

MONITORING KORONAVIRU V ODPADNÍCH VODÁCH NA ČOV V ČR

**Hana Mlejnková¹, Kateřina Sovová², Petra Vašíčková³,
Lucia Gharwalová¹, Věra Očenášková¹, Eva Juranová¹**

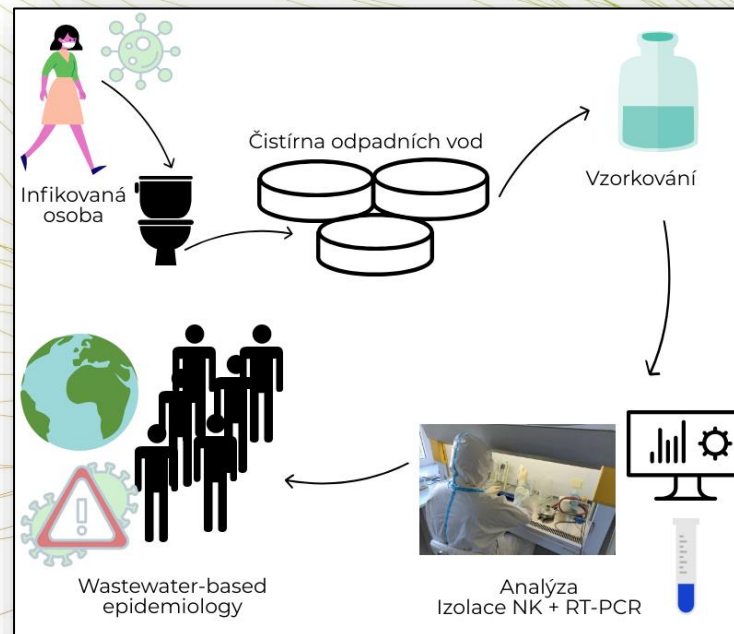
¹) Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i., Podbabská 2582/30, Praha 6,
e-mail: hana.mlejnkova@vuv.cz, lucie.jasikova@vuv.cz, vera.ocenaskova@vuv.cz,
eva.juranova@vuv.cz

²) Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i., pobočka Brno, Mojžírovo
nám. 16, Brno, e-mail: katerina.sovova@vuv.cz

³) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno, e-mail:
vasickova@vri.cz

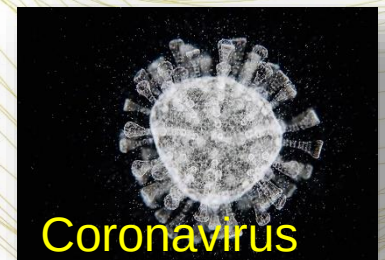
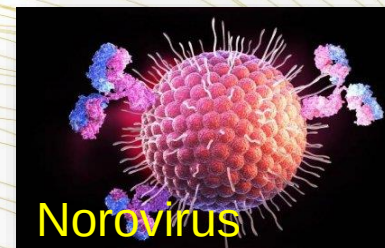
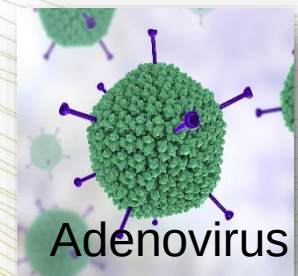
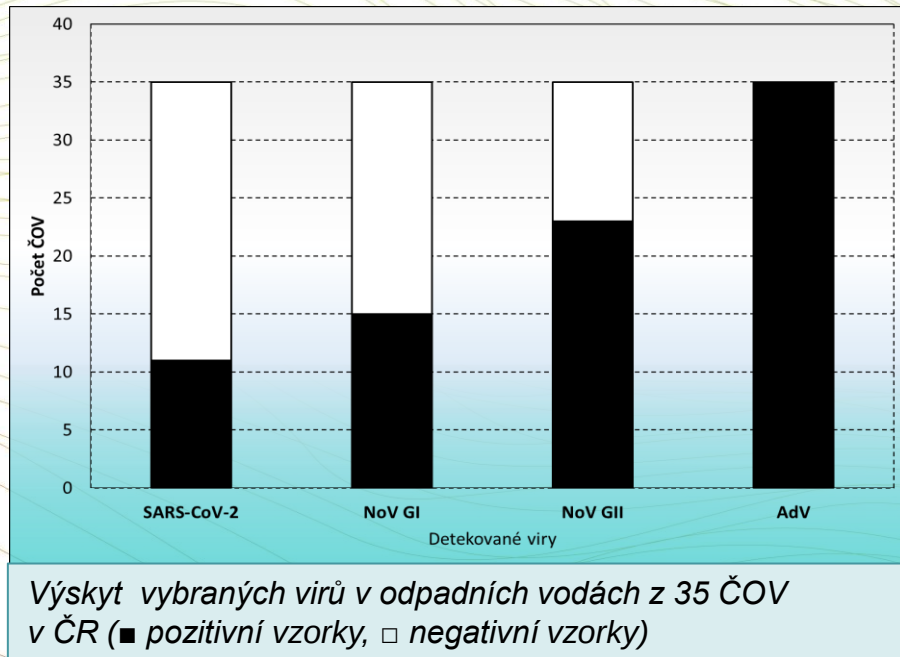
Wastewater Based Epidemiology (WBE) = epidemiologický přístup k odpadním vodám

