

DETEKCE VIRŮ V ODPADNÍCH VODÁCH V ČR JAKO NÁSTROJ VČASNÉHO EPIDEMICKÉHO VAROVÁNÍ

**Hana Zvěřinová Mlejnková¹, Kateřina Sovová¹, Lucia Gharwalová¹,
Petra Vašíčková², Věra Očenášková¹, Alena Fialová³, Eva Juranová¹**

¹) Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i., Praha, Brno

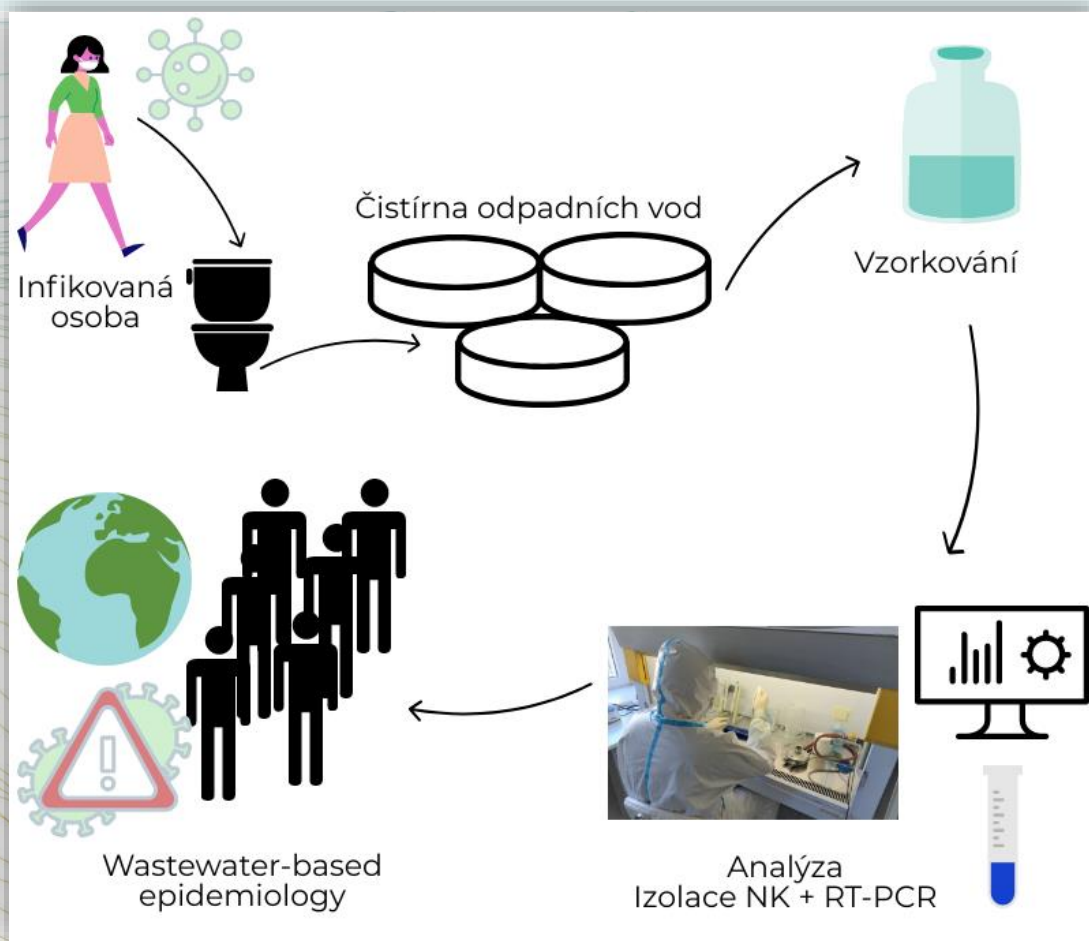
²) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

³) Státní zdravotní ústav, Praha

WBE („Wastewater-Based Epidemiology“) přístup

- princip:
 - diagnostika odpadních vod za účelem zjištění přítomnosti specifické látky nebo markeru v populaci nebo konkrétní komunitě;
 - nečištěné odpadní vody jsou recipientem všech látek, vylučovaných lidmi a za použití vhodných metod jsou v nich detekovatelné, za předpokladu, že nedošlo k jejich rozkladu;
- využití:
 - v epidemiologii - skupinové diagnostické médium (např. celosvětová eradikace dětské obrny), monitoring ohnisek infekčních agens; sledování nástupu epidemií
 - v nemedicínských oborech - stanovení markerů životního stylu (drogy a jiné návykové látky, výrobky osobní péče, léčiva...) globálně nebo v problémových lokalitách;
- aktuálně:
 - pandemické rozšíření koronaviru SARS-CoV-2 vykazuje od roku 2020 cyklický průběh po sobě následujících vln šíření nemoci covid-19 = **systematická detekce viru v odpadních vodách je efektivní epidemiologický nástroj**

