

SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU SARS-COV-2 V PRAŽSKÝCH ODPADNÍCH VODÁCH

Čermáková Eliška, VŠCHT Praha



Analytika odpadů VII, 21.-22.10. 2021

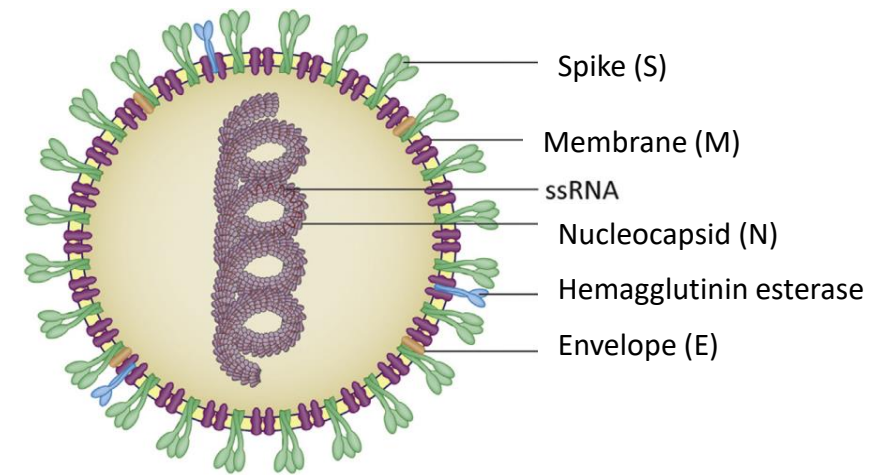
Úvod

- **SARS-CoV-2**

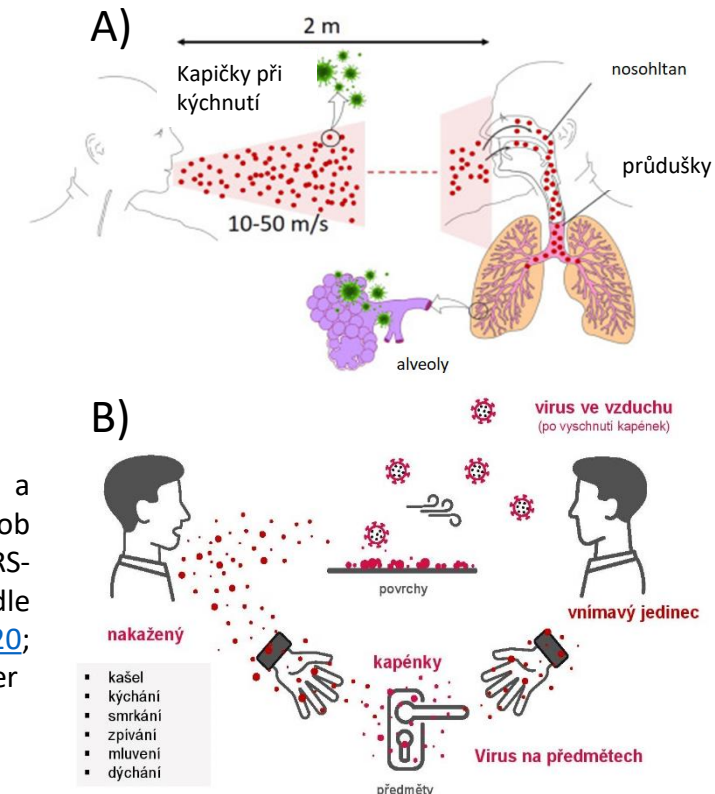
- *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*
- Čeleď *Coronaviridae*
- (+) ssRNA
- Původce COVID-19

- **Covid-19**

- Wuhan, Hubei, Čína (2019)
- Široká škála symptomů
- Detekce patogenu: PCR, LAMP, antigenní test

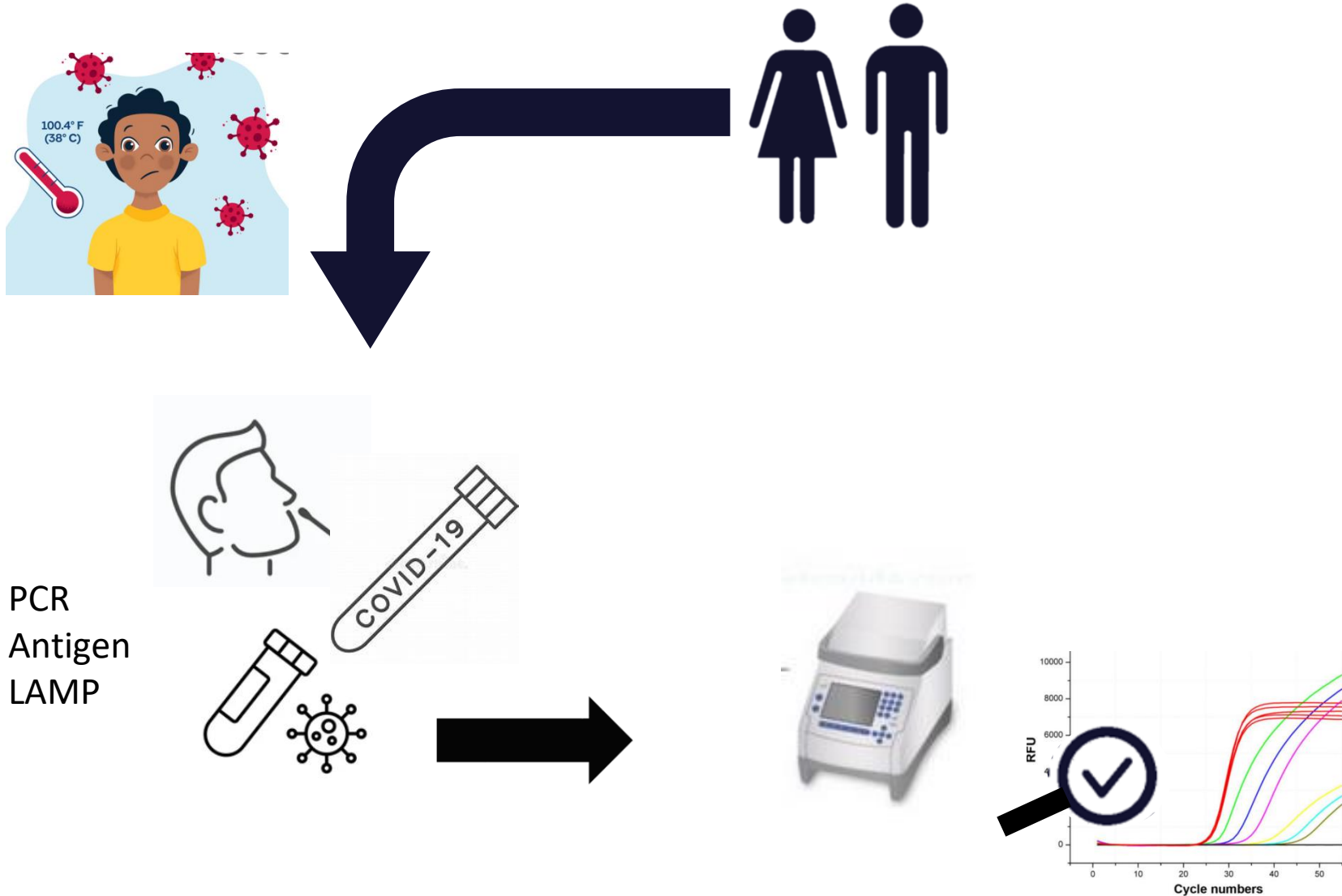


Obr. 1: Struktura viru z čeledi *Coronaviridae* (upraveno dle [Payne, 2017](#)).

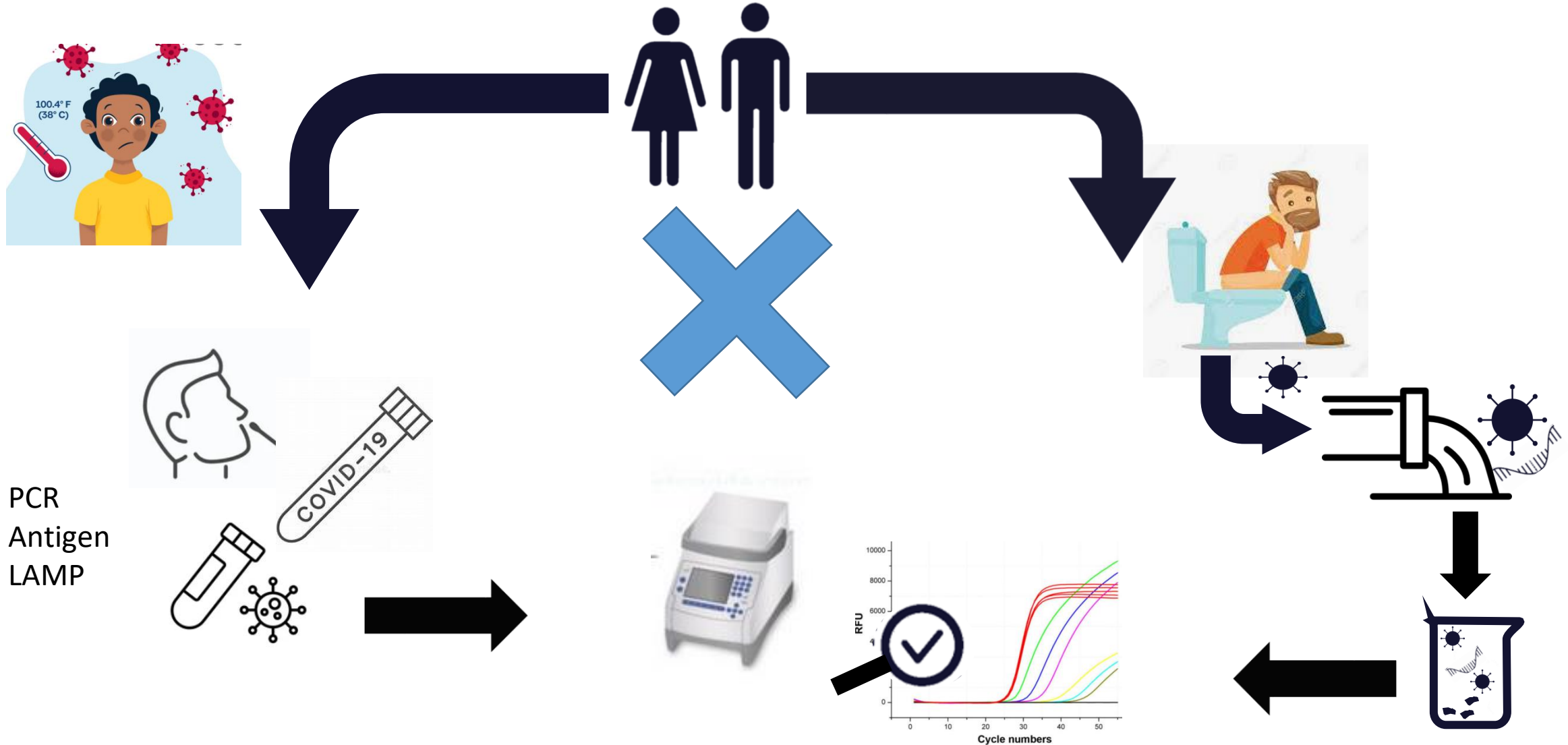


Obr 2: Přímý (A) a nepřímý (B) způsob infekce virem SARS-CoV-2 (upraveno dle [Estrada, 2020](#); <http://www.becherovavila.cz/>).