- WBE vychází z předpokladu, že jakoukoli látku, která je vylučována člověkem do odpadních vod, lze detekovat a použít k zpětnému výpočtu původní koncentrace v konkrétní populaci za předpokladu, že je látka stabilní v odpadních vodách. To bez výhrad platí pro mikroby a jejich degradační produkty včetně jejich DNA a RNA.
- poprvé použit v roce 2008 ke sledování spotřeby nelegálních drog,
- další využití: alkohol, tabák, výrobky osobní péče, dopingové látky, léčiva, odolnost vůči antibiotikům, pesticidy, hormony, aj.
- sledování incidence specifických chorob (cukrovka, alergie, oxidační stres, rakovina aj.)
- **doplňkový nástroj pro sledování výskytu infekčních agens a prevenci epidemií.**



Viry v odpadních vodách

- vyskytují se běžně,
- často jsou perzistentní,
- v ČR od roku 2004 monitoring výskytu poliovirů ve velkých městech a utečeneckých táborech (SZÚ),
- původci klinicky významných onemocnění: *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* (noroviry), *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*, *Matonaviridae*, *Papillomaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* (enteroviry), *Poxviridae*, *Retroviridae*, a *Togaviridae*.

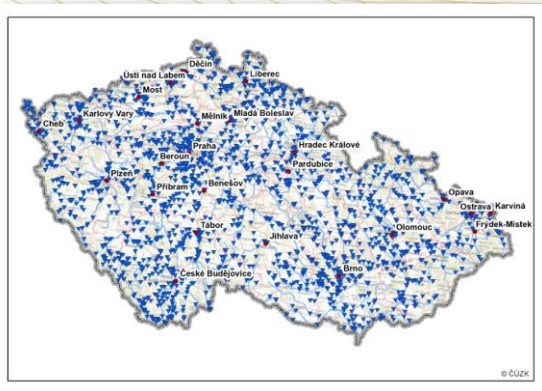


Sledování výskytu koronaviru SARS-CoV-2 v odpadních vodách

- genové fragmenty SARS-CoV-2 jsou běžně prokazovány ve stolici a moči infikovaných osob,
- vylučování bylo zjištěno až 33 dní po negativním respiračním testu pacienta = ovlivněno mj. rychlostí vylučování, dobou trvání infekce, úrovní virémie, věkem pacienta, závažností onemocnění.
- střevo může být dalším cílovým orgánem viru SARS-CoV-2 (klinické studie),
- byla prokázána možnost pomnožení virů ve stolici (buněčné kultury),
- gastrointestinální příznaky - bolesti břicha, zvracení, často i průjem, často před vypuknutím nemoci a přetrvaly i dlouho po odeznění respiračních potíží,
- nebyl prokázán přenos fekálně-orální cestou, vylučované zbytky RNA viru jsou převážně neaktivní a nejsou schopné vyvolat infekci,
