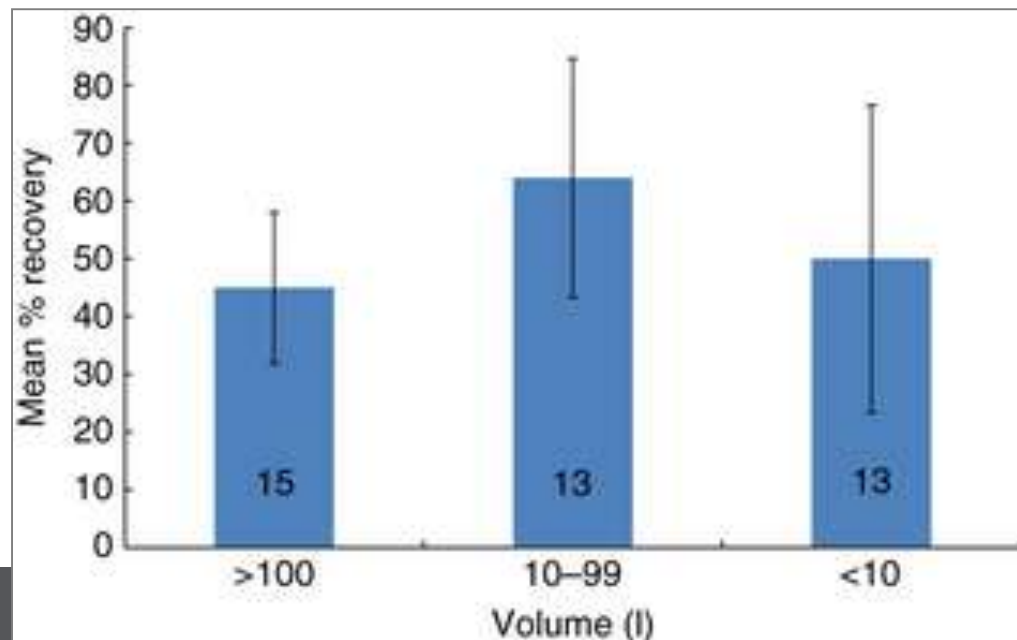
Průkaz virů ve vodě

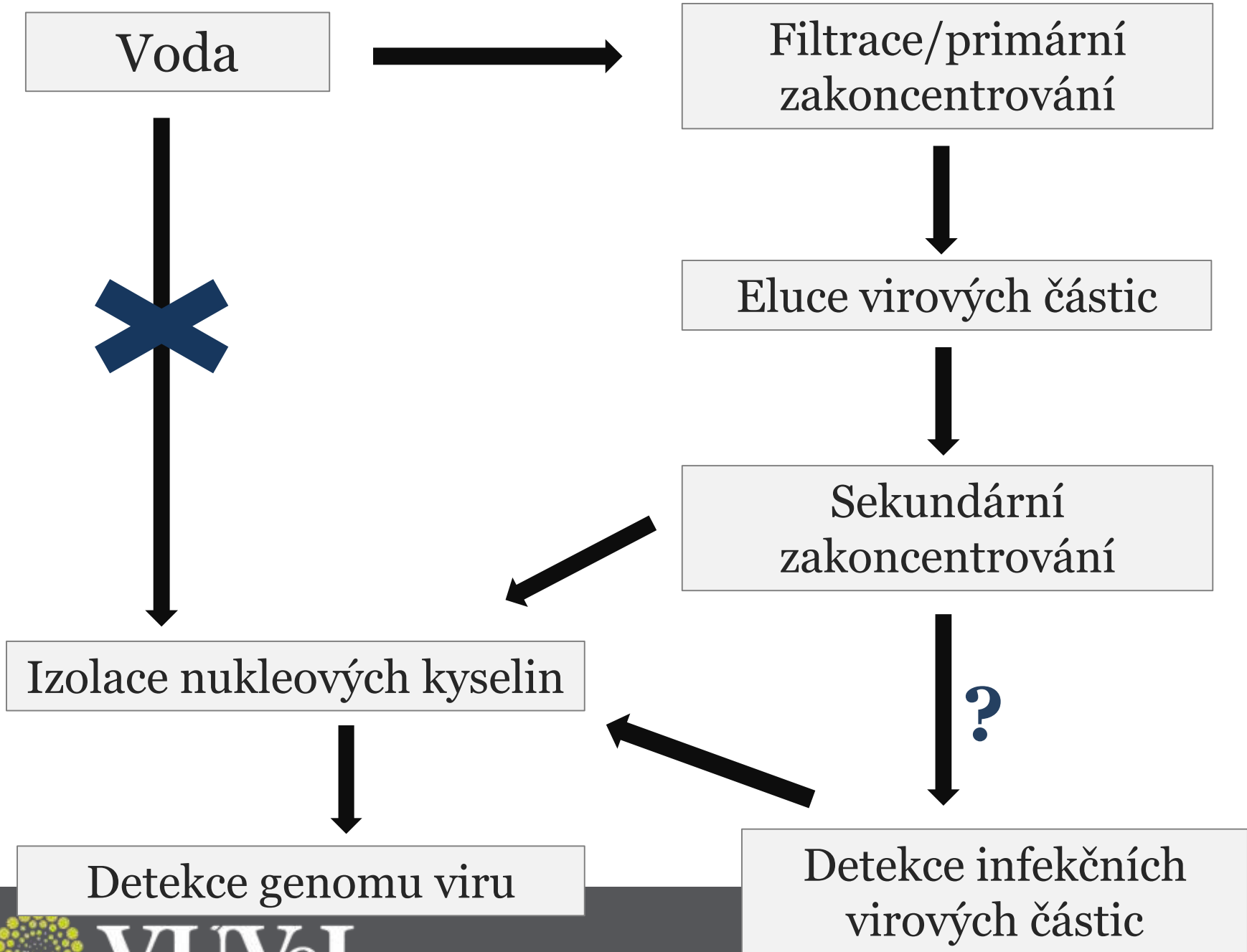
- V prostředí/potravinách malé množství virových částic → potřeba dostatečně citlivé metody
- Problémové kultivace virů na tkáňových kulturách → metody molekulárně biologické