Proč detekovat SARS-CoV-2 v odpadních vodách?

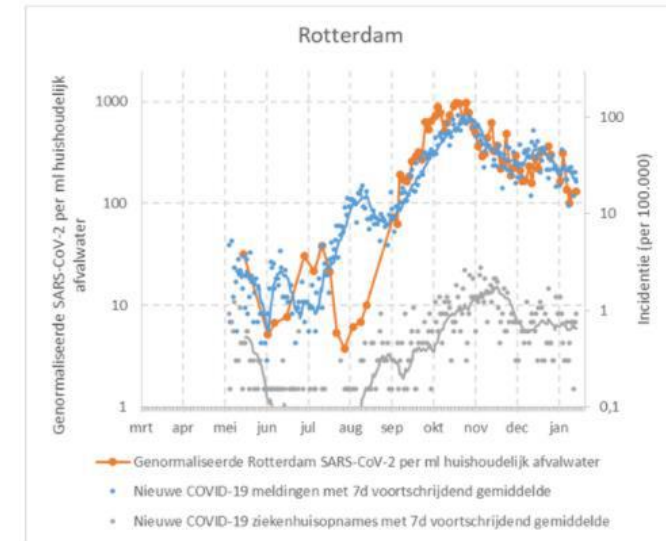


Proč detekovat SARS-CoV-2 v odpadních vodách?



Motivace – Epidemiologie založená na odpadních vodách

- kvantifikace lidských biomarkerů (léky, polioviry)
 - včasné varování před novou vlnou COVID-19
 - identifikace ohnisek
 - nástroj k monitoringu cirkulace SARS-CoV-2 v populaci
 - aktuální téma ve výzkumu
-
- **EU vydala doporučení pro stanovení SARS-CoV-2 v odpadních vodách**



<https://www.kwrwater.nl/en/actueel/sewage-monitoring-shows-how-covid-19-is-evolving-in-the-population/>

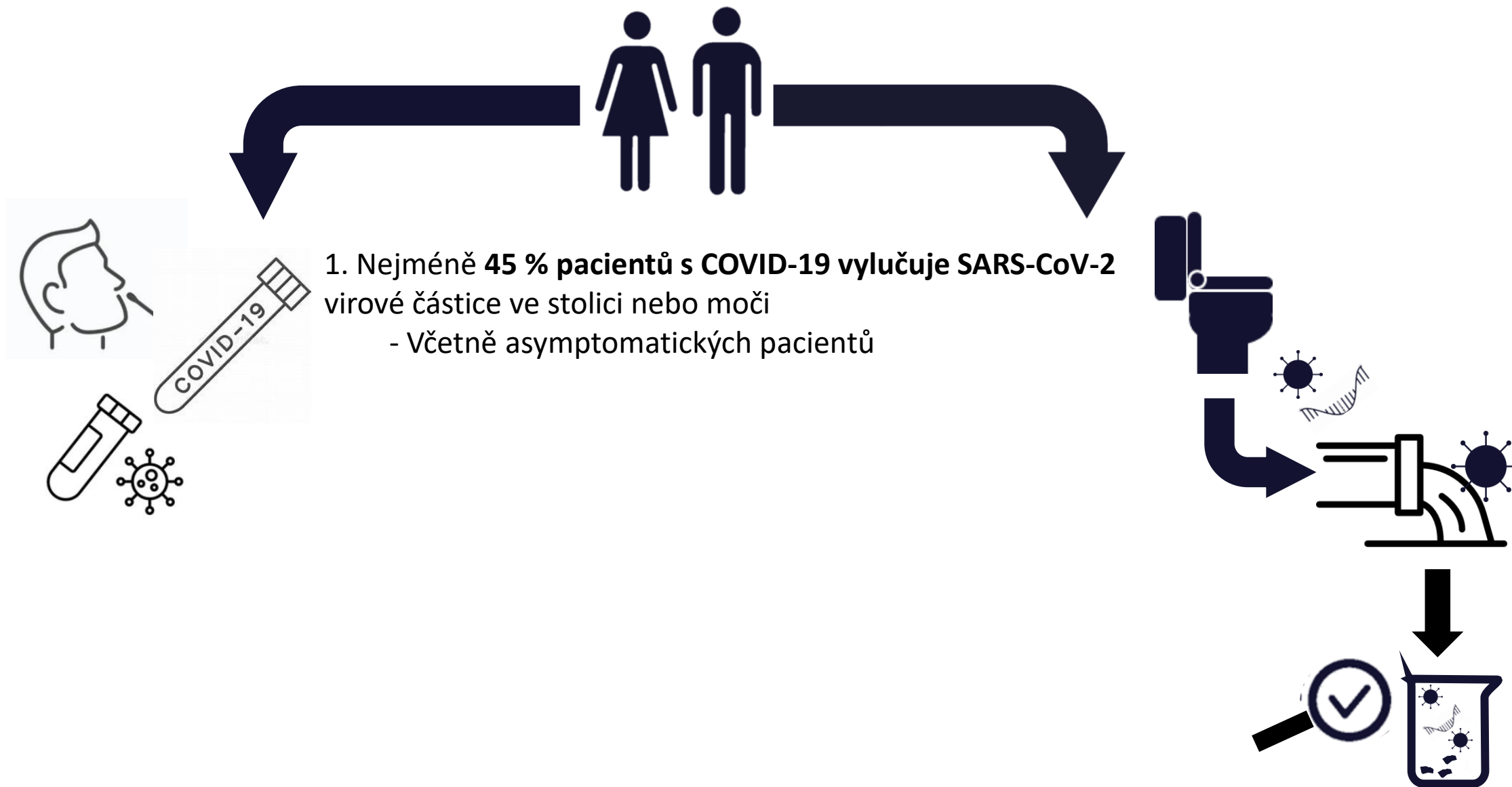
RECOMMENDATIONS

COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2021/472

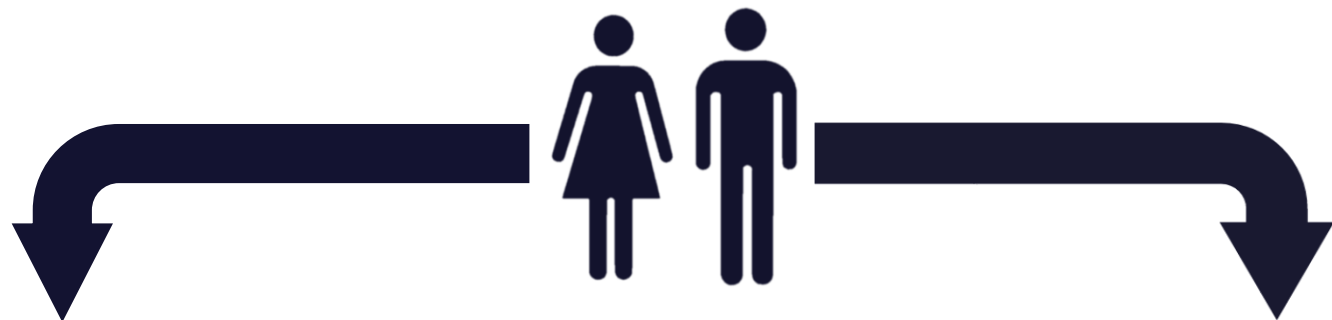
of 17 March 2021

on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewaters in the EU

Proč detekovat SARS-CoV-2 v odpadních vodách?



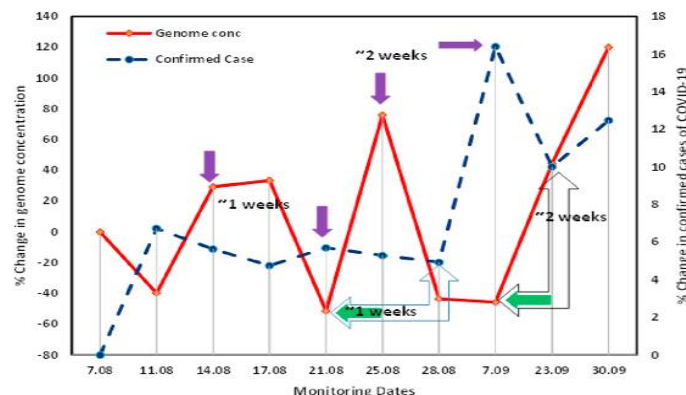
Proč detekovat SARS-CoV-2 v odpadních vodách?



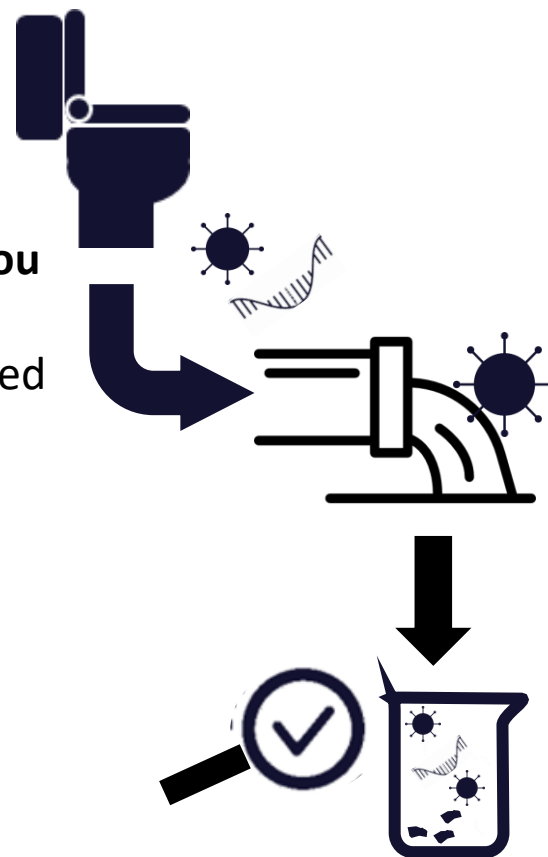
1. Nejméně **45% pacientů s COVID-19 vylučuje SARS-CoV-2** virové částice ve stolici nebo moči
- Včetně asymptomatických pacientů