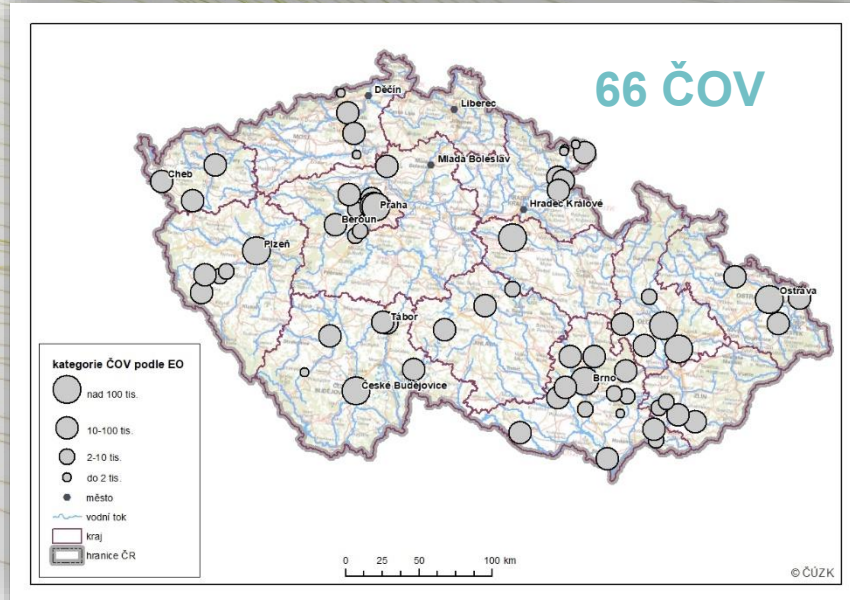
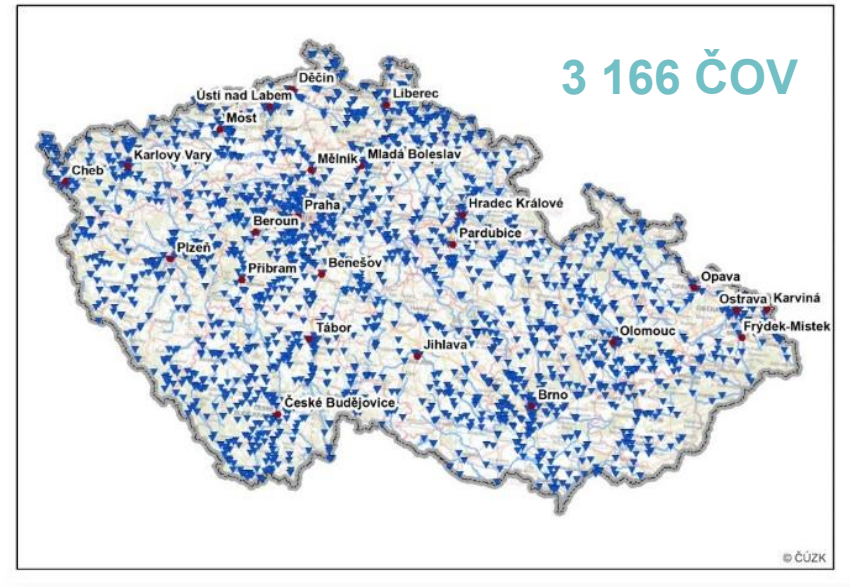
WBE („Wastewater-Based Epidemiology“) přístup



Cíl projektu COVMON 2021-2022: „Metodika využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování“

Monitoring odpadních vod na ČOV v ČR

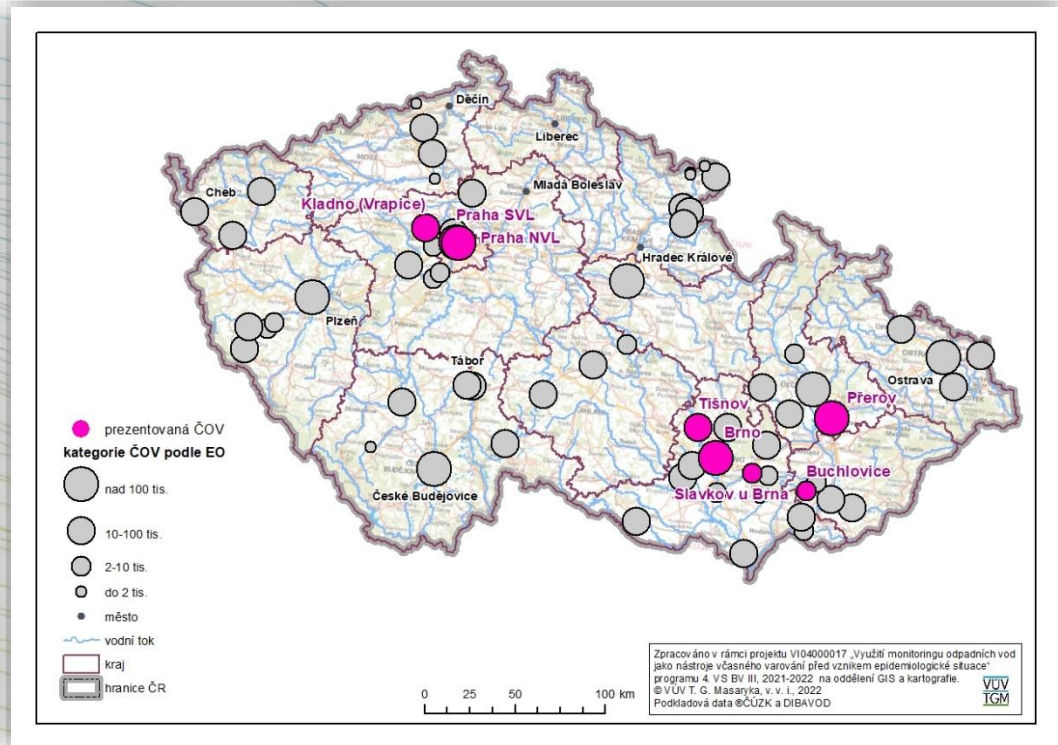
- V ČR 3 166 ČOV = napojeno 80 % obyvatel;
- od 4/2020 dosud (4 etapy);
- 66 ČOV různých kategorií (nejvíc 10-100 tis. = 36);
- 630 vzorků – nátoky (odtoky = 40);
- v různém časovém režimu – prosté, slévané 24hod C nebo B;
- na nátoku do ČOV za česlemi