Odběr vzorku

- Čistý kanystr/nádoba
- Objem vzorku 10 l, možnost i menší objemy (200 ml)
- Vzorek skladovat v temnu a chladu
- Transport do laboratoře (chlazené) nejlépe do 24 hod od odběru





Metody izolace virových částic z vody

Methods for virus concentration

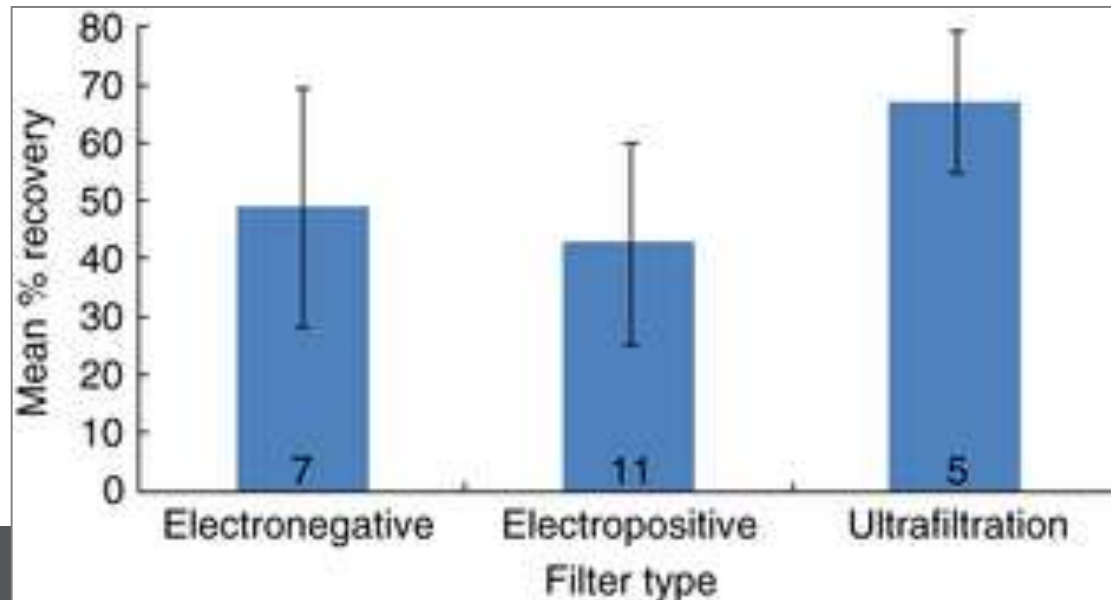
J.L. Cashdollar and L. Wymer

Table 1 Filter type pros and cons

Filter type	Pros	Cons
Electronegative	<ul style="list-style-type: none"> Economical Can filter large volumes even in more turbid waters before clogging occurs Has been tested with an array of enteric viruses High recoveries for commonly tested enteroviruses 	<ul style="list-style-type: none"> Requires preconditioning of water sample or filter prior to filtration
Electropositive 1 MDS	<ul style="list-style-type: none"> No preconditioning of water sample required Has been tested with an array of enteric viruses Can filter large volumes even in more turbid waters before clogging occurs 	<ul style="list-style-type: none"> Extremely high cost per filter
Electropositive NanoCeram [®]	<ul style="list-style-type: none"> Economical Comparable recoveries to 1 MDS for viruses tested No preconditioning of water sample required 	<ul style="list-style-type: none"> Clogs in more turbid waters Limited data available at this time to determine its effectiveness with multiple viral pathogens
Electropositive Glass Wool	<ul style="list-style-type: none"> Economical No preconditioning of water sample required Easy to use Field-deployable 	<ul style="list-style-type: none"> Requires each laboratory to put filter apparatus together, which could cause interlaboratory variation Turbid water may cause clogging Limited data available at this time to determine its effectiveness with multiple viral pathogens