2. Zdá se, že **pacienti obvykle vylučují virovou RNA dříve, než jdou na testování**

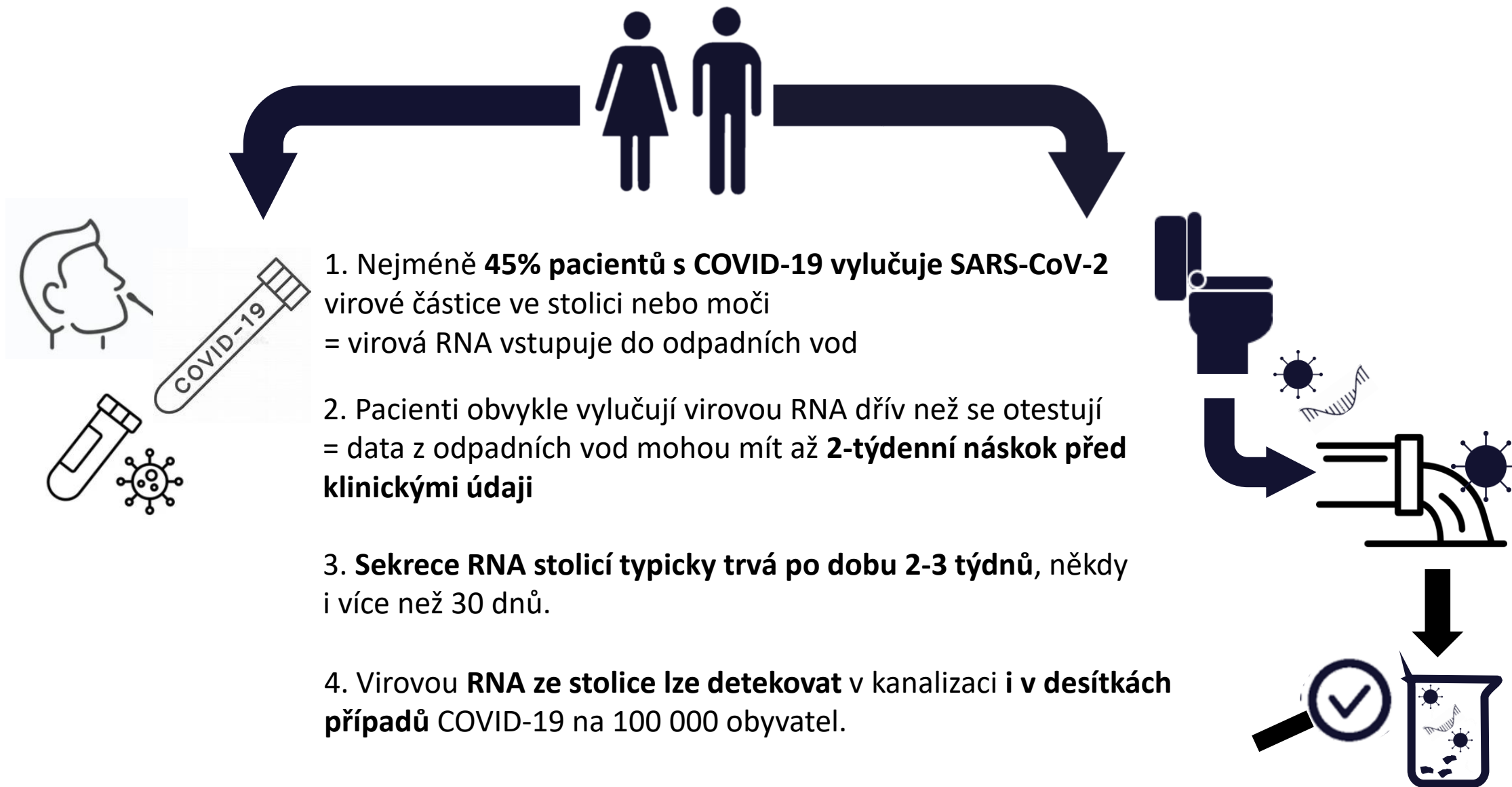
= údaje o odpadních vodách mohou mít až 2-týdenní náskok před klinickými údaji



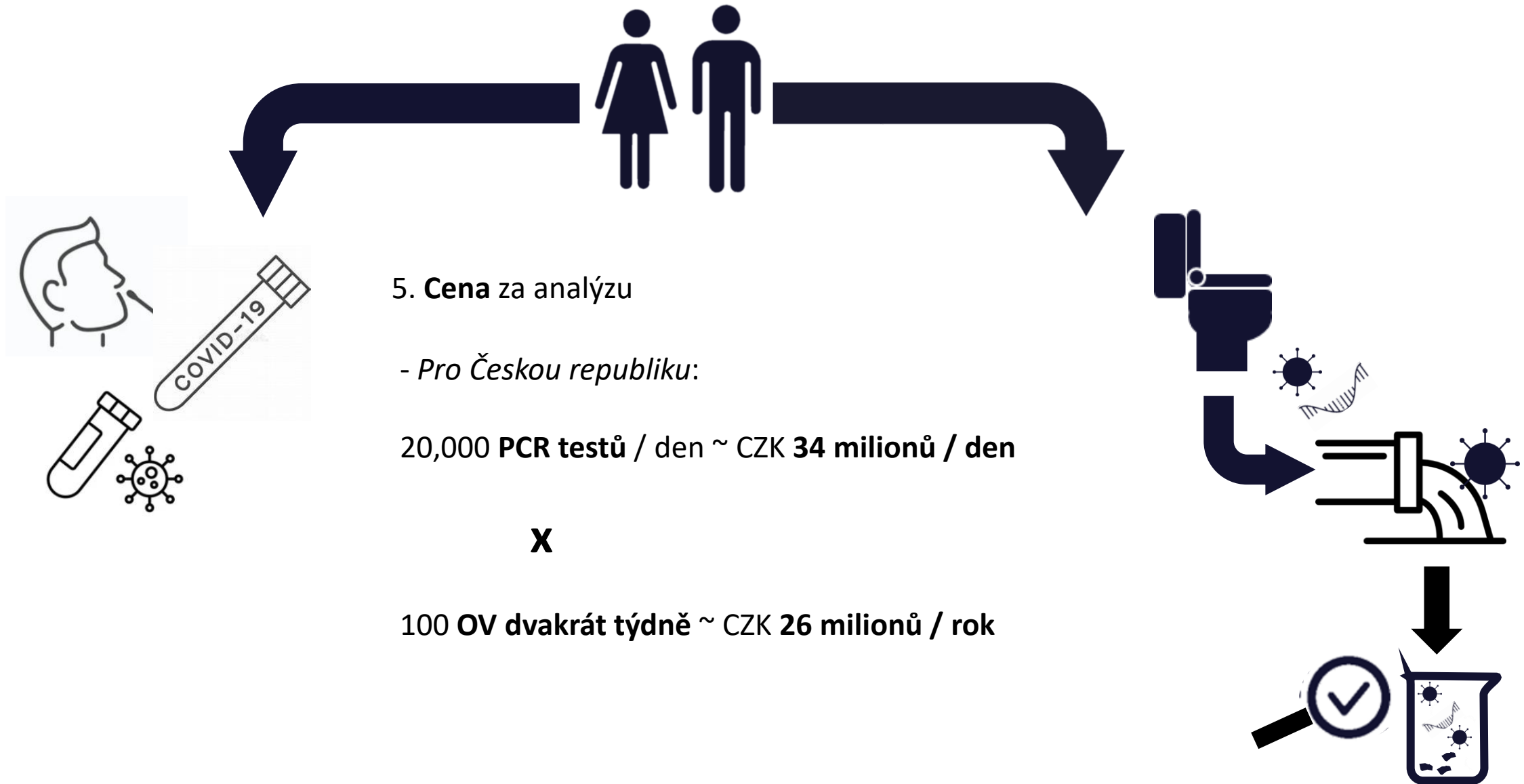
Kumar, Manish, et al. "Unravelling the early warning capability of wastewater surveillance for COVID-19: A temporal study on SARS-CoV-2 RNA detection and need for the escalation." *Environmental research* 196 (2021): 110946.



Proč detekovat SARS-CoV-2 v odpadních vodách?



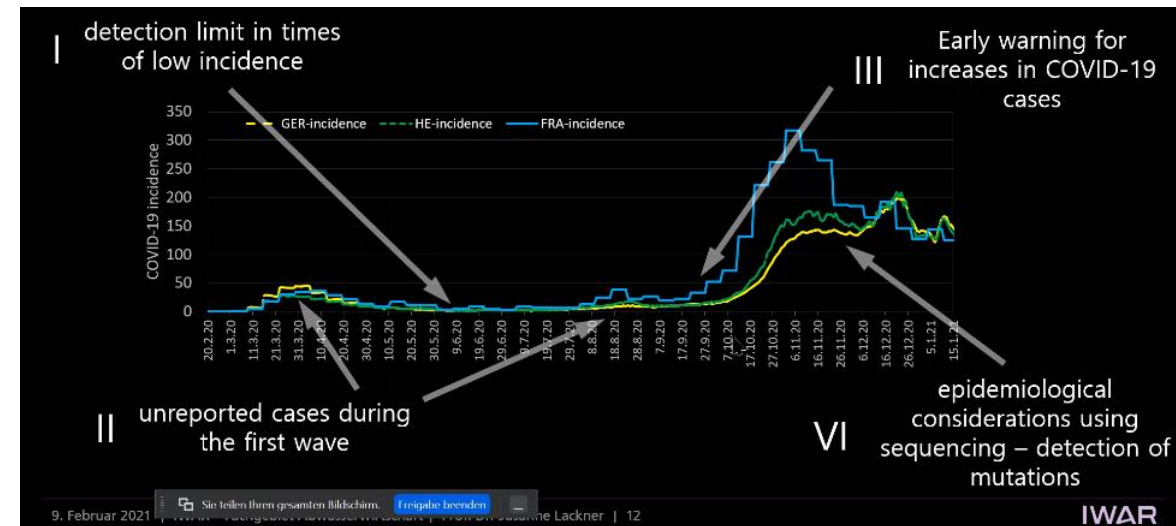
Why detect SARS-CoV-2 in waste water?