Odběry vzorků odpadních vod na vybraných ČOV

8 ČOV různých kategorií:

- Buchlovice (2 340 NO=napojených obyvatel);
- Slavkov u Brna (6 500 NO);
- Tišnov (11 500 NO);
- Přerov (41 000 NO);
- Kladno (80 000 NO);
- Brno (cca 426 000 NO)
- ÚČOV Praha NVL (nová vodní linka)
- ÚČOV Praha SVL (stávající vodní linka), obě cca 600000 NO.



Aktuálně: 5 ČOV, 1x týdně

10-100 tis. EO:

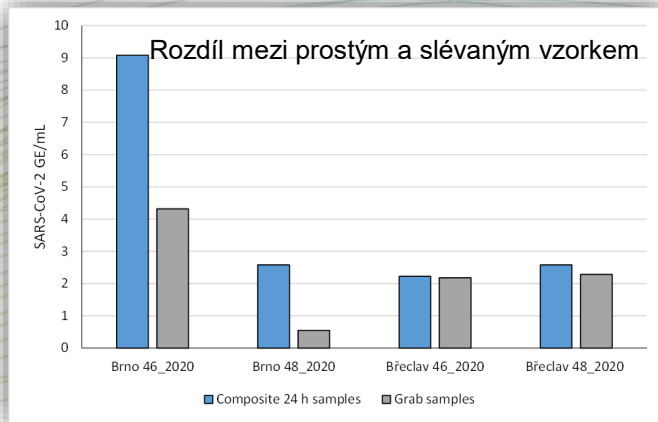
- Břeclav: 24 300 NO
- Kladno 80 000 NO

>150 tis. EO:

- Brno (cca 426 000 NO);
- ÚČOV Praha NVL (nová vodní linka)
- ÚČOV Praha SVL (stávající vodní linka), obě cca 600 000 NO

Ověřování postupu – odběry vzorků

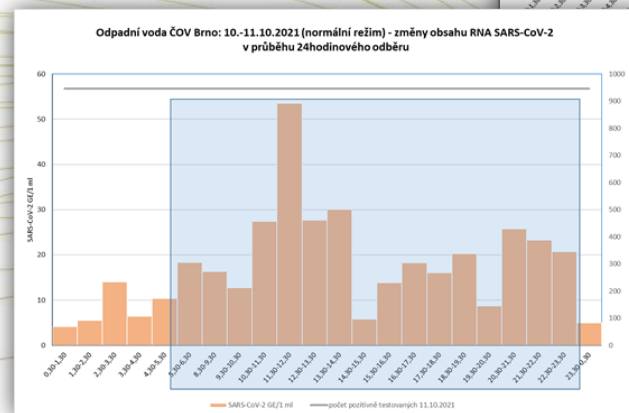
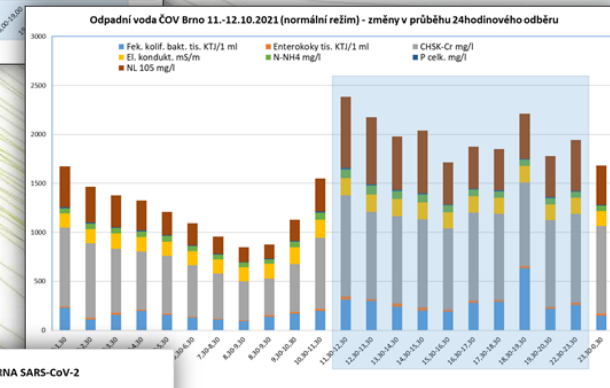
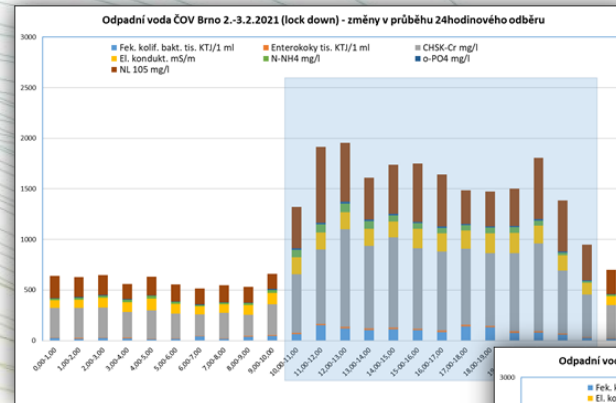
1. rozdíl prostý X slévaný