- u asymptomatických jedinců je míra vylučování RNA mnohem nižší než u symptomatických pacientů,
- **schopnost WBE odhalit asymptomatickou a oligosymptomatickou populaci znamená, že hodnocení rizika přítomnosti infekce v populaci je téměř vždy podhodnoceno.**

Použití WBE ke sledování SARS-CoV-2 v ČR a ve světě

- monitoring markerů SARS-CoV-2 v odpadních vodách je prováděn v mnoha zemích světa,
- v některých zemích - systematický monitoring – Nizozemí, Rakousko, Řecko...
- Doporučení Evropské komise na zavedení systematického monitoringu SARS-CoV-2 v odpadních vodách ze dne 17.3.2021 (ČOV>150 000 EO)
- na ČOV v ČR je napojeno cca 80 % obyvatel,
- rozsáhlá síť je velmi dobrým předpokladem k systematickému epidemiologickému monitoringu,
- Nicméně - ke správné interpretaci výsledků je třeba zohlednit mnoho faktorů, jako stabilitu viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách, naředění a charakter odpadních vod, délku a typ kanalizační sítě a účinnou detekci viru v komplikované matici...ne každá ČOV je vhodná pro WBE monitoring.



Kategorie ČOV	Počet (celkem: 3 166)	% napojených obyvatel
>100 000 EO	9	24
>10 000 EO	122	29
>nad 2 000	417	24
<2 000 EO	2 618	15

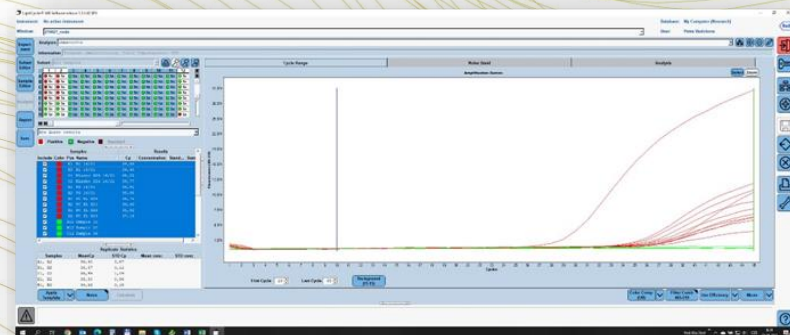
Metodika - odběry vzorků odpadních vod

- surová odpadní voda na nátoku do ČOV za česlemi,
- celá ČR, všechny velikostní kategorie ČOV
- vzorky prosté (P) - bodový odběr, 2hodinové směsné (A), 24hodinové směsné (B), 24hodinové směsné úměrné průtoku (C),
- zpracování do 24 hodin nebo zamražení na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - I. etapa: 4/20 až 6/20 (+SOVAK: 137 vzorků; 40 ČOV)
 - II. etapa: 11/20 až 12/20 (247 vzorků; 19 ČOV)
 - III. etapa: 02/21 až 05/21 (134 vzorků; 22 ČOV)
 - IV. etapa: od 05/21 (2 ČOV; týdenní četnost, do konce roku)
- optimální odběry: automatické odběráky, chlazení, 18hodinové směsné po 15 min (8:00 – 23:00)