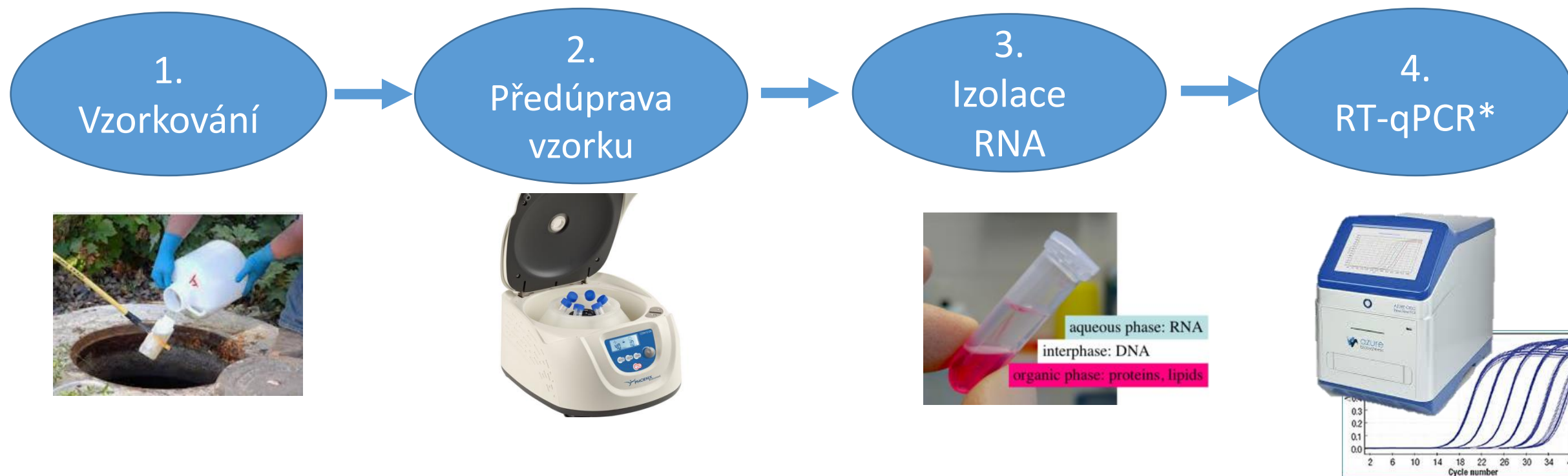
... slibný zdroj dat, ale pro koho?

- může být **rychlejší** než testování jednotlivců
- sekvenování genomu **může odhalit mutanty**, které v klinických vzorcích dosud nejsou známy
- z dat z OV nelze odvodit konkrétní počet infikovaných lidí
- **výpočet reprodukčního čísla (CH)**
- **Vyhnutí se pandemii v budoucnu**

- Spolupráce mezi
 - vědními obory
 - vědou, průmyslem a úřady



Detekce SARS-CoV-2 v OV (Metodika)



*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

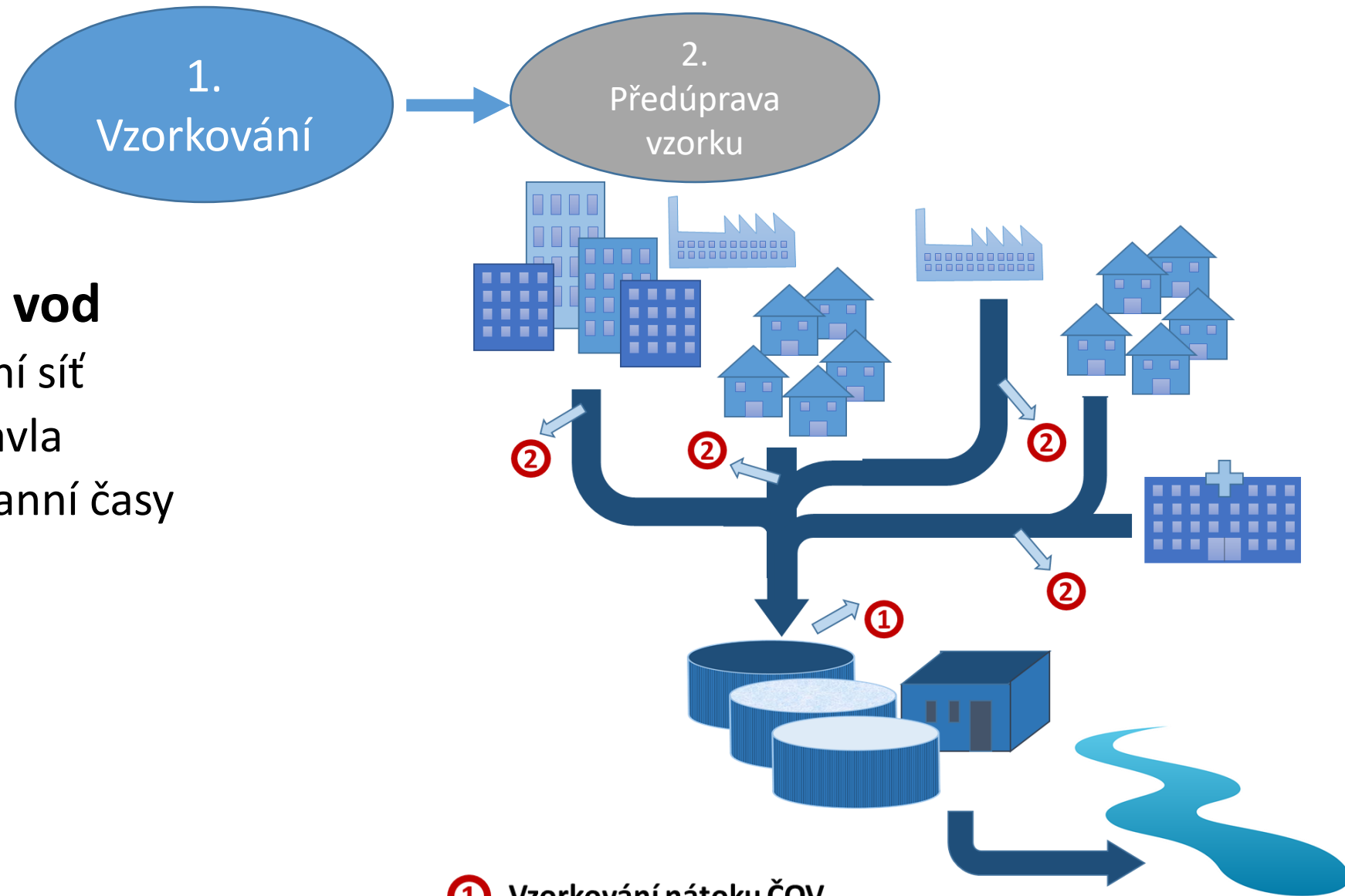
Metodika

- **Vzorky odpadních vod**

- Pražská kanalizační síť
- Letiště Václava Havla
- bodové vzorky - ranní časy



Vzorkovací aparatura
(Zdroj: PVK)



① Vzorkování nátoku ČOV

- Celkový obraz epidemie
- Vyhledávání mutací

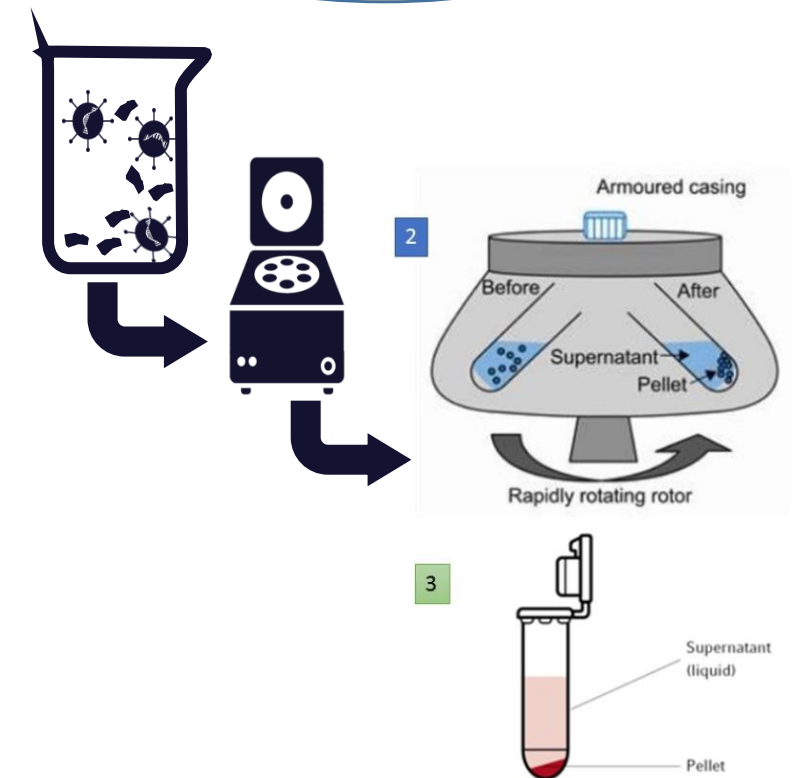
② Vzorkování na stokové síti

- Vyhledávání rizikových lokalit

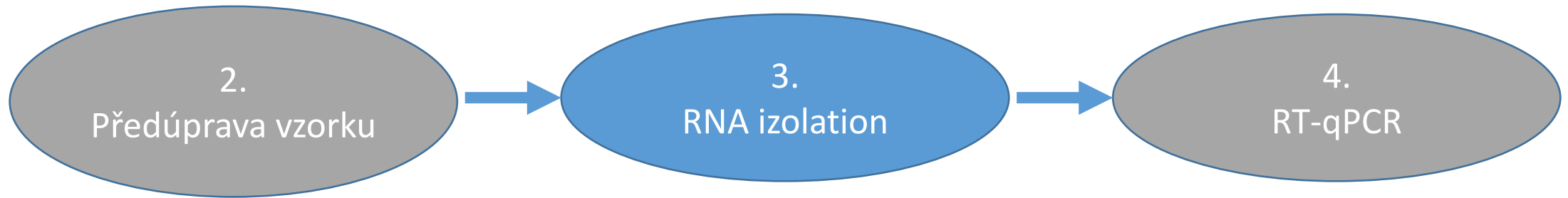
Metodika



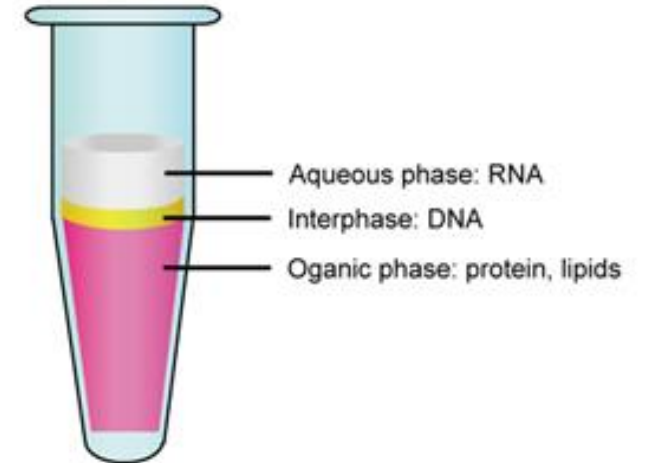
- **Maximalizuje záchyt virových částic**
- Mnoho metod pro koncentraci virové RNA
 - precipitace, ultrafiltrace, filtrace, extrakce na kolonkách, centrifugace, ...
 - **PEG + centrifugace**
- Odstranění inhibitorů?