2. homogenita vzorku



3. časové řady: rozdíly v průběhu 24hod. odběru

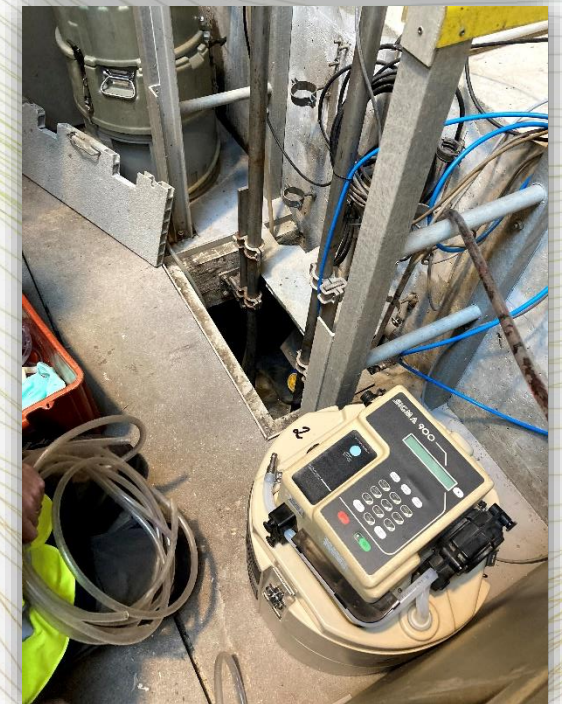


Ověřování postupu – poznatky

- rozdíly mezi prostým a slévaným vzorkem = zejména u větších ČOV (slévaný)
- homogenita vzorku – 1 řád (nutno zahrnout do nejistoty)
- nejkonzentrovanejší odpadní voda (mezi 5. a 23. hodinou) – lze využít pro sekvenace
- mražení – 70 °C X chlazení vzorku (ztráta výtěžku při mražení cca 5-10x, preferovat chlazení)

Ideální postup:

- 24hodinový slévaný vzorek, chlazený automatický vzorkovač
- homogenizace vzorku po odběru
- 500 ml vzorku, uchování v chladu, zpracování do 48 hodin



Detekce viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách

- zakoncentrování:
 - PEG a NaCl,
- izolace RNA:
 - komerčně dostupná souprava QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Německo),
- kvantitativní detekce RNA viru SARS-CoV-2:
 - RT-qPCR cílená na 3 nezávislé detekční cíle v genomu viru (gen N a nestrukturální protein nsp12),
 - limit detekce celého postupu je 2,5 virové částice (GE) v 1 ml odpadní vody,
 - průměrná účinnost postupu je 36 %.

Metodika schválena MZ ČR (01/22)

| | | |
|--|---|------------------------|
| Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2 | Projekt V10400017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVID-19) - A VS BV III | Verze 230622; Valšková |
|--|---|------------------------|

Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2

Autoři
Mgr. Petra Valšková, Ph.D., Mgr. Jakub Hrdý, Mgr. Magdaléna Krásova, Mgr. Kateřina Sovová, Ph.D., Ing. Lucia Gharwalová, RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.

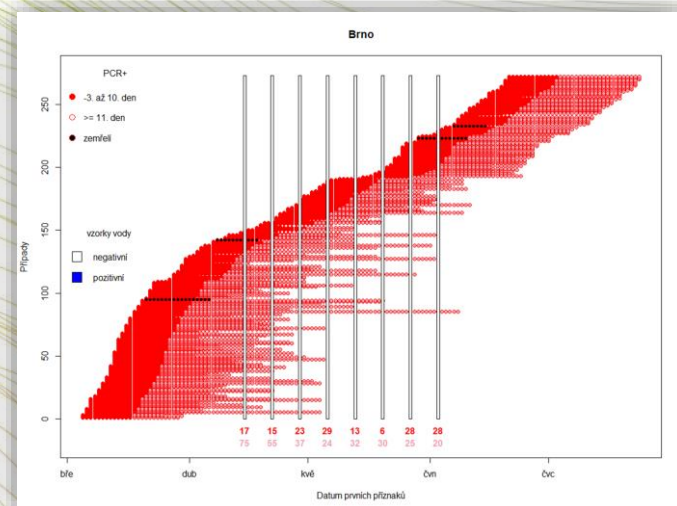
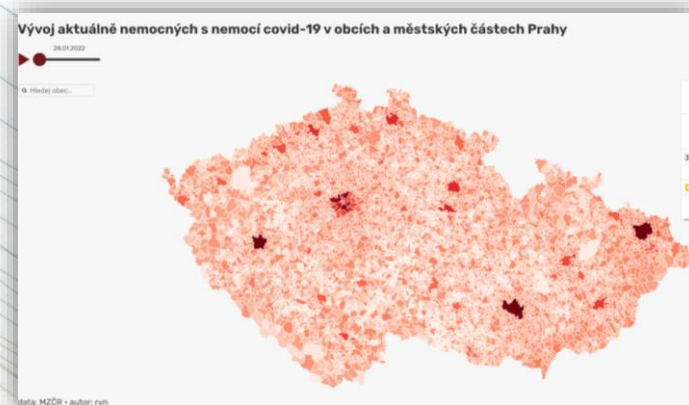
Uvedený metodický postup je výstupem projektu Ministerstva vnitra V10400017 (Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace). Zveřejňování tohoto postupu či jeho části podléhá omezením vyplývajícím z požadavků MV ČR a MZ ČR.

