

# Proces zavádění metodiky detekce SARS-CoV-2 v odpadních vodách na VŠCHT Praha

*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: ÚTVP, ÚBM, ÚB  
PVK, a. s.

# Motivace zavedení stanovení SARS-CoV-2

- nástroj k monitoringu cirkulace tohoto viru v populaci
- dřívější varování příchodu nové vlny
- aktuální téma výzkumu a pedagogiky

# Spolupráce – spojení odborností

- technologie vody (Ústav technologie vody a prostředí)
- virologie (Ústav biotechnologie)
- molekulární biologie RNA (Ústav biochemie a mikrobiologie)
  
- konzultace – Petra Vašíčková (VUVeL); KWR; Promega

# Financování

- interní zdroje na nákup chybějících přístrojů pro předúpravu vzorků - umístění v jedné lab.



- rozšíření TA ČR projektu „Technologie pro odstranění antibiotické resistance z čistírenských kalů aplikovaných v zemědělství“ (ARGTech)

# Vzorkování

- pražská stoková síť
- Letiště Václava Havla
  
- bodové vzorky – ranní časy

# Původně zvolený postup detekce SARS-CoV-2



- pasterizace: 60 °C; 1,5 h
- filtrace přes 0,45µm membránový filtr
- 8% PEG8000 + NaCl
- CF 12 000 g; 4 °C; 2 h
- Trizol (- 80 °C)
- izolace RNA
- RT-qPCR

The screenshot shows the medRxiv preprint server interface. At the top, there are logos for medRxiv, CSH Cold Spring Harbor Laboratory, and BMJ Yale. The article title is "SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases". Below the title, the authors are listed: FQ Wu, A Xiao, JB Zhang, XQ Gu, WL Lee, K Kauffman, WP Hanage, M Matus, N Ghaeli, N Endo, C Duvallet, K Moniz, TB Erickson, PR Chai, J Thompson, EJ Alm. The DOI is provided as <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>. A note indicates it is now published in *mSystems* with DOI: [10.1128/msystems.00614-20](https://doi.org/10.1128/msystems.00614-20). The interface includes tabs for Abstract, Full Text, Info/History, and Metrics, along with a "Preview PDF" button. The abstract text is partially visible, starting with "Wastewater surveillance may represent a complementary approach to measure the presence and even prevalence of infectious diseases when the capacity for clinical testing is limited. Moreover, aggregate, population-wide data can help inform modeling efforts. We tested wastewater collected at a major urban treatment facility in".

# Úprava postupu detekce SARS-CoV-2

## PASTERIZACE

- ztráty?



~~PASTERIZACE~~

## FILTRACE

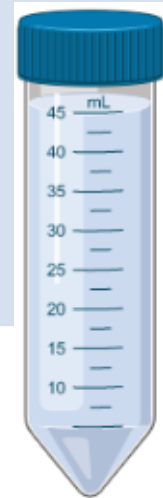
- ucpávání filtrů
- vyšší náklady



~~FILTRACE~~ CENTRIFUGACE

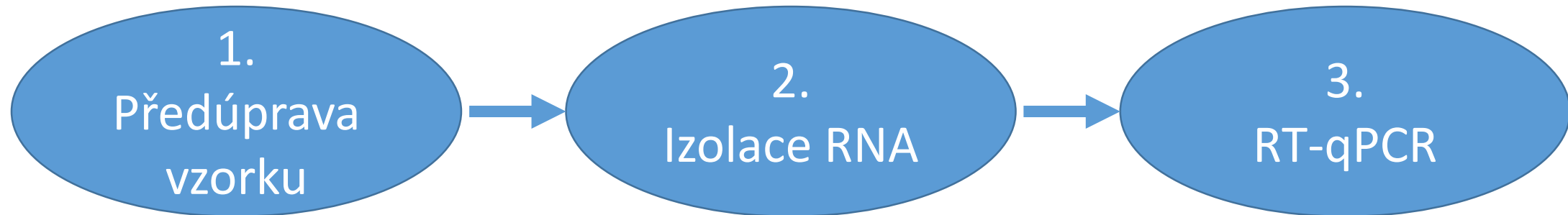
## OBJEM VZORKU

- 80 ml
- 120 ml
- 160 ml



Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)

# Detekce SARS-CoV-2 v OV





# Optimalizace jednotlivých kroků

1.

Předúprava  
vzorku

- Srážení pomocí PEG+NaCl

Ozn.	% PEG	Doba inkubace	Doba CF
V1	8	0 h	30 min
V2	8	0 h	2 h
V3	16	0 h	2 h
V4	8	2 h	2 h
V5	16	2 h	2 h
V6	16	0 h	30 min
V7	8	2 h	30 min
V8	16	2 h	30 min

- Výstup: **16% PEG, 2h inkubace, 30 min CF**

# Optimalizace jednotlivých kroků

## 2. Izolace RNA

- Trizol

Způsoby izolace
Trizol + glykogen
Trizol + BSA
Trizol + ultra
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