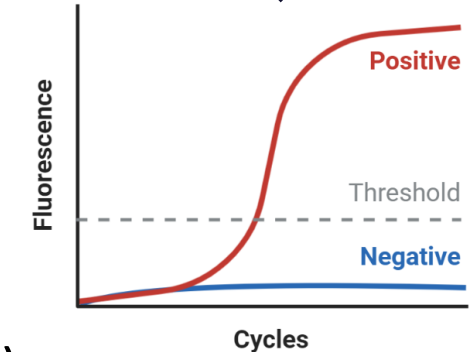
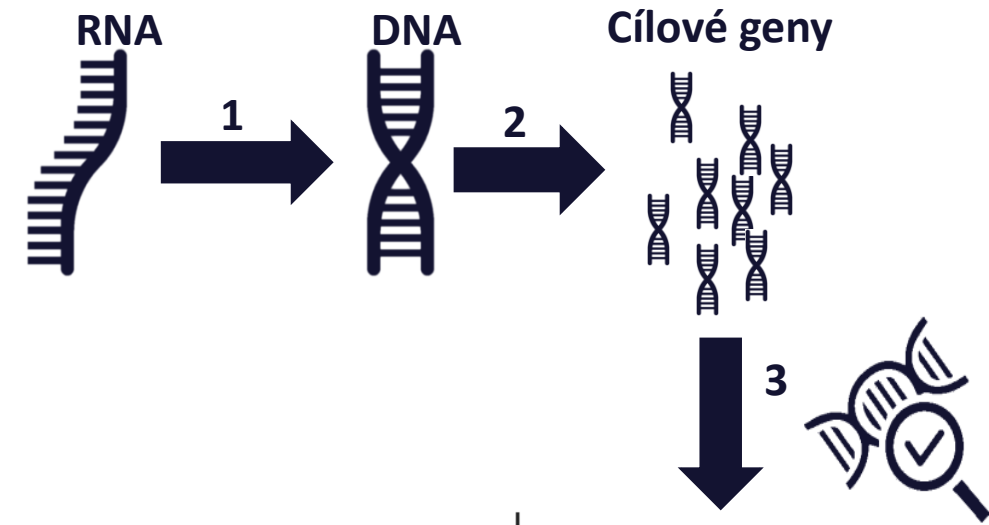
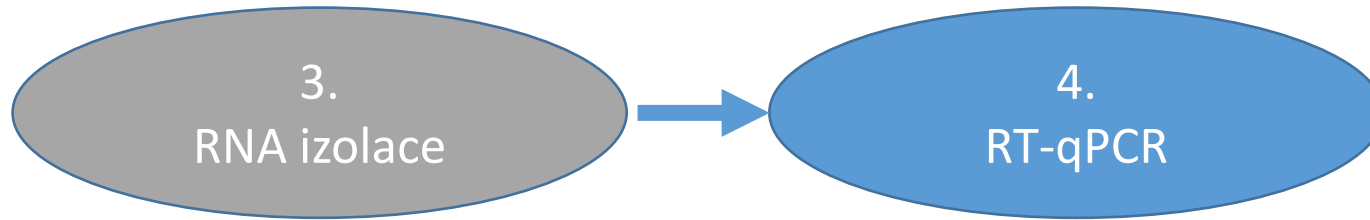
Metodika



- **odstranění (RT-)qPCR inhibitorů**
- **Trizol** nebo komerční kity

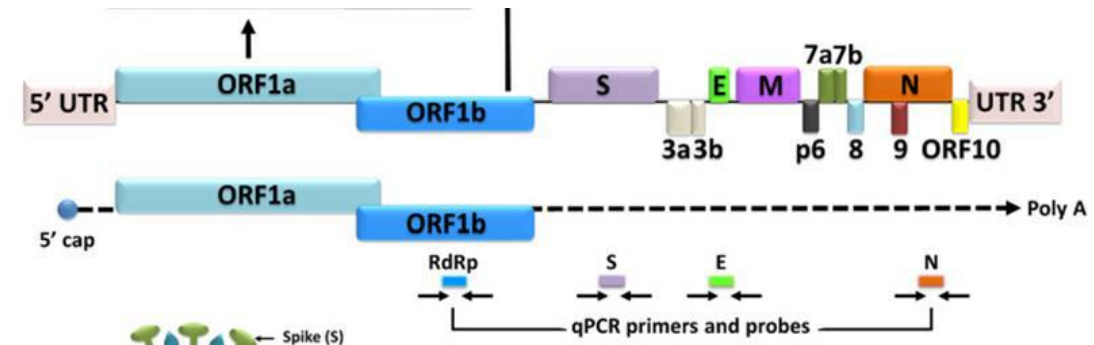


Metodika



Created in BioRender.com bio

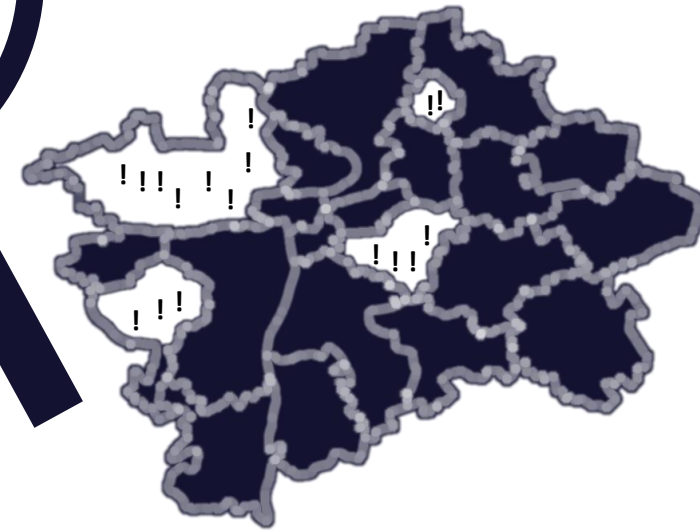
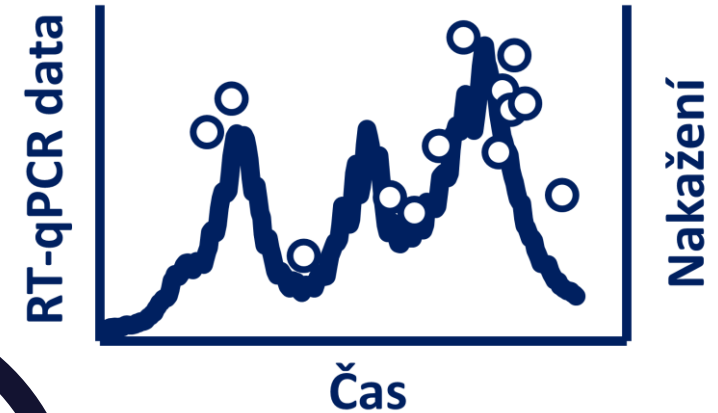
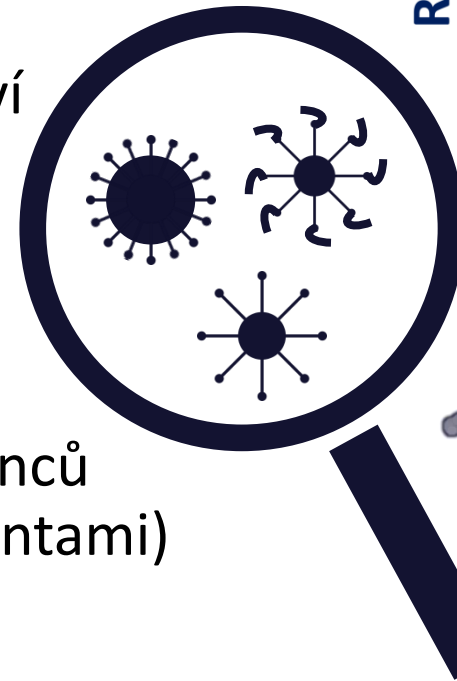
- **Potlačit (RT-)qPCR inhibitory**
- RT-qPCR:
 - **Jednokrokový (RT-qPCR)** nebo dva samostatné kroky (RT, qPCR)
 - Geny: N1, S, RdRp
- Cílové geny (správné sady primerů - mutace?)



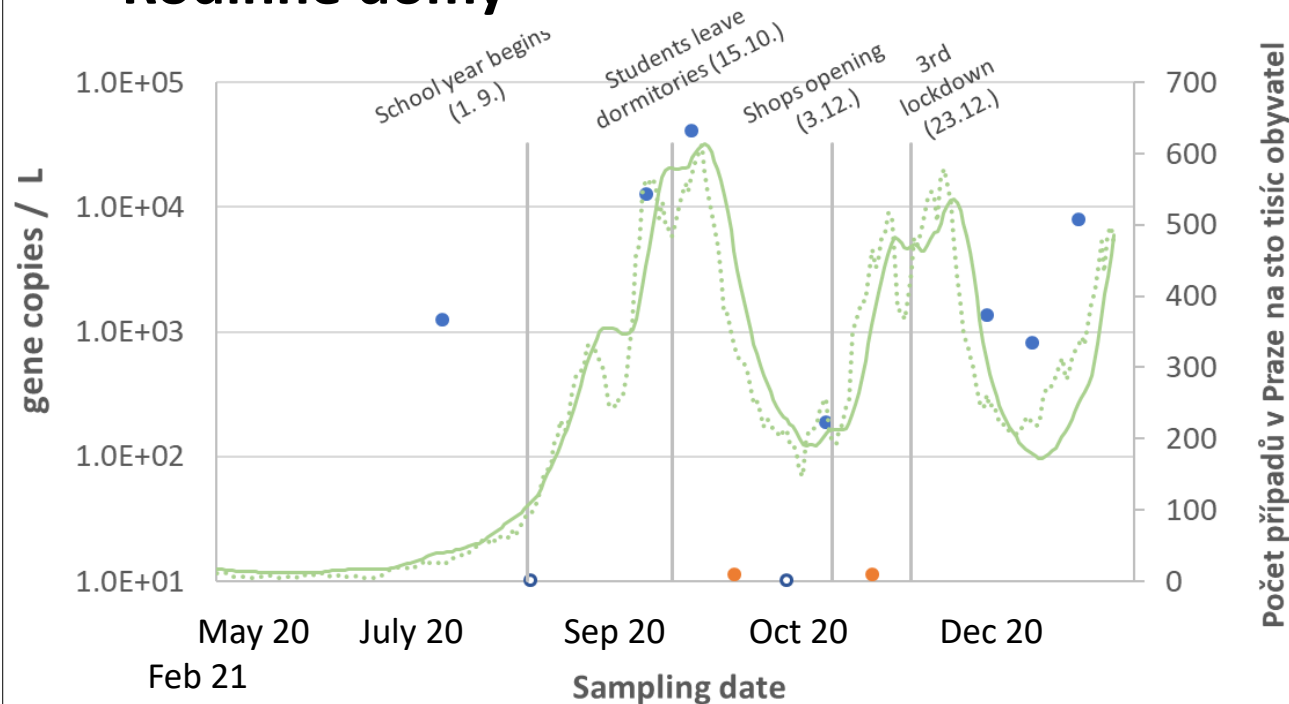
SARS-CoV-2 v Pražských odpadních vodách - výsledky:

- Na základě údajů z odpadních vod (např. počet kopií cílového genu v litru odpadní vody) **je možné:**