6/2021
1



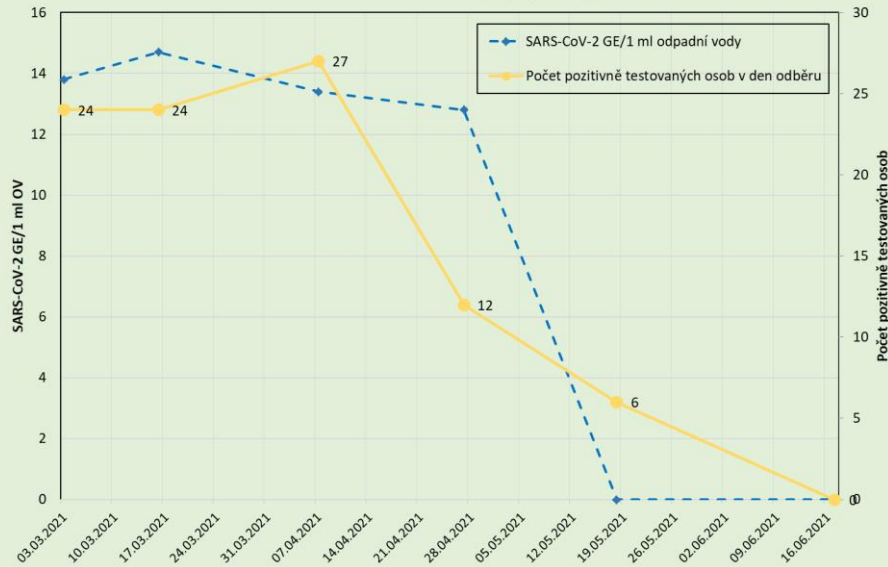
Hodnocení dat

- korelace s počty osob s pozitivním testem na covid-19 v monitorovaných oblastech, tj. městech a obcích napojených na příslušné ČOV.
- epidemiologická data z celostátního Informačního systému infekčních nemocí (ISIN) - Oddělení biostatistiky SZÚ,
- do hodnocení jsou zahrnuty osoby 10 dnů před datem prvních příznaků do 3. dne po provedeném testu, tj. 14denní interval.
- předběžná hodnocení - veřejná data z covidových map, které čerpají data z otevřených datových sad MZ ČR (nepřesná, neobsahují počty obyvatel v připojených obcích).



Výsledky

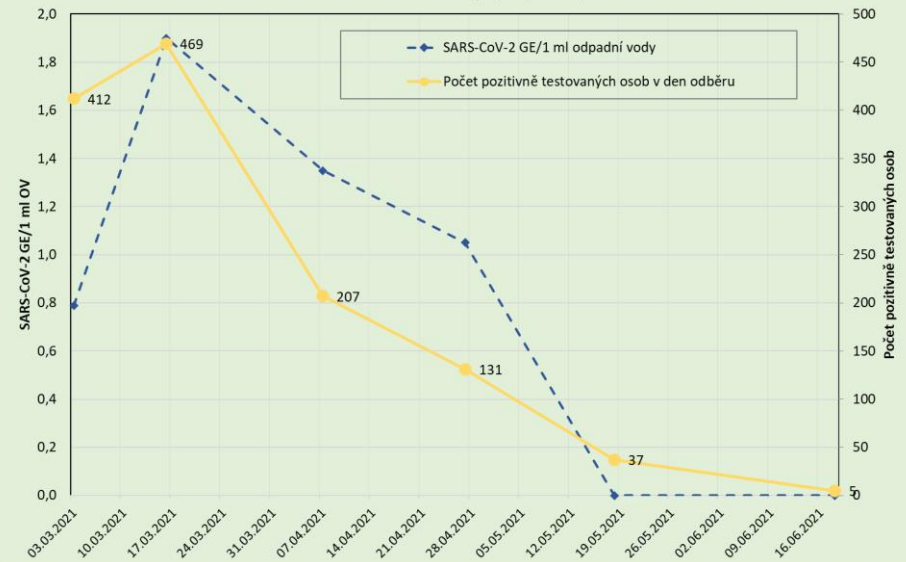
ČOV Buchlovice - 2 340 napojených obyvatel