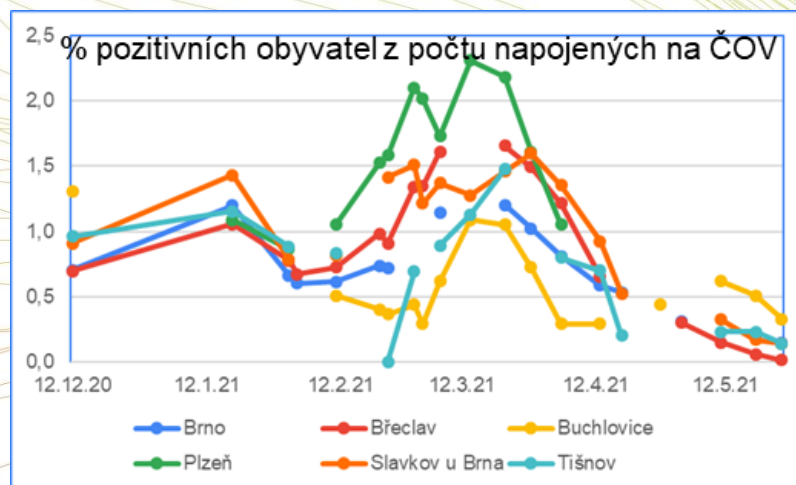
Metodika - detekce SARS-CoV-2 RNA v odpadních vodách pomocí RT-qPCR

- v prvních etapách - komerční kity
 - NucliSENS® miniMAG® systém a EliGene COVID19 Basic A RT,
- v současné době - vlastní optimalizovaná metoda („Metodický postup analýzy odpadní vody na přítomnost specifických oblastí genomu SARS-CoV-2“,
 - využívá silikagel-kolonkový kit pro izolaci RNA a optimalizovanou dvoukrokovou RT-qPCR s citlivě nastavenou interní amplifikační kontrolou, která je méně náchylná k inhibicím,
 - externí kontrola celého procesu analýzy umožňuje přesnější stanovení množství SARS-CoV-2 RNA ve vzorcích,
 - výsledek je udáván v počtech genomových jednotek (GE) v 1 ml.
 - účinnost postupu je 22 – 45 %, Cq = 31 až 40.



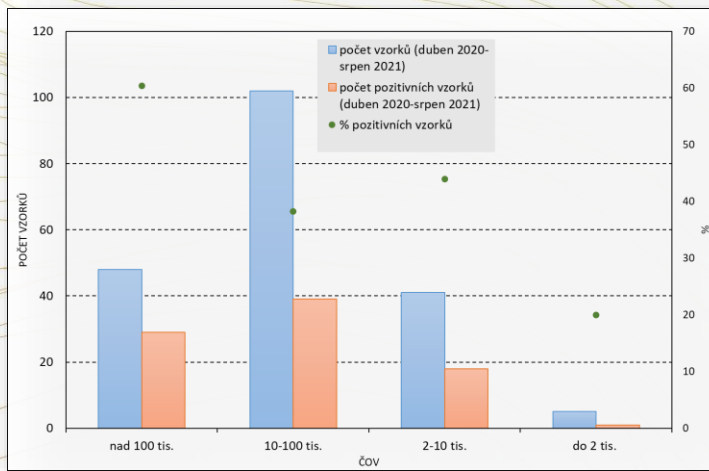
Hodnocení dat

- k průběžnému hodnocení dat jsou využívány volně dostupné údaje (z medií) o počtech infikovaných osob v monitorovaných oblastech,
- pro detailní hodnocení jsou, ve spolupráci s Oddělením biostatistiky SZÚ, použita data z celostátního systému ISIN (Informační systém infekčních nemocí), která jsou dodávána z Krajských hygienických stanic,
- započítáno 10 dní před až 3 dny po odběru vzorku, dle data 1. příznaku.
- údaje nedostatečně spolehlivé (údaje nenahlášeny, výskyt osoby v jiném místě, nespolehlivé výsledky klinického testování, různé modely klinického testování dle aktuálních opatření...)