- 1. Odhadnout množství nakažených** jedinců v populaci (bez ohledu na množství a kvalitu provedených klinických testů)
- 2. Zmapovat šíření známých nebezpečných variant** viru v populaci
- 3. Detekovat rizikové oblasti** se zvýšenou prevalencí infikovaných jedinců (nebo jedinců infikovaných nebezpečnými virovými variantami)



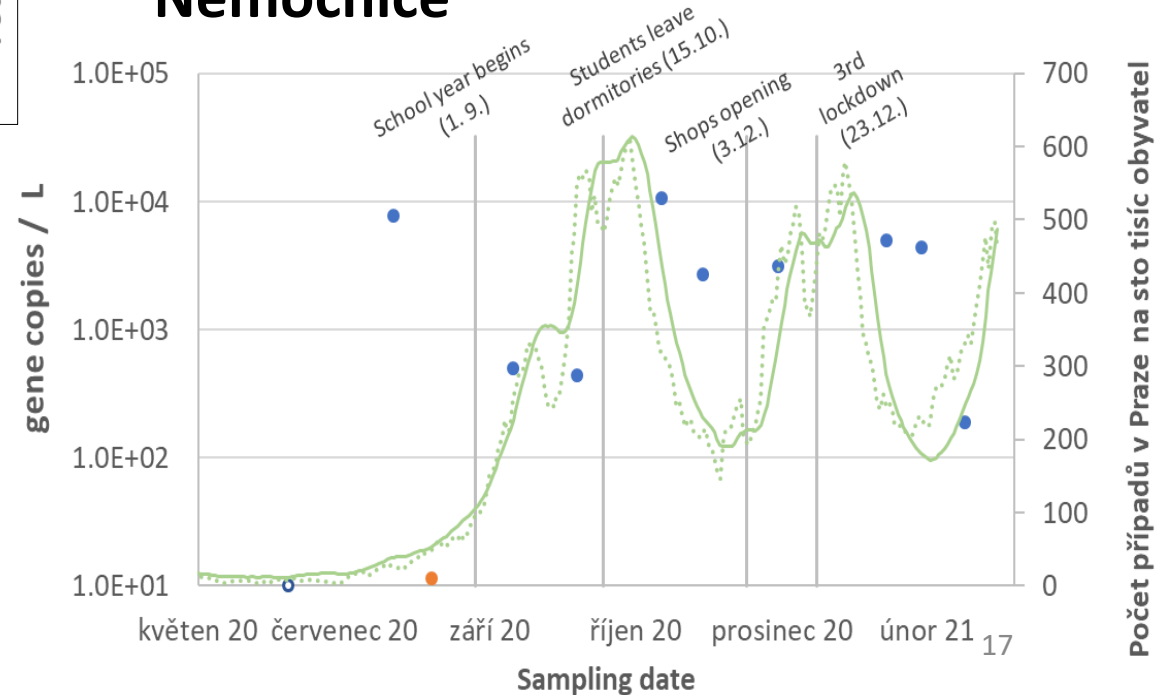
Rodinné domy



Výsledky – pilotní studie:

- Bodové vzorky
- 14 lokalit (3 x sídliště, ubytovna, letiště, nemocnice, nákupní centrum, atd.)
- korelace s epidemiologickými opatřeními

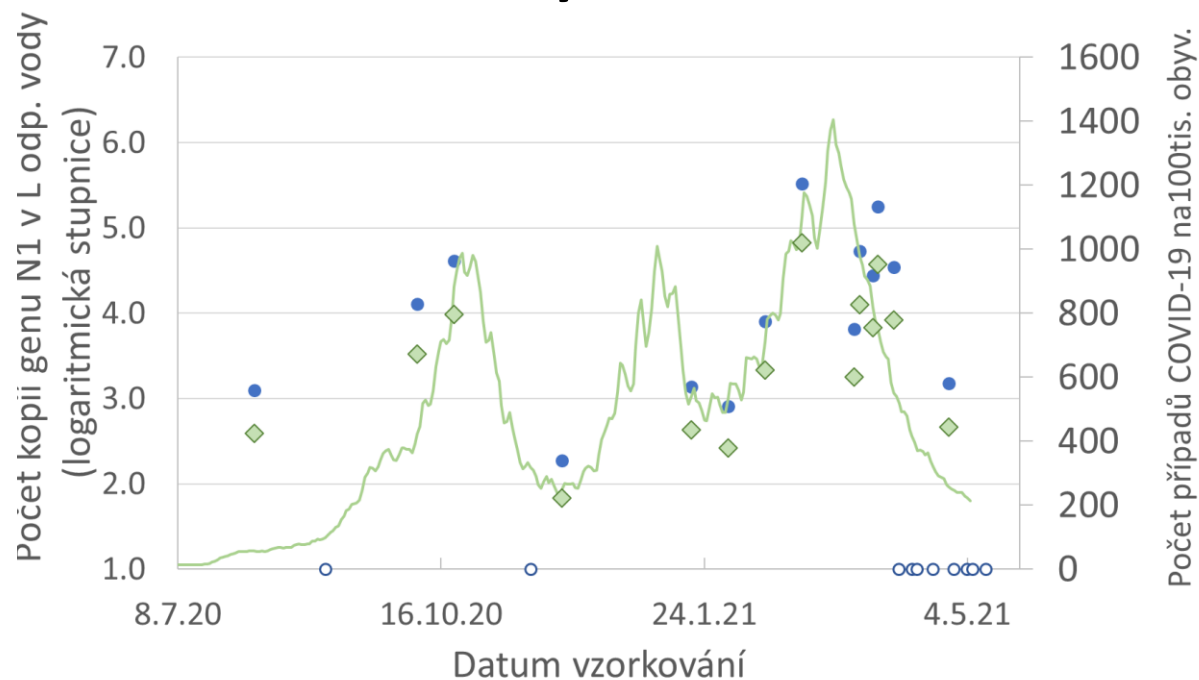
Nemocnice



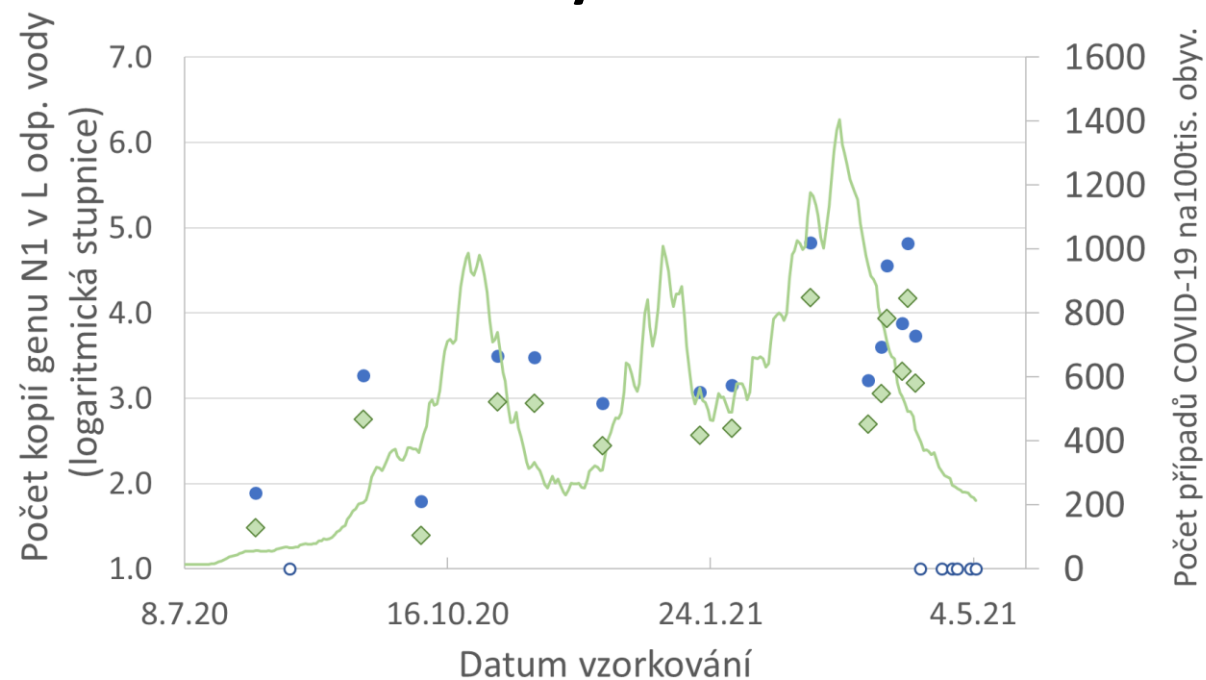
Dlouhodobý monitoring

- qPCR výsledky
- ◆ Odhad počtu nakažených
- Negativní výsledky
- Aktivní případy, 7denní průměr