Electropositive ViroCap	<ul style="list-style-type: none"> Economical No preconditioning of water sample required Easy to use Field-deployable 	<ul style="list-style-type: none"> Turbid water may cause clogging May be limit to volume that can be filtered due to filter's size Limited data available at this time to determine its effectiveness with multiple viral pathogens
Hollow-Fibre Ultrafiltration	<ul style="list-style-type: none"> Multi-pathogen concentration Economical No preconditioning of water sample required 	<ul style="list-style-type: none"> Turbid water may cause clogging Not easily field-deployable Slow filtration rate Limited data available at this time to determine its effectiveness with multiple viral pathogens

Izolace virových částic z vody

- Dostatečná citlivost
- Standardizované použití pro vzorky pitné i povrchové vody
- Rychlost a cena
- ISO/TS15216-1, ISO/TS15216-2



Izolace virových částic z vody (10 l)

- **Negativně nabitě filtry (Millipore)**
 - použití prefiltrů
 - velikost pórů – 0,45 μm
 - acidifikace vzorku
- **Eluční roztok – hovězí extrakt + glycin**
 - organické srážení
 - centrifugace
 - fosfátový pufr
 - izolace NK



Izolace virových částic z vody (200 ml)

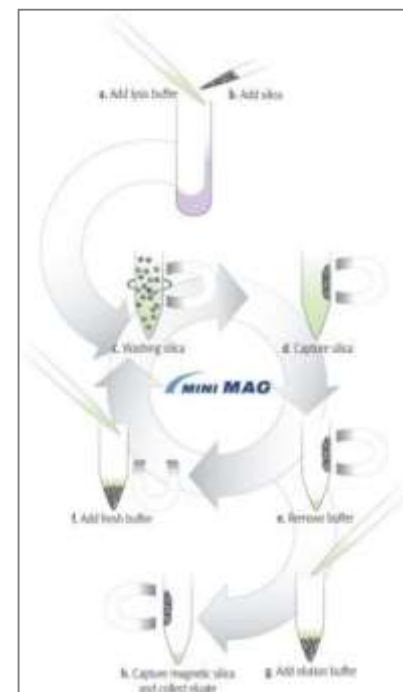
- **Přímá flokulace**

- hovězí extrakt + glycin
- acidifikace vzorku
- 8 hodin flokulace
- centrifugace
- fosfátový pufr
- izolace NK



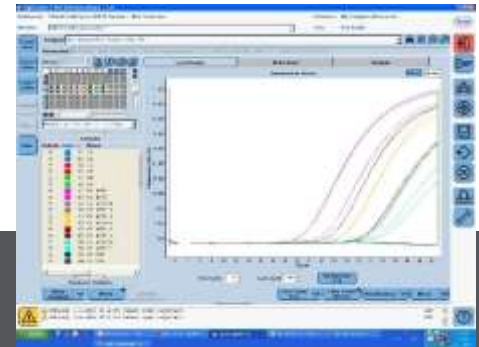
Izolace nukleových kyselin

- Odstranění inhibičních faktorů
- Komerční souprava (NucliSENS, Biomérieux)



Průkaz viru ve vzorku

- Metody molekulární – komerčně dostupné soupravy × „home made“
- qPCR, RT-qPCR
 - kvantifikace – DNA/RNA koncentrační gradient
 - problém s inhibičními faktory – falešně negativní výsledky (interní amplifikační kontrola, analýza ředěné NK)
- RT-PCR (molekulární epidemiologie/epizootologie)
- Problém rozlišit infekční × neinfekční virové částice