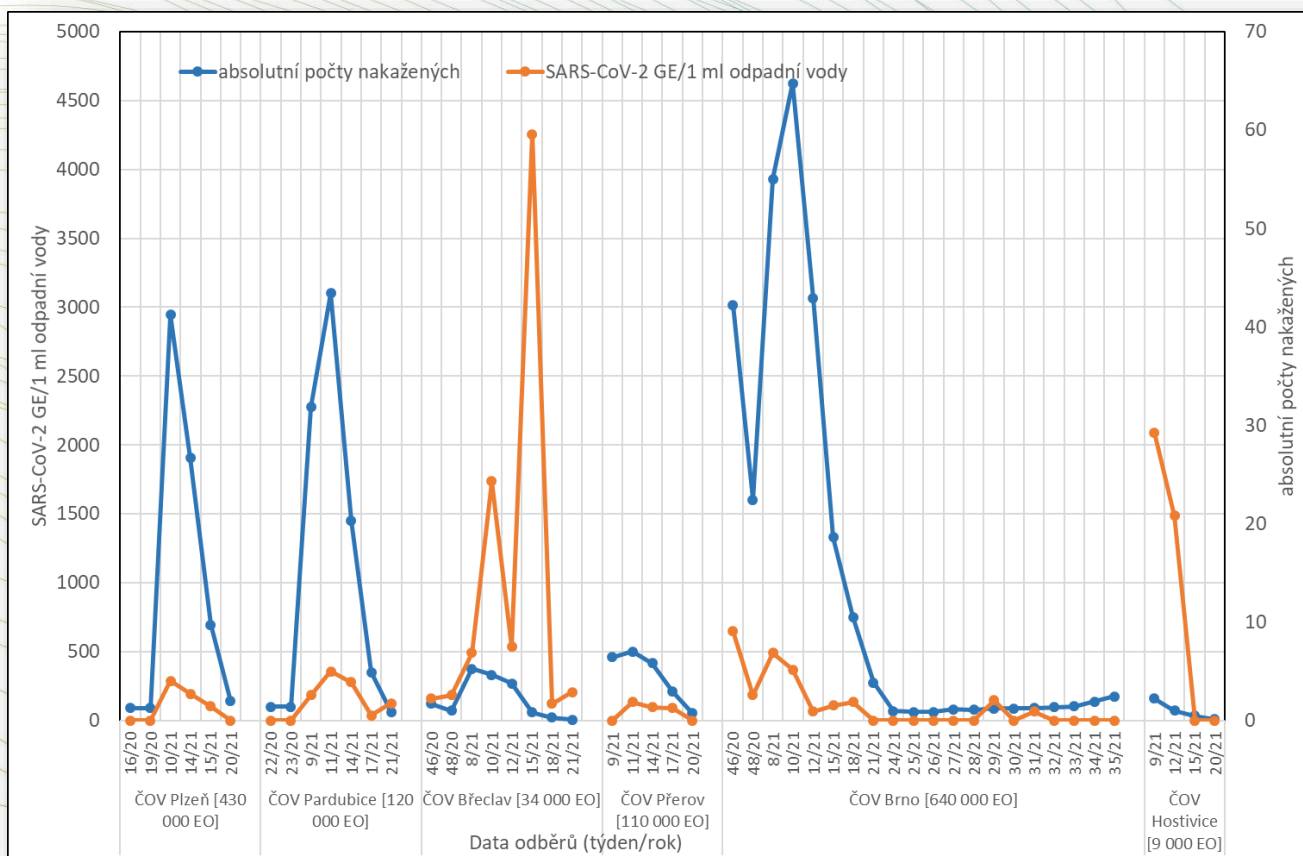
Výsledky

- monitoring je prováděn na 66 ČOV všech velikostí a zahrnuje odpadní vody od cca 3,7 mil. obyvatel, což představuje 43 % všech obyvatel ČR napojených na ČOV,
- od dubna 2020 do srpna 2021 bylo celkem odebráno více než 500 vzorků nečištěných odpadních vod,
- ze zpracovaných 235 vzorků byla u více než 40 % potvrzena přítomnost SARS-CoV-2 RNA,
- vysoce citlivá metoda zachytila v odpadních vodách i jednotky pozitivně testovaných osob,
- porovnání velikostních kategorií ČOV ukázaly pozitivní nálezy ve všech velikostních kategoriích = **pro epidemiologické analýzy lze použít všechny kategorie ČOV.**