- Výstup: **Trizol zatím nejlepší**
- Možnosti: další kity/přečišťovací kit

# Optimalizace jednotlivých kroků

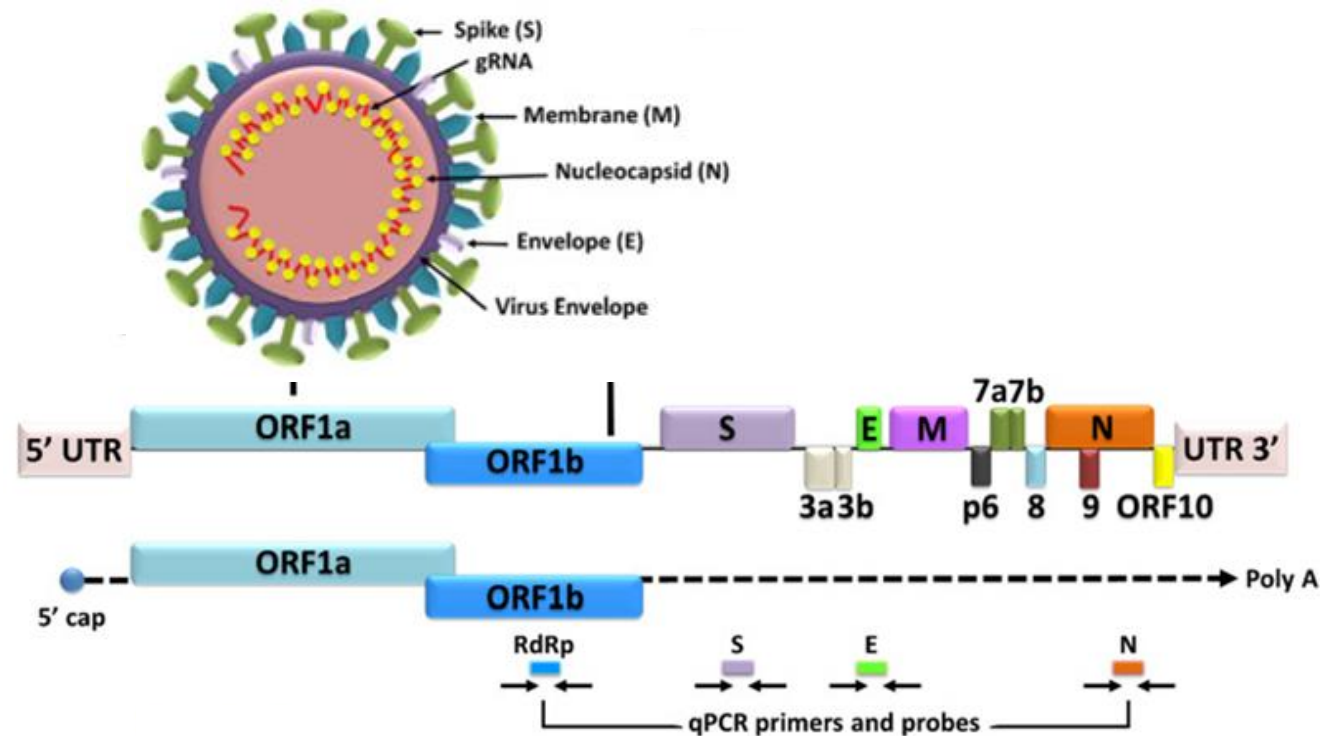
## 3. RT-qPCR

- 1kroková RT-qPCR
- gen N1, S, RdRp

### Průběh RT-qPCR

+ BSA → **potlačení inhibice?**

- Výstup: **nejednoznačný**



Hamouda et al. 2021

# Optimalizace jednotlivých kroků

## 3. RT-qPCR

Hamouda et al. 2021

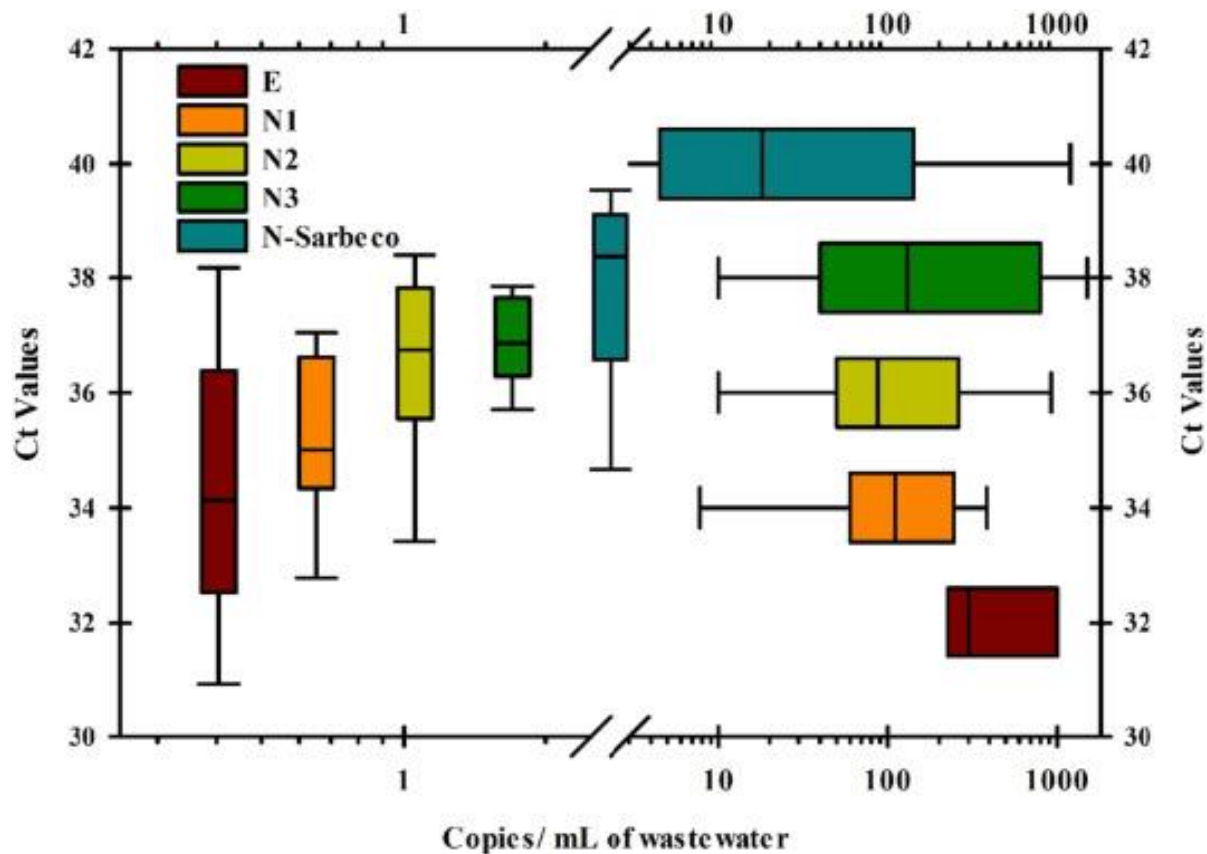