Kontrola analýzy vzorku



- Komplikovaný proces → nutnost zavedení externí kontroly
 - bakteriofág MS2 - do genomu vložena unikátní sekvence (vakovlk tasmánský a pták moa)
 - stanovení účinnosti izolace NK – kvantifikace virové nálože ve vzorku

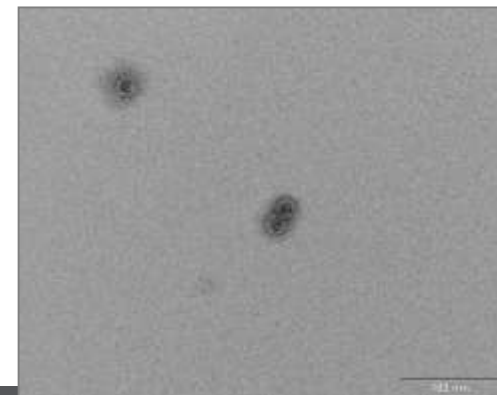
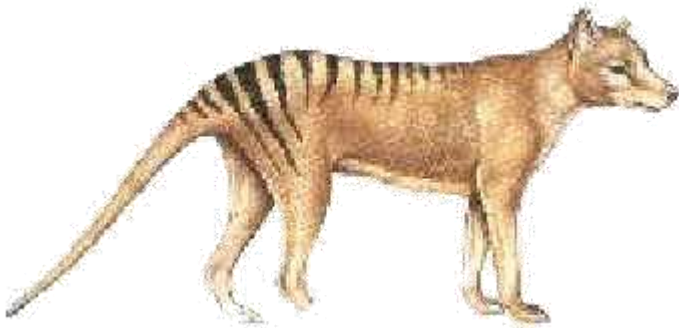


Foto H. Malenovská

Limity detekce analýz

- **Filtrace – 10 l**
 - **100 000 virových částic** (10 000 virových částic v 1 l vody)
- **Přímá flokulace – 200 ml**
 - **10 000 virových částic** (50 000 virových částic v 1 l vody)

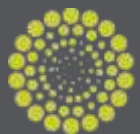
Výsledky – povrchová voda

	2011-12	2013	2014	2015	2016
NoV GI	2/18	1 / 12	2 / 11	5 / 12	0/12
NoV GII	0/18	2/12	2/ 11	5 / 12	3 / 12
HAV	0/18	0/12	0/ 11	0/ 12	0 / 12



Zelenina (2013-2016)

Farmy	NoV	HAV
Zelenina	1/318	0/318
Voda	1/12	0/12
Prostředí (stěry)	0/58	0/58
Tržní síť		
Zelenina CZ	1/37	0/37
Zelenina dovoz	1/40	0/40
Krájená zelenina (mrazená, salát)	2/117	0/117



Byliny (2013-2016)

Farmy	NoV	HAV
Byliny	4/115	0/115
Voda	5/14	0/14
Prostředí (stěry)	2/80*	0/80
Tržní síť		
Zelenina CZ	2/65	0/65
Zelenina dovoz	2/47	0/47

* ruce sběračů



Drobné ovoce (2013-2016)

Farmy	NoV	HAV
Jahody	2/156	0/156
Voda	3/23	0/23
Prostředí (stěry)	3/218*	0/218
Tržní síť		
Jahody CZ	0/45	0/45
Jahody dovoz	1/24	0/24

* ruce sběračů, toaleta



VUVeL

Výsledky – pitná voda

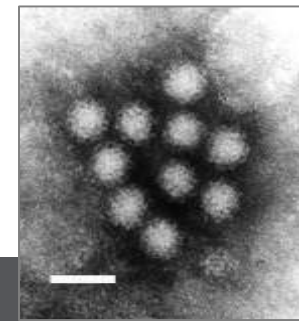
	2013	2014	2015	2016
NoV GI	5 / 10	2 / 14	6 / 32	6/40
NoV GII	5/10	1/ 14	9 / 32	5 /40

- **2016 – průkaz AdV 40/41**



Indikátory fekálního znečištění

- V současné době založeno na průkazu *E. coli* či koliformních bakterií – výskyt nesouhlasí s přítomností virových agens
- Vhodnější indikátory - bakteriofág MS2, adenoviry, polyomaviry
- Možnost rozlišit zdroj fekálních kontaminací – humánní × zvířecí (prasata, skot)



Závěry

- *Codex Alimentarius* – sledování kvality vody určené k zavlažování se zaměřením na virová agens
- V rámci stanovení mikrobiologické kvality vody zavést sledování také výskytu virových agens (vhodnější indikátory fekálního znečištění, nejčastější původci)
- 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

www.vri.cz