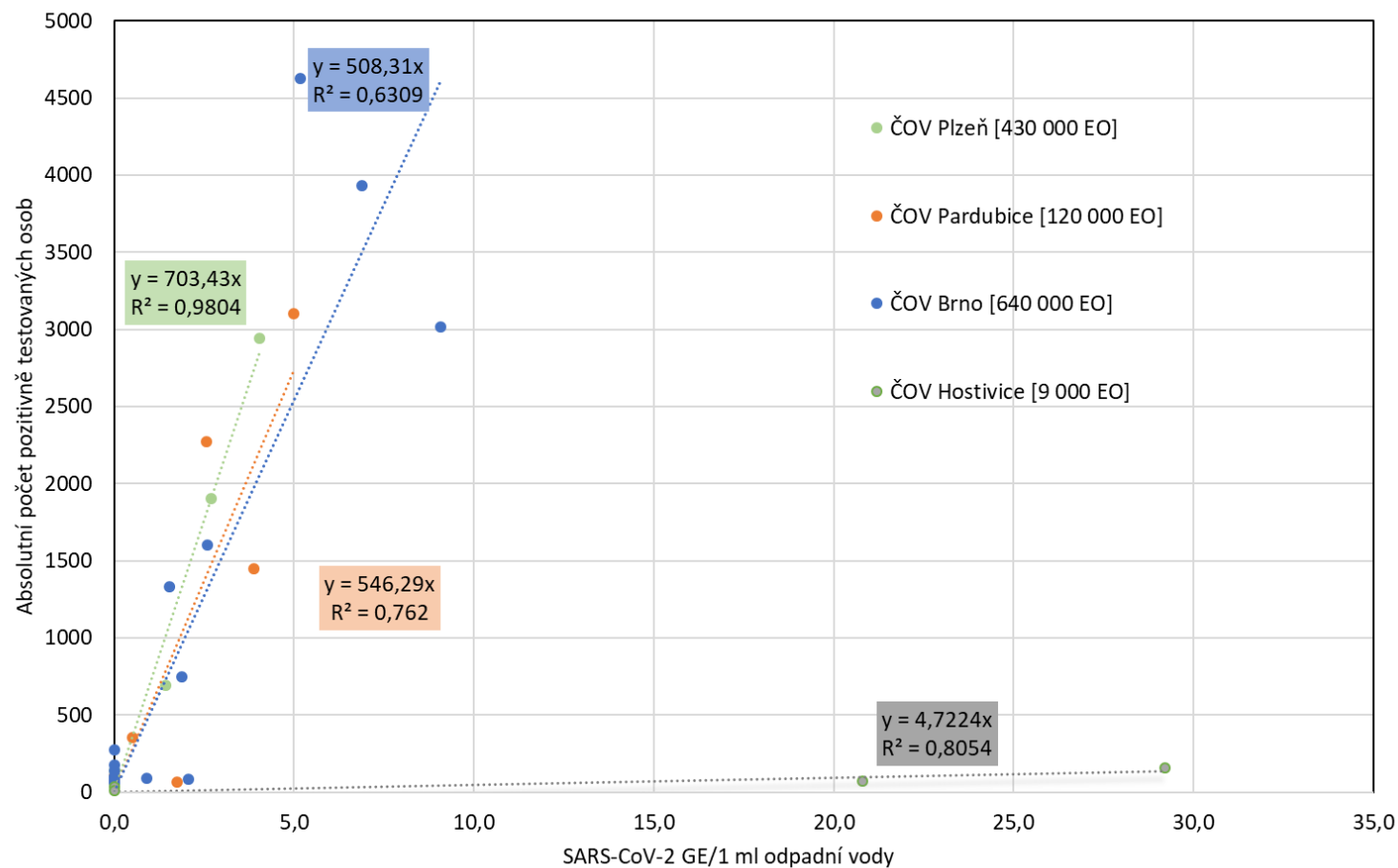
Výsledky

- dobrá korelace mezi počty pozitivně testovaných osob v oblastech napojených na různě velké ČOV a RNA SARS-CoV-2: ČOV