Fig. 11. Srovnávací analýza hodnot Ct vzhledem k počtu virových kopií z různých studií.

Citlivost: N-Sarbeco > N3 > N2 > N1 > E

# Optimalizace jednotlivých kroků

## 3. RT-qPCR

Jung et al. 2020

- testovali 10 primer setů
- nejcitlivější: CDC-designed N2 a N3
- netestovali N-Sarbeco

Ahmed et al. 2020

- N1, N2 > N-Sarbeco (mutace?)

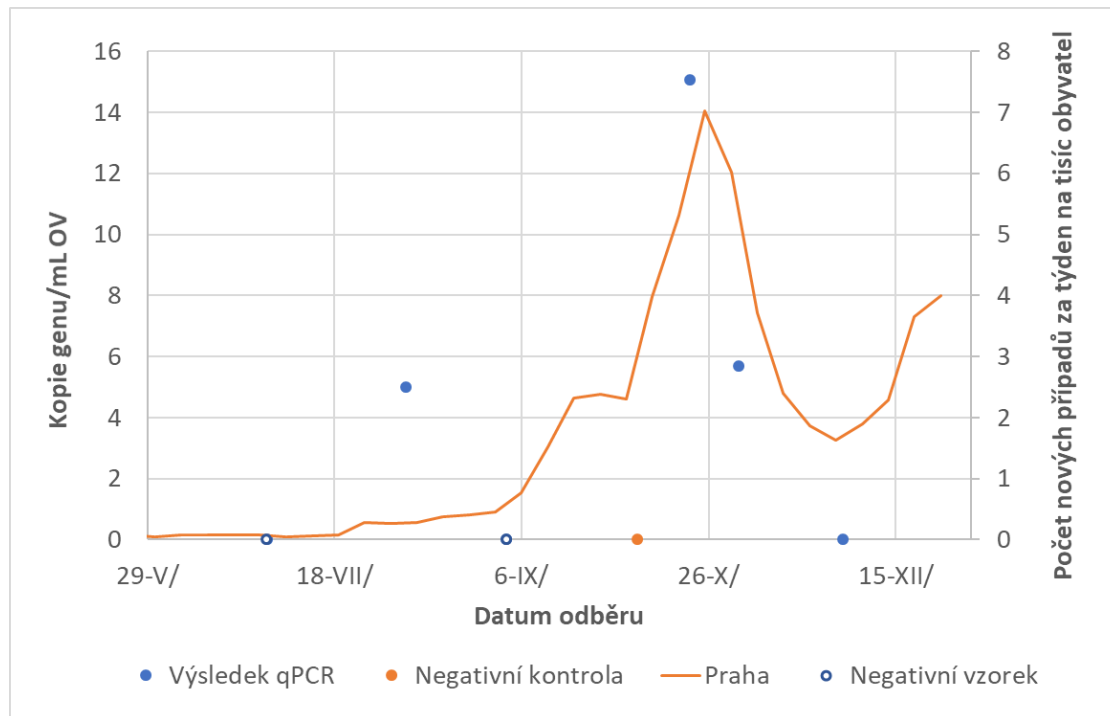
→ Zkusit jiné cílové geny/primer sety?