březen 2021 – červen 2021

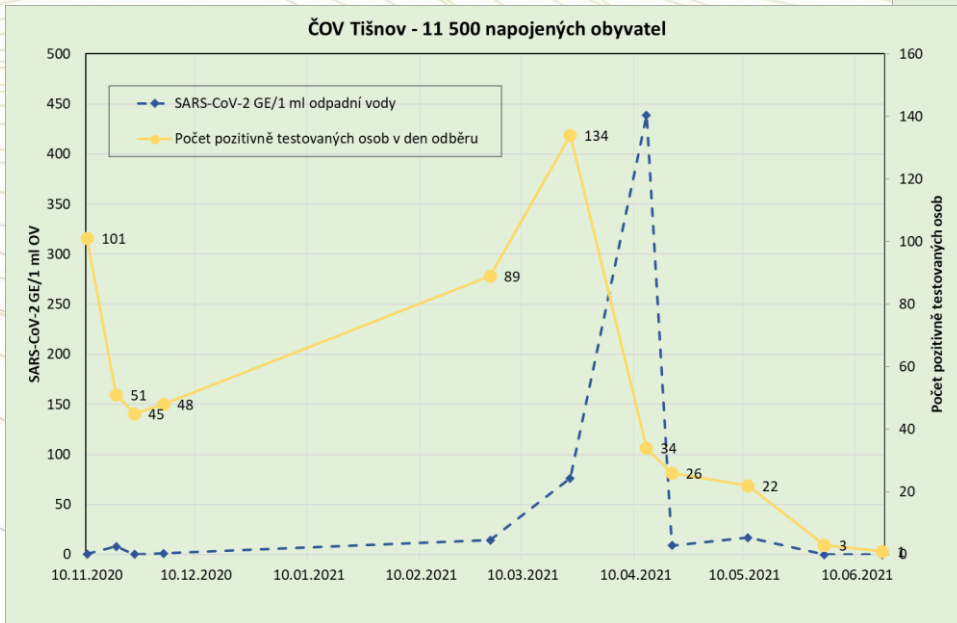
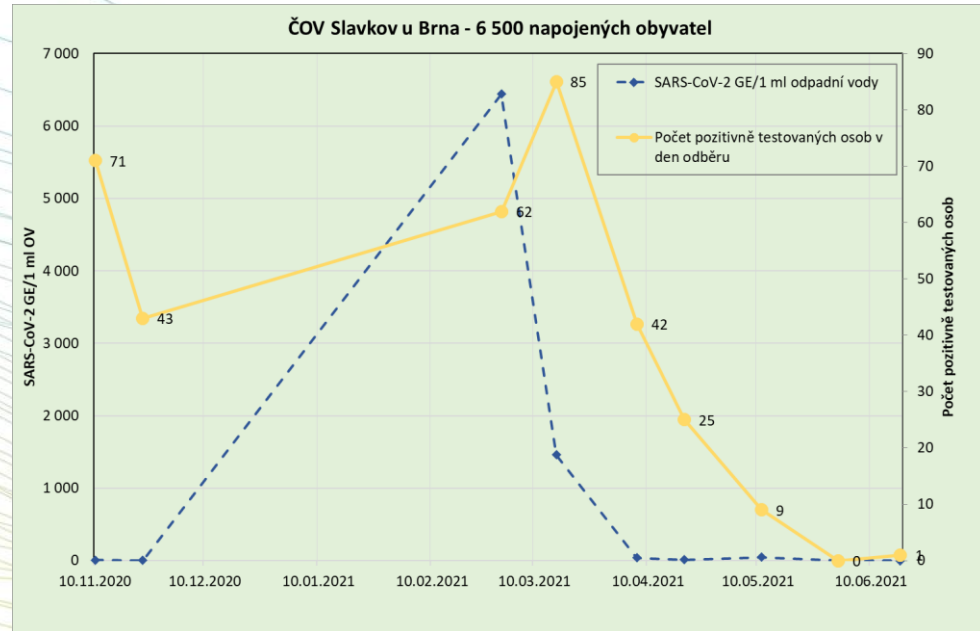
- pokles po jarní vlně 2021
- relativně dobrá shoda
- nízké počty osob
- nízká četnost vzorkování

ČOV Přerov - 41 000 napojených obyvatel



Výsledky

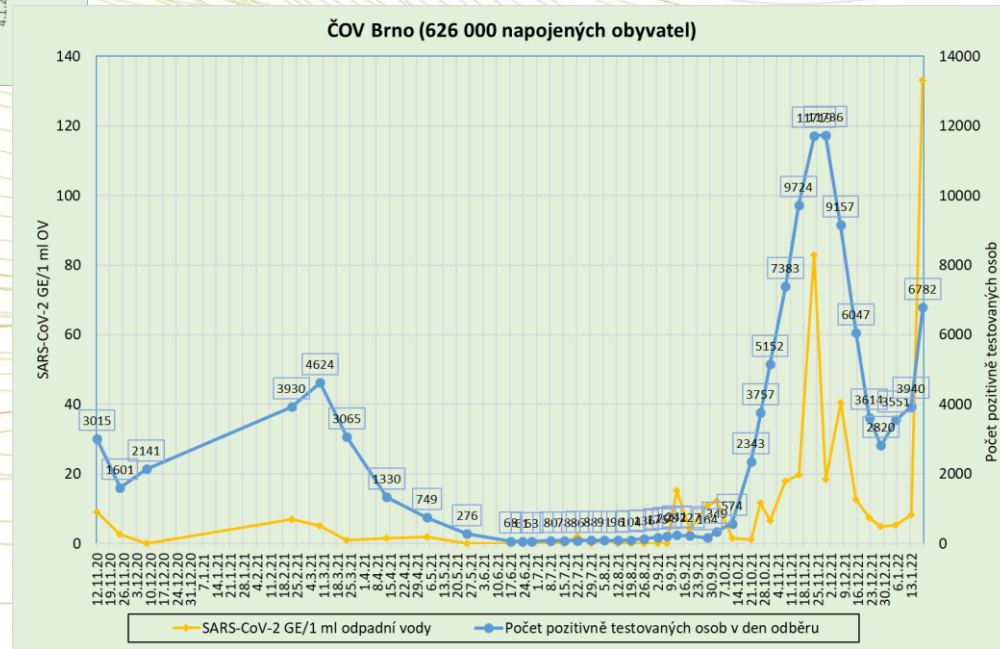
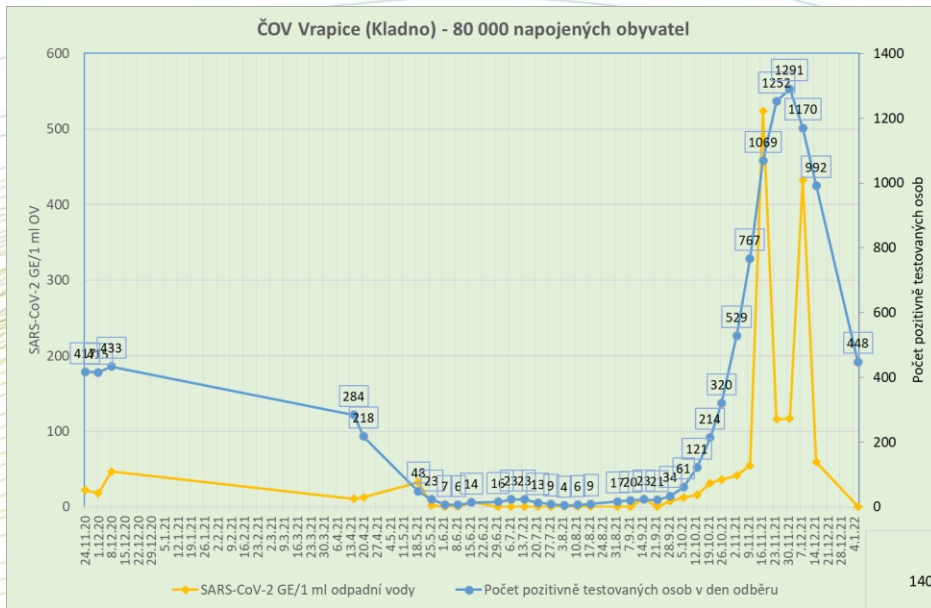
listopad 2020 – červen 2021