Rodinné domy

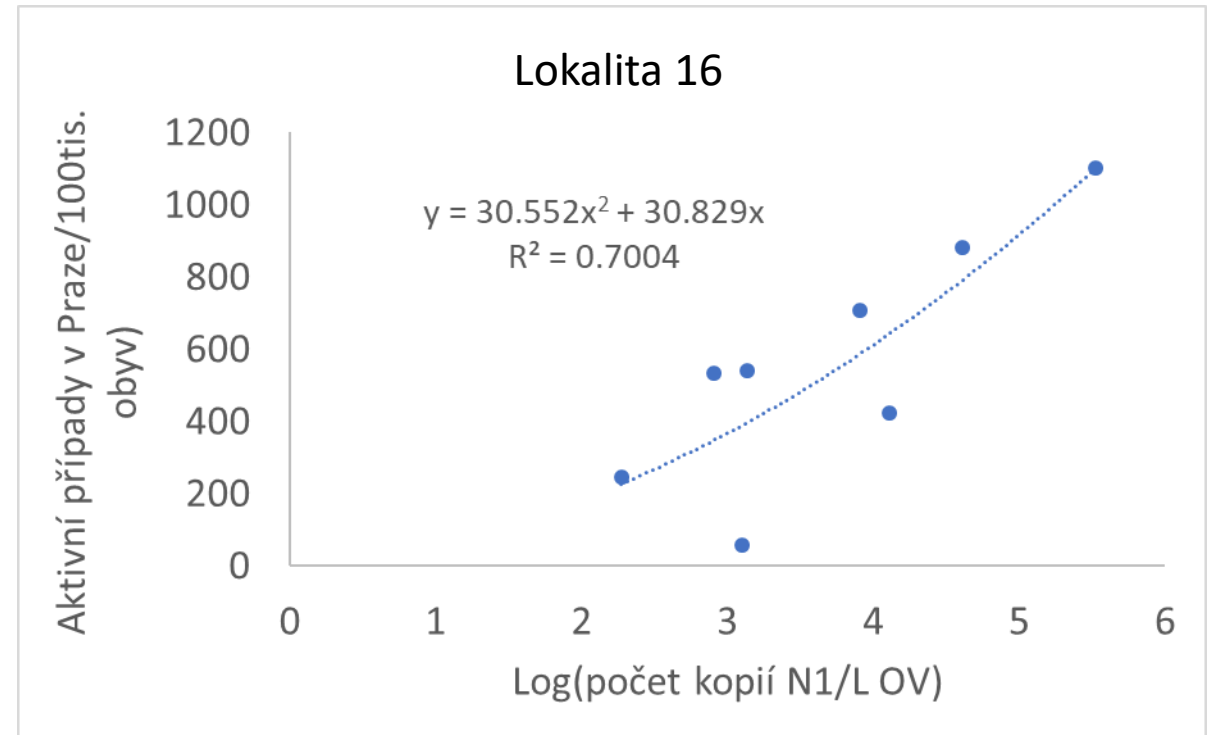


Centrum Prahy

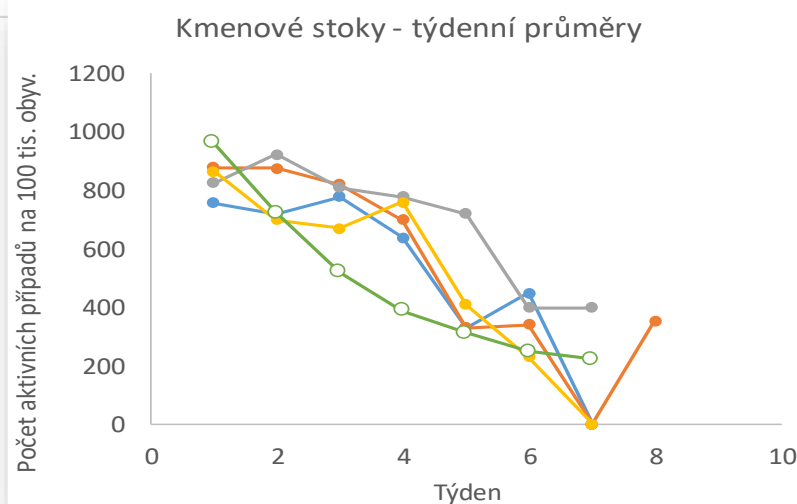
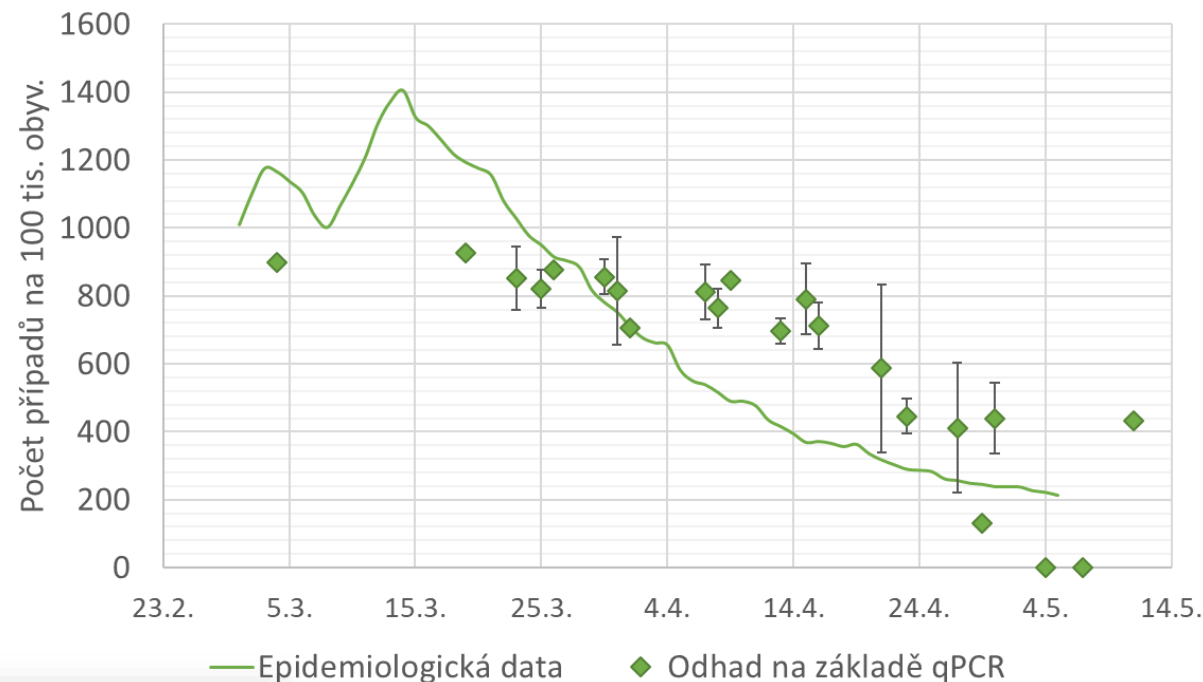
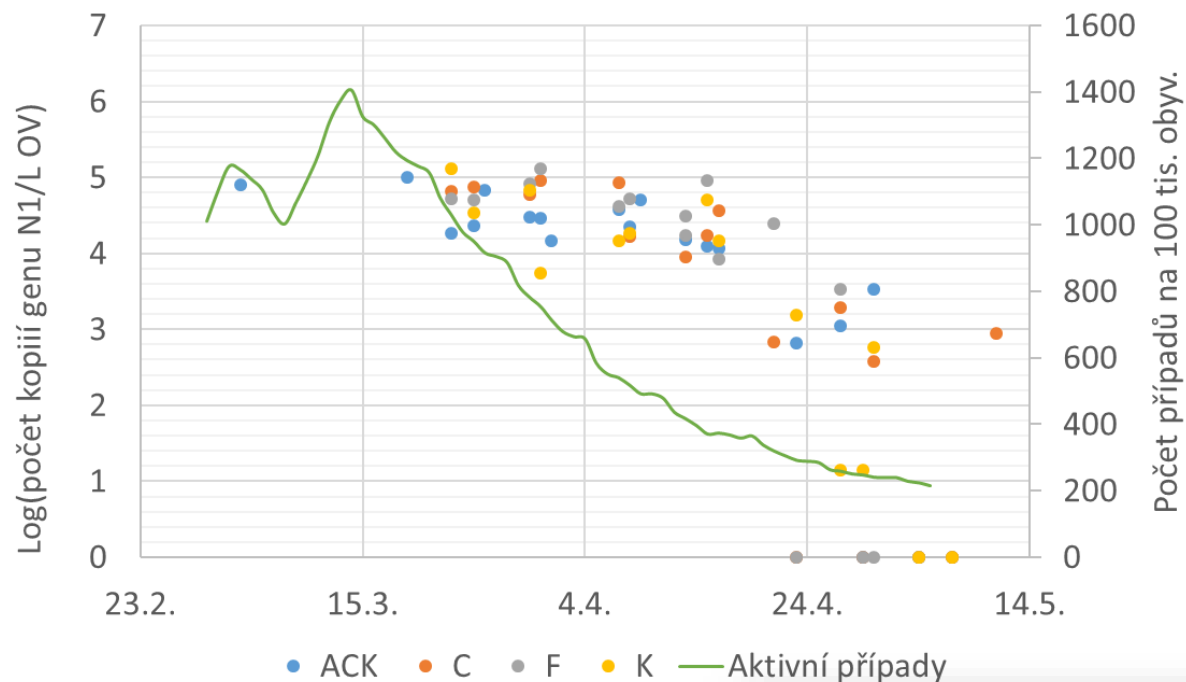


Dlouhodobý monitoring – korelace

- Korelace mezi množstvím kopií RNA na litr OV počtem nakažených v Praze
- Logaritmický vztah:
 - Bodové vzorky jsou užitečné pro monitoring
 - Kolísání průtoku není velký problém