# Výsledky

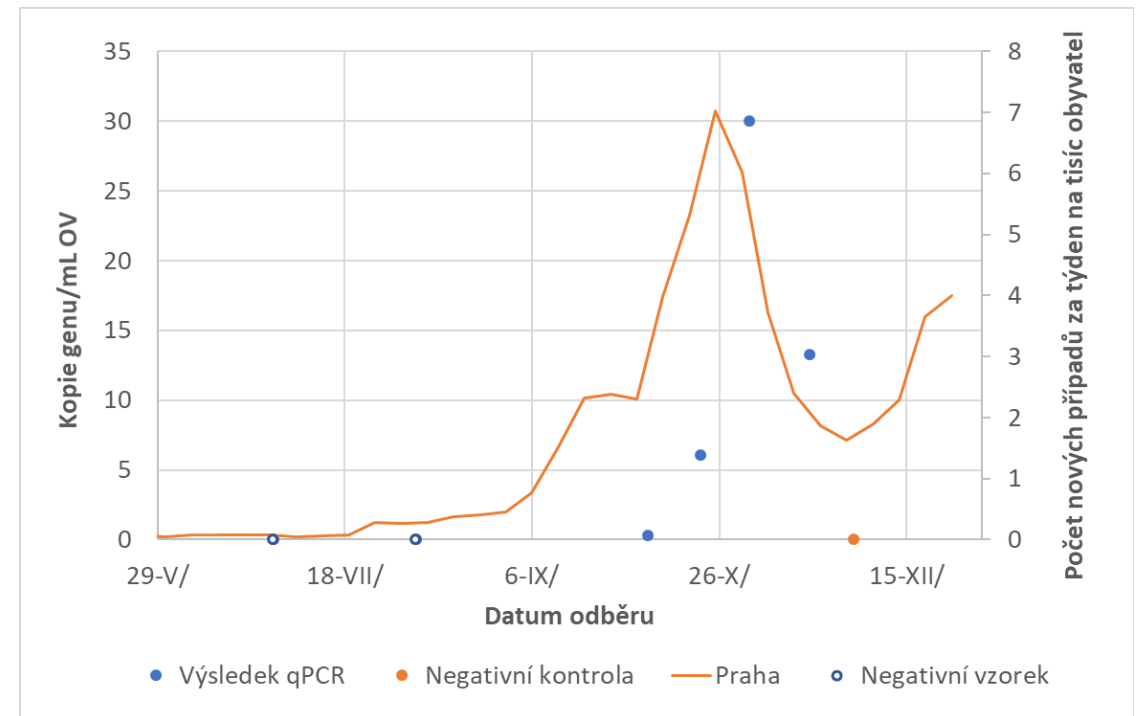
Odběrová místa pražská stoková síť	Maxima kopie genů/mL OV
Vysokoškolské koleje	70,3
Rodinné domy	40,9
Sídliště	30,0 / 15,1
Centrum	17,1
Nemocnice	10,7
Průmyslový areál	5,0
Kancelářská čtvrť	0,8
<b>ČOV - Letiště V. Havla</b>	
Sever	0,6
Jih	pod LK