Plzeň, ČOV Pardubice, ČOV Břeclav, ČOV Přerov, ČOV Brno, ČOV Hostivice,



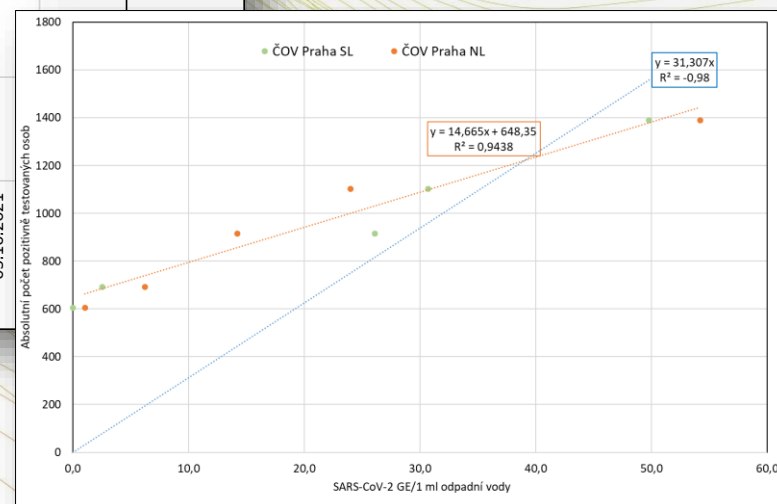
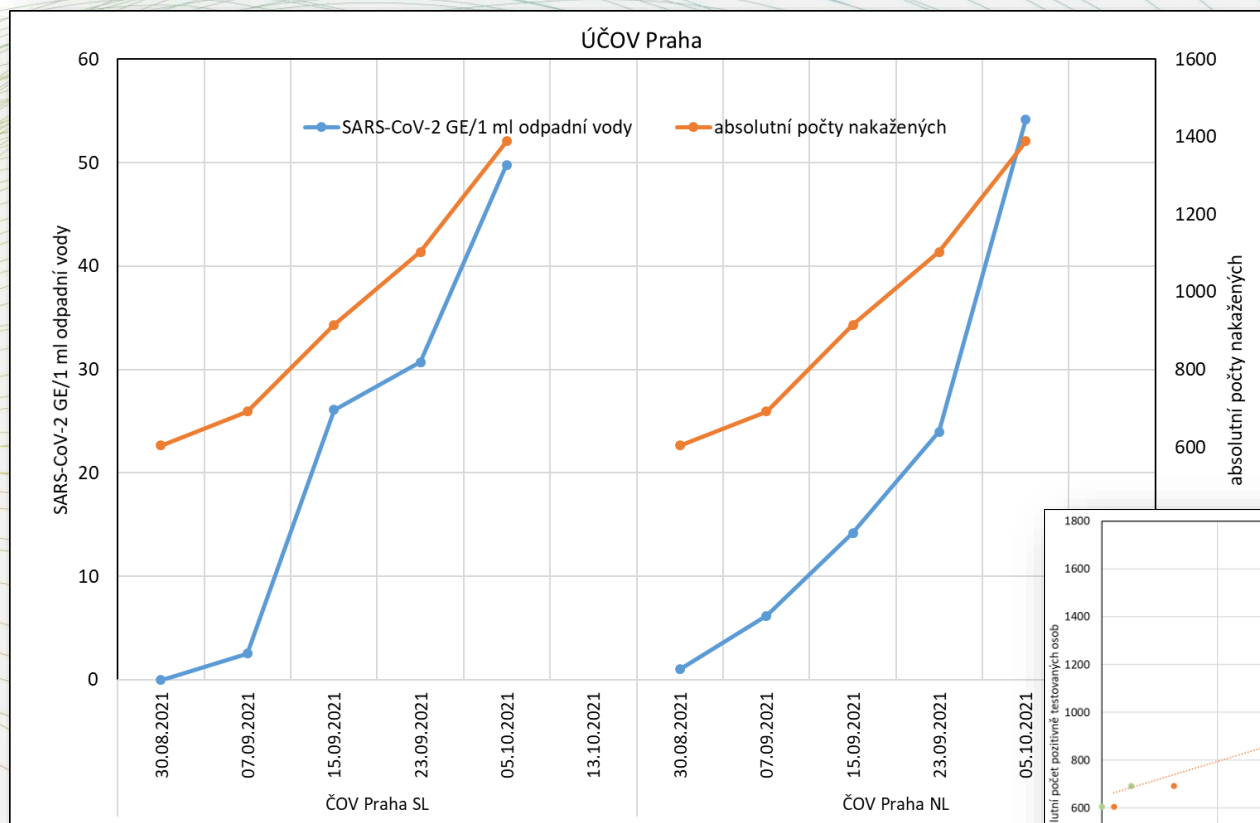
Výsledky