- pokles podzimní vlny 2020
- zachycení jarní vlny 2021
- relativně dobrá korelace
- nízké počty osob
- nízká četnost vzorkování

Výsledky

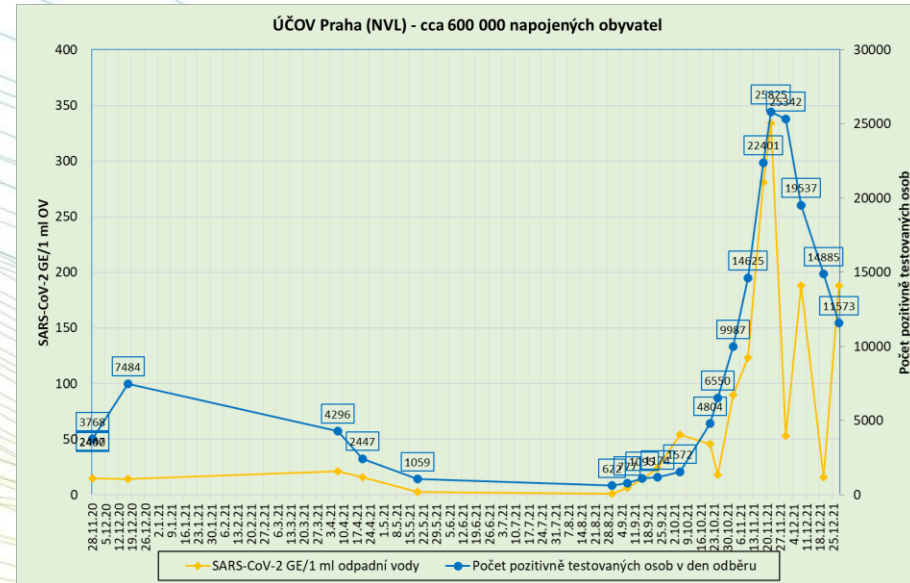
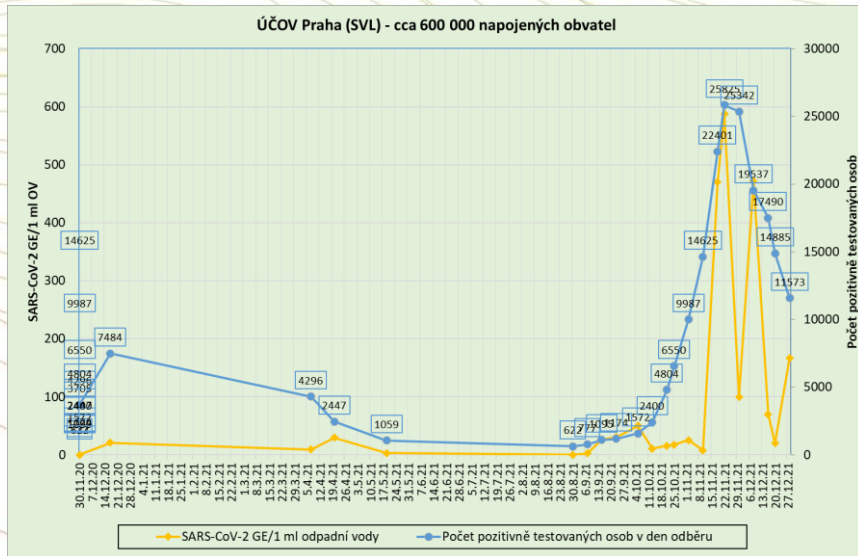
listopad 2020 – leden 2022