# Výsledky

## Sídlíště 1

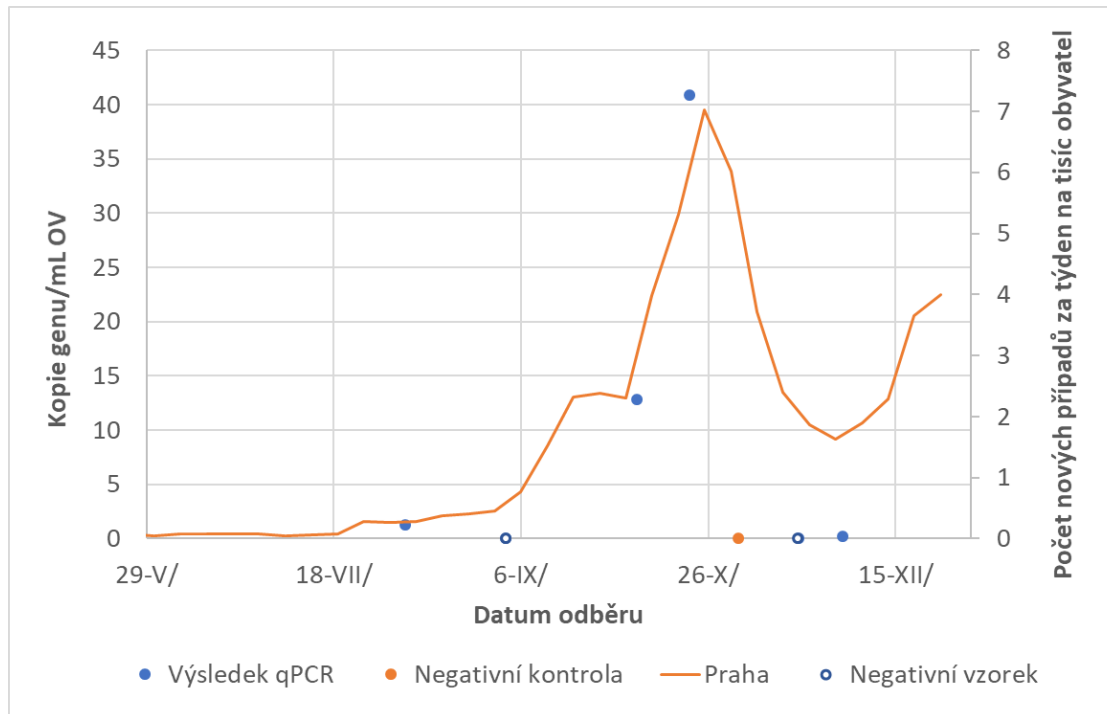


## Sídlíště 2

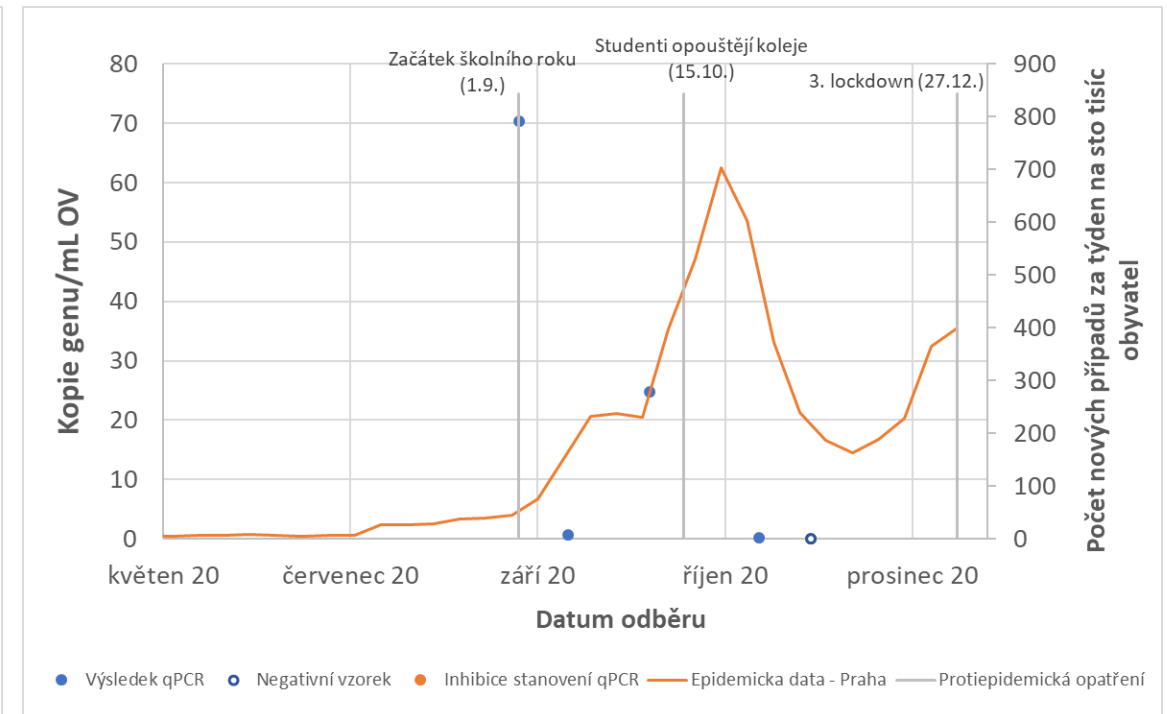


# Výsledky

## Rodinné domy



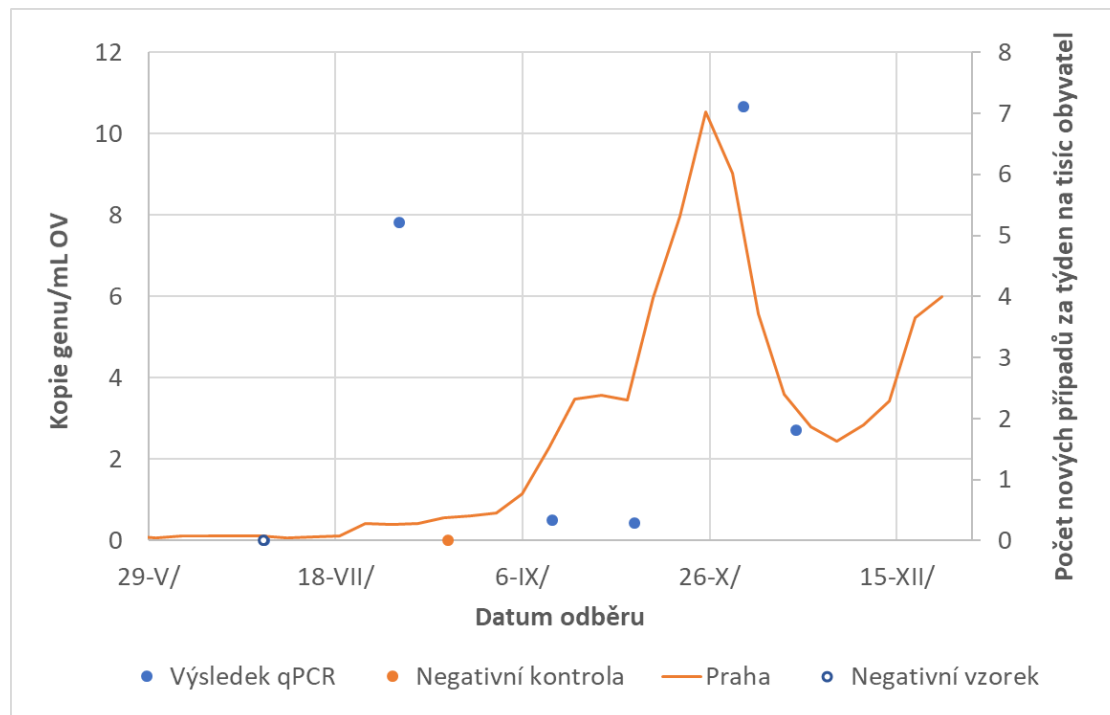
## VŠ koleje



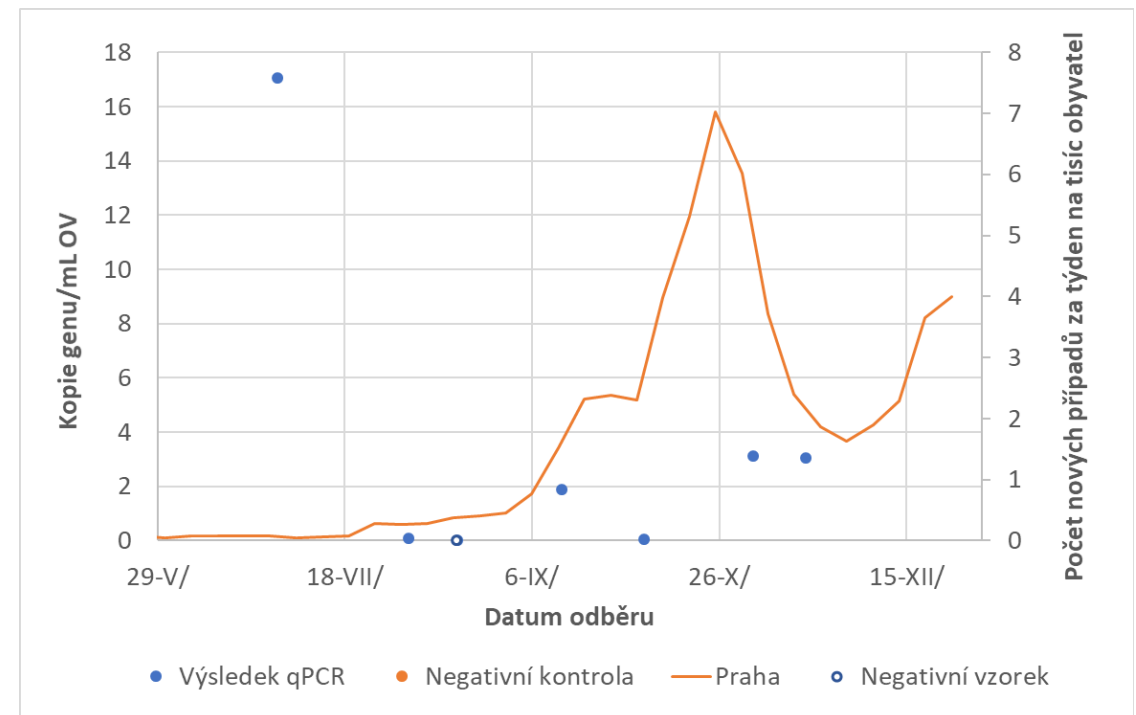


# Výsledky

## Nemocnice

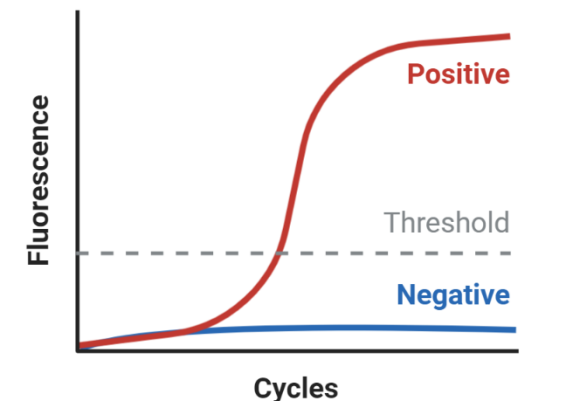