- na ČOV Plzeň, Pardubice, Brno a Hostivice byla shoda datových sad potvrzena vysokými regresními koeficienty,

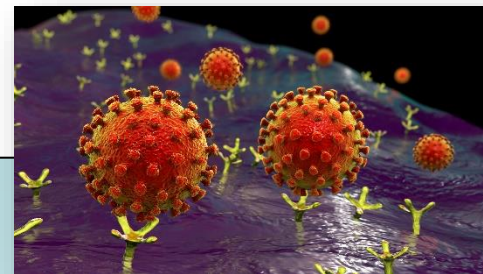


Výsledky

- týdenní monitoring na ÚČOV Praha ukazuje nástup podzimní vlny šíření viru SARS-CoV-2 v souladu s počty pozitivně testovaných (SL=stávající linka, NL=nová linka)



Závěry



- ✓ Do současné doby získané výsledky monitoringu SARS-CoV-2 v odpadních vodách ukázaly korelaci mezi množstvím virové RNA a počty pozitivně testovaných jedinců.
- ✓ Byla vyvinuta spolehlivá robustní metoda pro detekci virů v odpadních vodách, využitelná i pro jiné viry.
- ✓ Charakterizace rozdílů v odpadní vodě v průběhu 24 hodin pomocí vybraných fyzikálně-chemických a mikrobiologických ukazatelů ukázala na důležitost správného vzorkování.
- ✓ Aktuálně probíhající etapa zaměřená na zachycení nástupu nové vlny epidemie ukazuje velmi slibné výsledky.
- ✓ Využití přístupu je vhodné pro včasné zachycení varovného signálu nastupující epidemiologické situace v ČR a lokalizace rizikových míst = návrh epidemiologické monitorovací sítě v ČR.

Poděkování

Práce vznikla za podpory institucionálních prostředků MŽP prostřednictvím interního grantu 3600.52.33/2020 VÚV T. G. M., v. i. i. a projektu VI04000017 „Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace“ programu 4. VS BV III.

Autoři děkují za poskytnutí výsledků sdružení SOVAK ČR a provozovatelům ČOV za vstřícnou spolupráci při poskytování vzorků odpadní vody.

Děkuji Vám za pozornost 😊