- pokles podzimní vlny 2020
- zachycení jarní vlny 2021
- zachycení podzimní vlny 2021
- nástup jarní vlny 2022
- relativně dobrá korelace

Výsledky

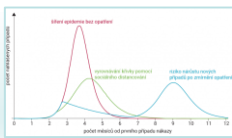
listopad 2020 – prosinec 2021



- pokles podzimní vlny 2020
- zachycení podzimní vlny 2021
- zachycení nástupu na konci roku 2021?
- dobrá korelace, výkyvy

Shrnutí

- množství RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách koreluje s počty pozitivně testovaných osob
- v některých případech předstih zvýšení/snížení RNA před počty osob – možnost predikce vývoje
- vhodná vyšší četnost monitoringu – 1-2x týdně, eliminace výkyvů
- vysoká citlivost metody - pozitivní nálezy virové RNA již pro jednotky až desítky osob, zachycených klinickým PCR testováním:
 - menší ČOV = Buchlovice 12; Slavkov 9; Tišnov 3
 - větší ČOV = desítky až stovky pozitivně testovaných osob (Brno 86; Kladno 14; Přerov 131).
 - ÚČOV Praha - monitorována jen v obdobích s vyšší prevalencí = pozitivní nálezy RNA pro >600 osob.
- funguje na ČOV všech velikostí a i při nízké prevalenci nakažených ve spádové oblasti.



Omezení přístupu



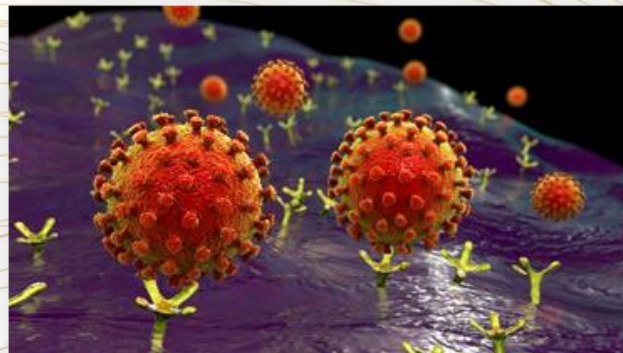
Mnoho proměnných, které určují kvantitativní schopnost WBE určit vztah mezi hladinami virové RNA v odpadních vodách a výskytem infekce v populaci

- epidemiologické proměnné, určující míru vylučování RNA do odpadních vod:
 - úroveň virémie, věk pacienta, stadium a závažnost onemocnění, symptomatický/asymptomatický průběh,
 - rychlost a doba vylučování,
 - rozdíly u variant viru
- WBE neposkytuje data týkající se jedince
- vodohospodářské proměnné:
 - aktuální množství odpadní vody = naředění virové RNA ve vzorku,
 - podíl průmyslových, dešťových a komunálních odpadních vod,
 - reprezentativnost a homogenita odebraného vzorku,
 - denní/týdenní režim odběru vzorků = rozdíly v rámci pracovních dnů/víkendu,
 - délka a větvení kanalizační sítě = možná degradace RNA před přítokem na ČOV
- schopnost veřejného zdravotnictví reagovat na zjištěná data

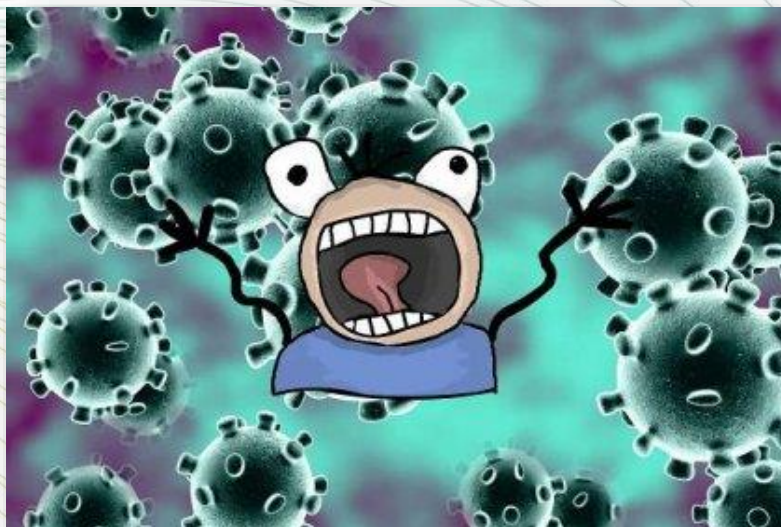
Závěr

Diagnostika odpadních vod může být při jejím cíleném a systematickém provádění vhodným doplňujícím prvkem pro formulaci epidemiologických prognóz a návrhů opatření.

Aktuálně se provádí v mnoha zemích světa, v některých již systematicky na úrovni národních programů.



Děkuji za pozornost



Práce vznikla za podpory projektu VI04000017 „Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace“ programu 4. VS BV III a institucionálních prostředků MŽP.

Autoři děkují provozovatelům ČOV za vstřícnou spolupráci při poskytování vzorků odpadní vody.