## Centrum



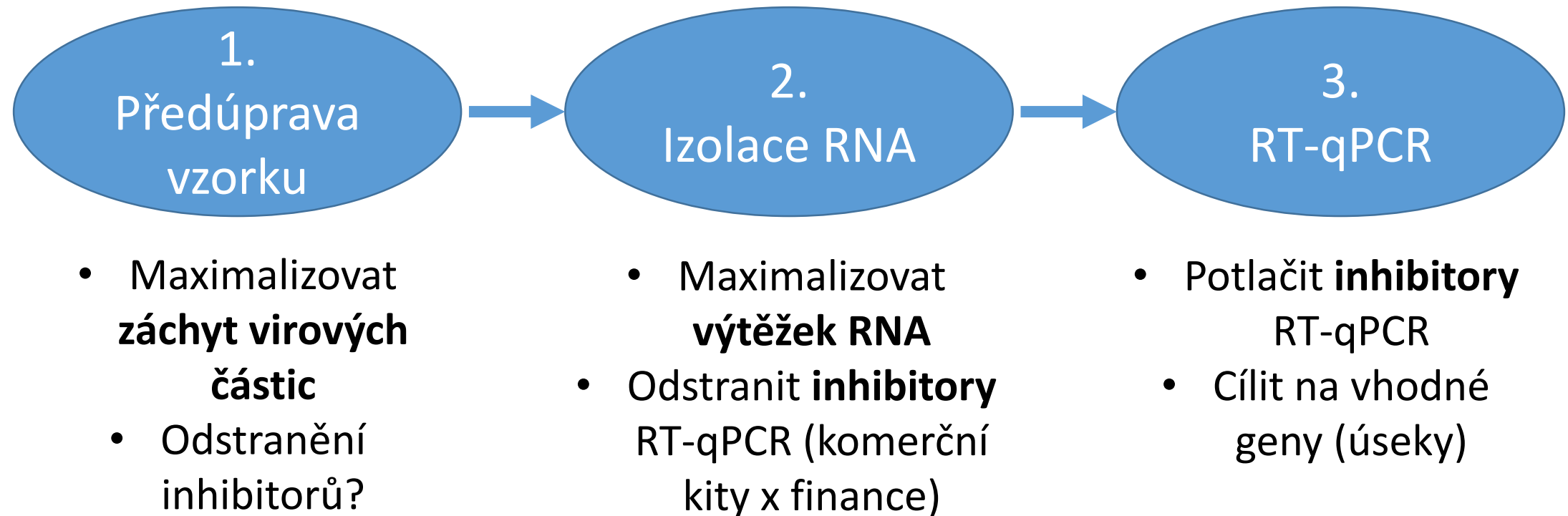
# Shrnutí

- Úspěšné zavedení metodiky detekce SARS-CoV-2 v OV na VŠCHT Praha
- Cenná spolupráce výzkumnic a výzkumníků z různých oborů
- Limit detekce vs. kvantifikace
- Bodové vs. slévané vzorky



Created in BioRender.com [bio](#)