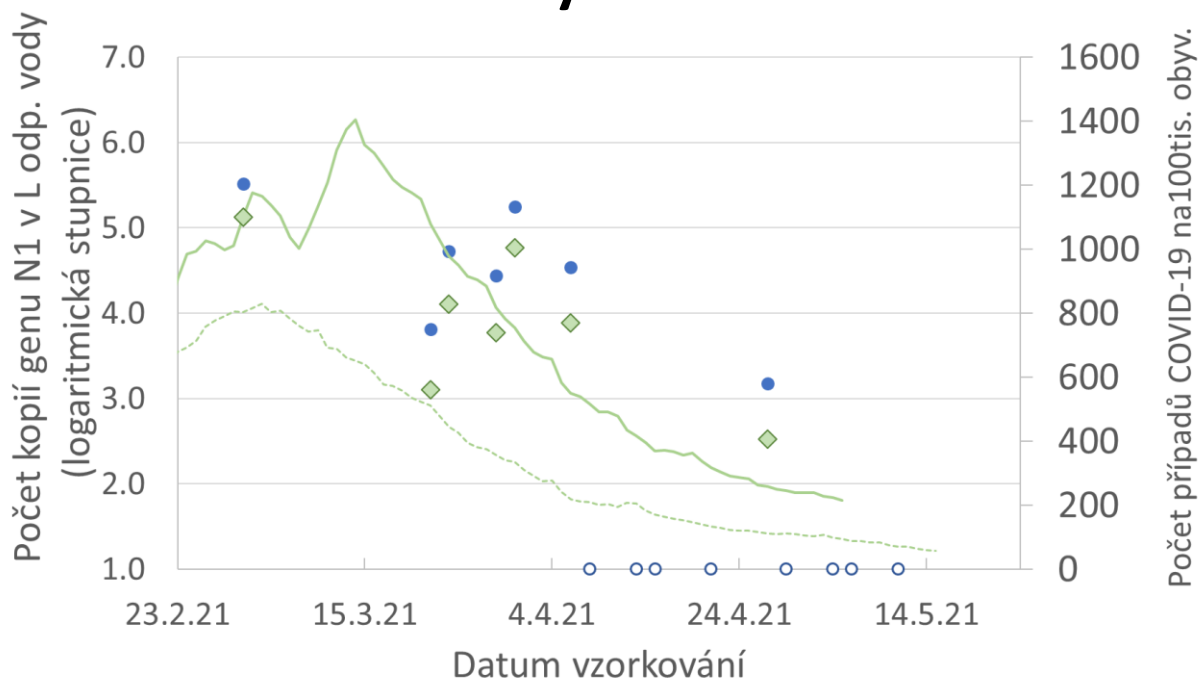


Intenzivní vzorkovací kampaň – kmenové stoky



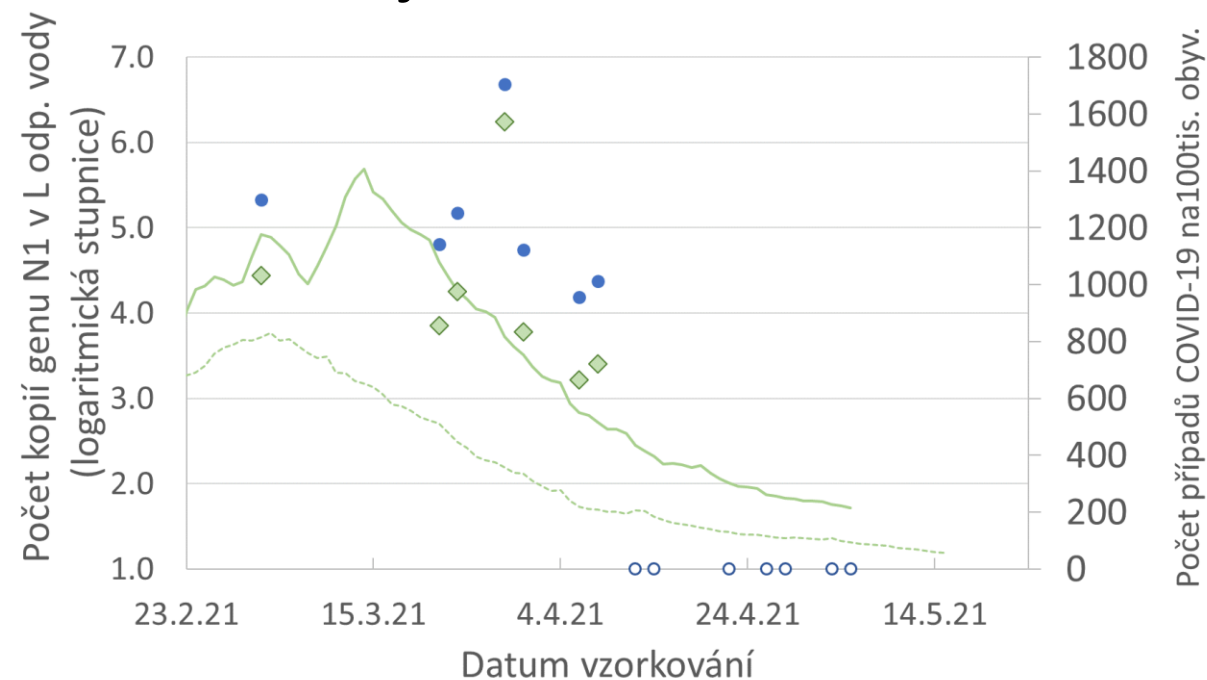
Intenzivní kampaň – Malé lokality

Rodinné domy



- ◆ Odhad počtu nakažených
- Výsledek qPCR
- Nově nakažení za posledních 7 dní

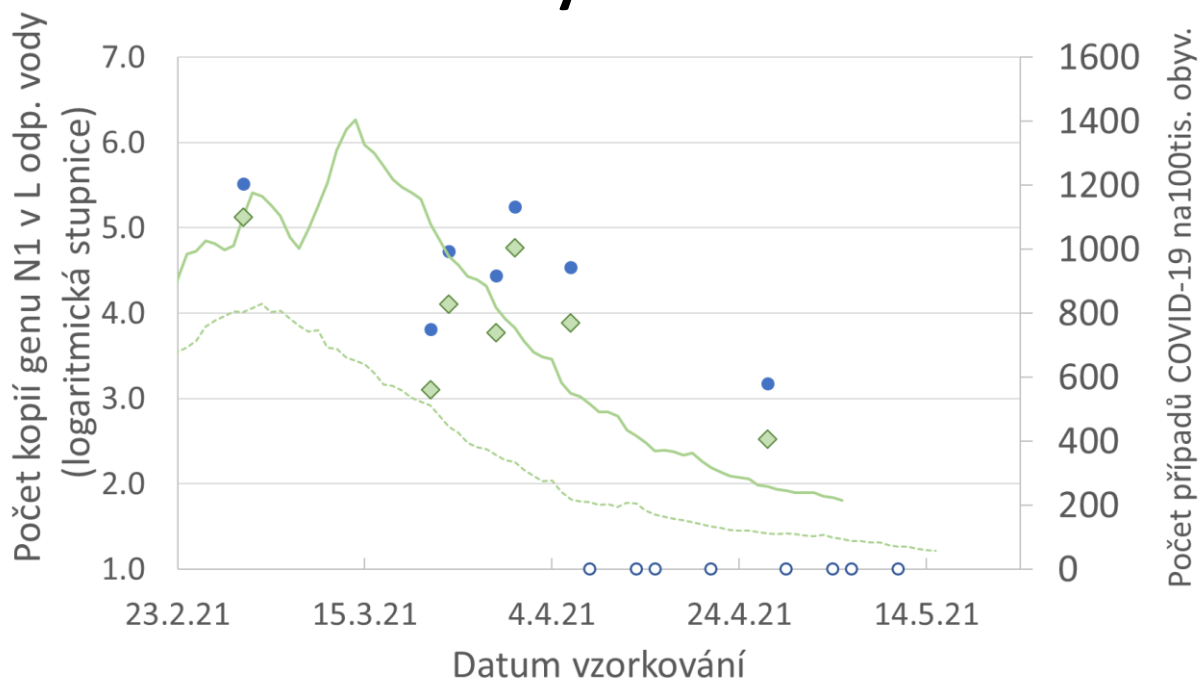
VŠ koleje



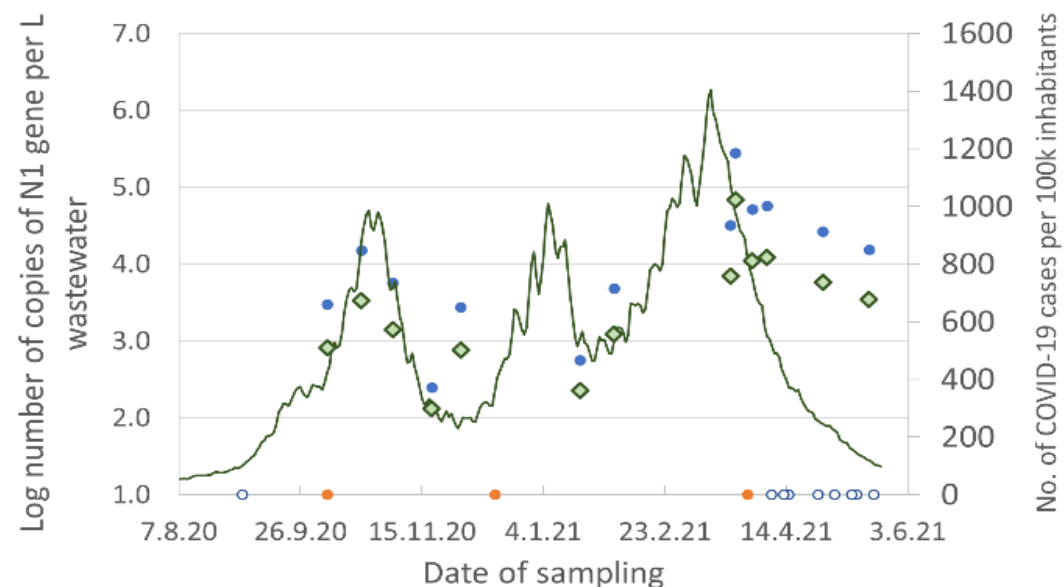
- Negativní vzorek
- Aktivní případy (13/5/2021)

Intenzivní kampaň – Malé lokality

Rodinné domy



Bytové domy



Závěr

- Úspěšné zavedení metodiky detekce SARS-CoV-2 v OV na VŠCHT Praha (akreditace)
- Dohled nad odpadními vodami má potenciál bojovat proti pandemii COVID-19
 - Dobrá korelace s epidemiologickými daty = možnost detekovat ohniska
 - Vzorky z kmenových stok (24 hodin) poskytují velmi dobrý popis epidemie
 - Je možné pracovat i s bodovými vzorky
 - Získání objektivních údajů o vývoji epidemie (bez chyb způsobených chováním populace)
 - nižší náklady než klinické testy (desítky až stovky vzorků týdně)
- Včasné varování lze poskytnout sledováním virové zátěže odpadních vod
 - Vztah k počtu nakažených není lineární (tvar poklesu se liší)
 - Real-time monitoring je možný
- Limitace:
 - Aby byla data epidemiologicky užitečná, je nezbytný výrazně častější odběr vzorků (alespoň dvakrát týdně).
 - Odstranění inhibice PCR
- Stručně: má to smysl! 😊

Výhled do budoucna

- Odběr vzorků v rámci projektu ARG Tech do 06/2022
 - Vysoká frekvence (2x týdně)
 - Menší množství lokalit (např. nemocnice, rodinné domy, atd)
- Monitoring známých variant viru (mutace)
 - VŠCHT vyvíjí metody (společně se SZÚ)
 - U některých variant již dostupné od komerčních společností
- Plánovaná publikace 😊
 - Dostupný preprint
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.21261272>
<https://medrxiv.org/cgi/content/short/2021.07.28.21261272v1>

Monitoring COVID-19 spread in Prague local neighborhoods based on the presence of SARS-CoV-2
RNA in wastewater collected throughout the sewer network

Authors: Kamila Zdenkova¹, Jana Bartackova², Eliska Cermakova¹, Katerina Demnerova¹, Alzbeta Dostalkova³, Vaclav Janda², Zuzana Novakova⁴, Michaela Rumlova³, Jana Rihova Ambrozova², Klara Skodakova², Iva Swierczkova⁵, Petr Sykora⁴, Dana Vejmelkova², Jiri Wanner², Jan Bartacek²

¹ Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague, Czechia

² Department of Water Technology and Environmental Engineering, University of Chemistry and Technology Prague, Czechia

³ Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology Prague, Czechia

⁴ Pražské vodovody a kanalizace, a.s., Czechia

⁵ Military Health Institute, Military Medical Agency, Tychonova 1, 160 01 Prague 6, Czechia

Poděkování

Pracovní skupina:

- *Jan Bartáček, Jana Bartáčková, Kristýna Časarová, Eliška Čermáková, Kateřina Demnerová, Alžběta Dostálková, Stanislav Gajdoš, Václav Janda, Ivana Křížová, Zuzana Nováková, Tomáš Ruml, Michaela Rumlová, Jana Říhová Ambrožová, Klára Škodáková, Dana Vejmelková, Jiří Wanner, Kamila Zdeňková*
- **VŠCHT Praha:**
 - Ústav **Technologie vody a prostředí**, technologie vody
 - Ústav **Biochemie a Mikrobiologie (FPBT)**, molekulární biologie RNA
 - Ústav **Biotechnologie (FPBT)**, virologie
- Pražské vodovody a kanalizace (**PVK, a. s.**)
- Vojenský zdravotní ústav, Státní zdravotní ústav

Financování:

- TA ČR projekt (SS01020112): Technologie pro odstraňování antibiotické rezistence z čistírenských kalů používaných v zemědělství
 - *Rozšíření projektu související s pandemií COVID-19: **Monitorování výskytu a perzistence viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách***
- AQUA-CONTACT Praha, v.o.s. za podporu a možnost odběru vzorků na ČOV SEVER a Letiště Václava Havla (jih)

Děkuji Vám za pozornost!

- fialovae@vscht.cz
- bartacej@vscht.cz