# Shrnutí

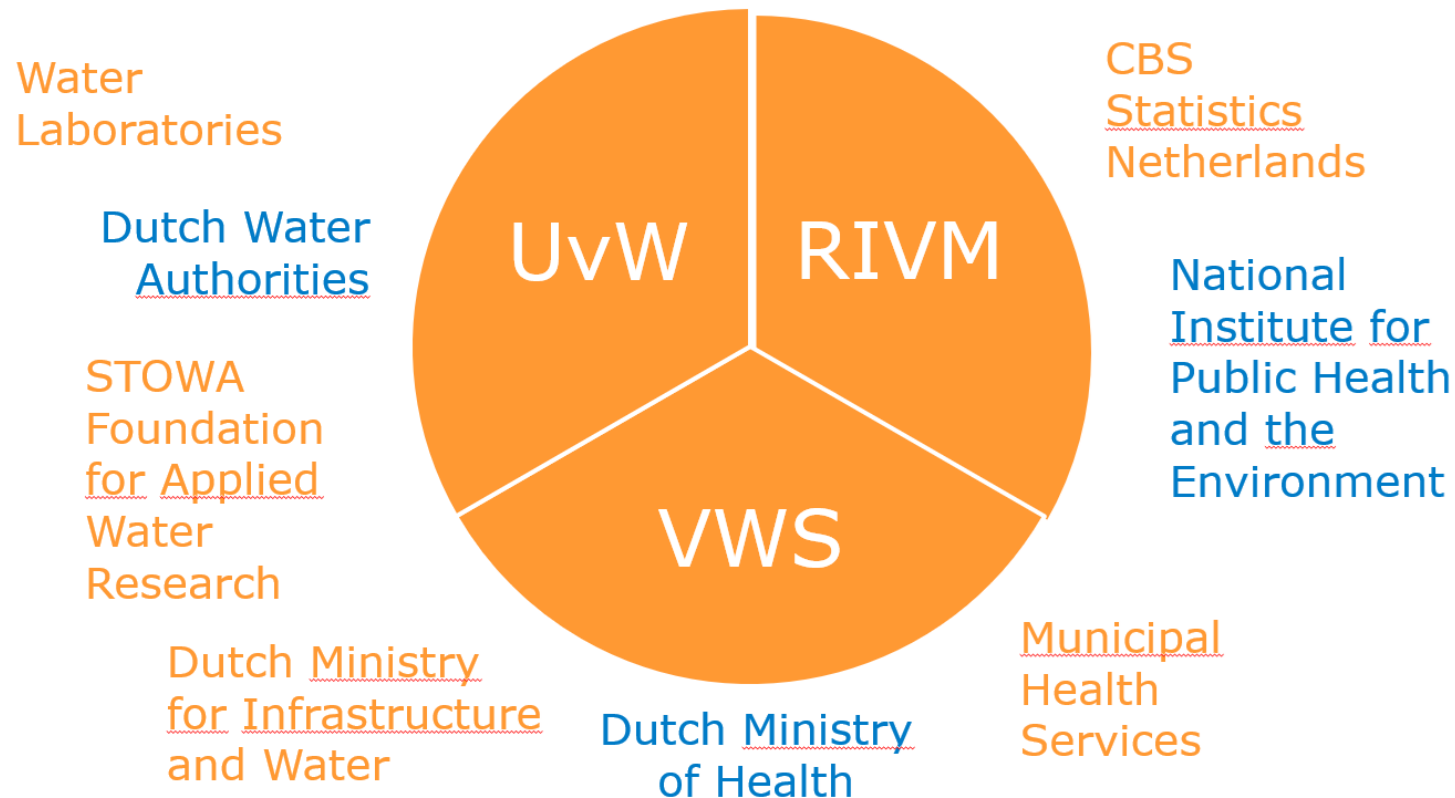


# Výzva ke spolupráci na národní úrovni

# Národní monitoring OV – Nizozemí

Heike Schmitt - RIVM

## National Sewage Surveillance – Partnership



vzorkováno > 300 ČOV



## Coronavirus dashboard

[Latest developments](#)

[National](#)

[Safety regions](#)

[Municipalities](#)

[About this dashboard](#)



### Measures

There are national measures



## Vaccinations



### Vaccinations

Vaccine doses administered



**595,934** Value of 9 February 2021

## Early indicators



## Virus particles in wastewater

Average number of coronavirus particles per 100.000 inhabitants found in wastewater. The weekly average is calculated by adding up all the values measured at roughly 300 locations and dividing this by the number of measurements taken. If someone is infected with coronavirus, coronavirus particles will usually be present in their excrement, which is carried away into the sewers. By testing wastewater samples collected at treatment plants, we can find out how much of the virus is present in a given area. Such testing is still experimental. In the long run we hope that wastewater testing will enable early detection and monitoring of coronavirus. [Find out more about testing wastewater for coronavirus in the explanation of data presented.](#)

🕒 Last values obtained on Tuesday, 9 February. Is updated on a daily basis.

📄 Source: [RIVM](#)

📄 Download data: [RIVM](#)

# Výzva ke spolupráci na národní úrovni Česko + Slovensko?

## VŠ, výzkumná centra, laboratoře, ...

- rozsáhlejší vzorkování
- společná optimalizace metod
- jednotná analýza dat
- koordinace

## Státní instituce a další subjekty

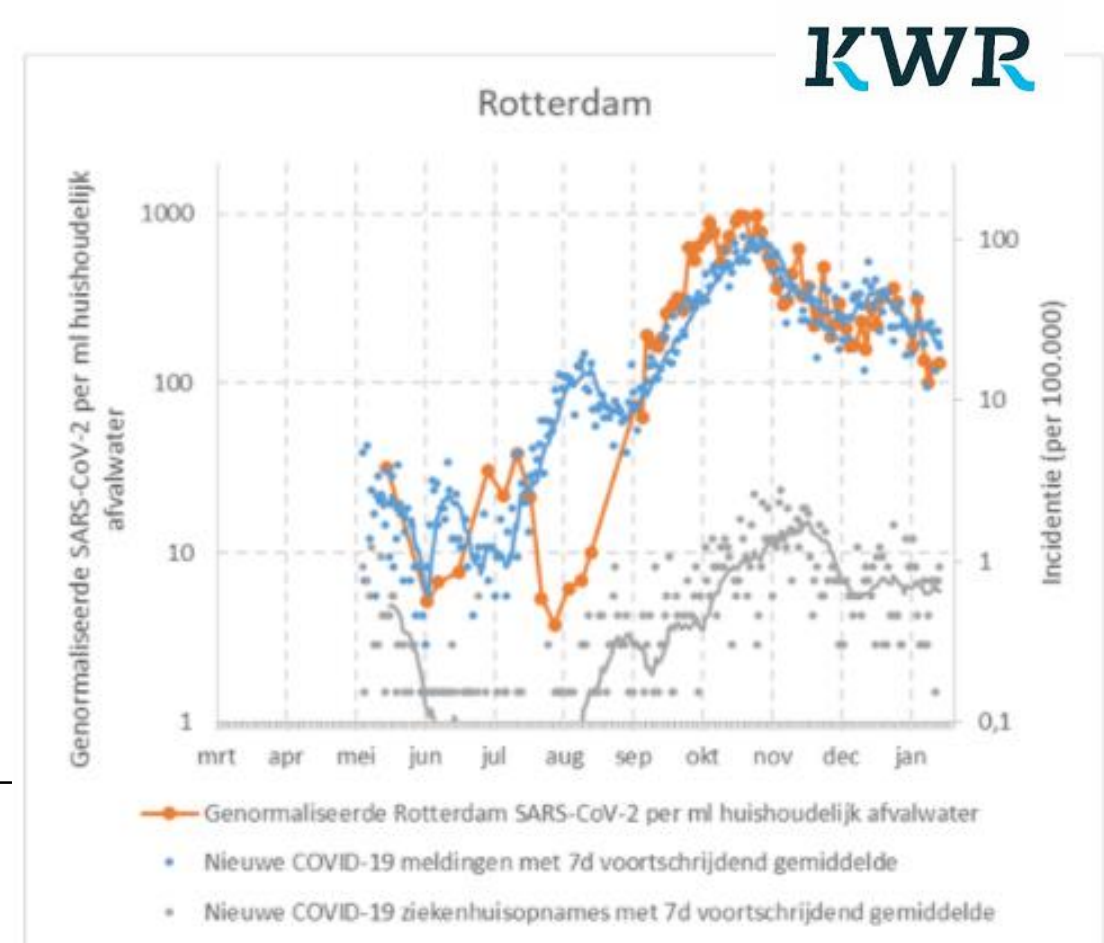
- SZU, VÚV
- SOVAK, CzWA
- ministerstva
- ...

# Výzva ke spolupráci na národní úrovni Česko + Slovensko?

VŠ, výzkumná centra, laboratoře, ...

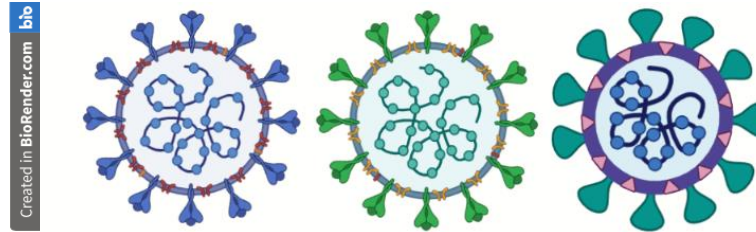
Státní instituce a další subjekty

- zajištění vzorků (odběr, transport)
- financování
- rutinní analýzy
- sdílení a využití dat





# Poděkování



*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: ÚTVP, ÚBM, ÚB  
PVK, a. s.

# Poděkování



AQUA-CONTACT Praha, v.o.s. za podporu a možnost vzorkování na ČOV SEVER a JIH Letiště Václava Havla

TAČR – rozšíření projektu SS01020112

*Technologie pro odstranění antibiotické resistance z čistírenských kalů aplikovaných v zemědělství*

## ***Děkuji za pozornost***

[dana.vejmelkova@vscht.cz](mailto:dana.vejmelkova@vscht.cz)

# Reference

- Ahmed W., Bertsch P.M., Angel N., Bibby K., Bivins A., Dierens L., Edson J., Ehret J., Gyawali P., Hamilton K., Hosegood I., Hugenholtz P., Jiang G., Kitajima M., Sichani H.T., Shi J., Shimko K.M., Simpson S.L., Smith W.J.M., Symonds E.M., Thomas D.S.C., K.V., Verhagen R., Zaugg J., Mueller J.F. Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travelers. *Journal of Travel Medicine*. 2020 doi: 10.1093/jtm/taaa116.
- Hamouda, M.; Mustafa, F.; Marafa, M.; Rizvi, T.; Aly Hassan, A. Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: Lessons learnt from recent studies to define future applications, *Science of The Total Environment*, 2021, 759, 143493.
- Jung Y.J., Park G.-S., Moon J.H., Ku K., Beak S.-H., Kim S., Park E.C., Park D., Lee J.-H., Byeon C.W. 2020. Comparative Analysis of Primer-probe Sets for the Laboratory Confirmation of SARS-CoV-2. (BioRxiv)
- Wu, F.; Xiao, A.; Zhang, J.; Gu, X.; Lee, W. L.; Kauffman, K.; Hanage, W.; Matus, M.; Ghaeli, N.; Endo, N.; Duvallet, C.; Moniz, K.; Erickson, T.; Chai, P.; Thompson, J.; Alm, E. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *MedRxiv* [preprint], 2020.