

KORONAVIRUS SARS-COV-2 V ODPADNÍCH VODÁCH V ČR

VÚV
TGM

Hana Mlejnková, Kateřina Sovová, Lucie Jašíková,
Petra Vašíčková, Věra Očenášková,
Eva Juranová, Alena Fialová

Vodárenská biologie 2021, Praha

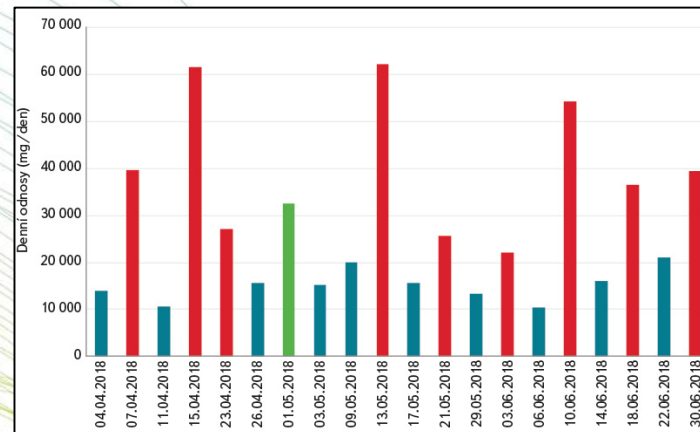


Cíl

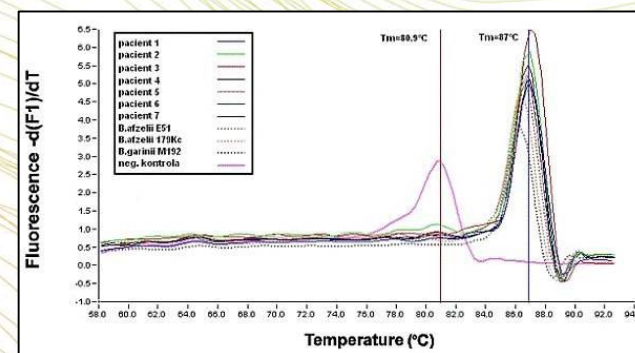
Využití epidemiologického přístupu k odpadním vodám k vytvoření **systemu včasného varování** pro predikci nástupu další vlny epidemie koronaviru prostřednictvím analýzy odpadních vod.

Epidemiologický přístup k odpadním vodám (WBE – wastewater based epidemiology)

- nový přístup - používá kvantitativního měření lidských biomarkerů v odpadních vodách,
- lze využít pro monitoring spotřeby nezákonných drog a dalších látek, např. farmak v populaci,
- v ČR - sledování výskytu polioviru ve vybraných oblastech,
- **aktuálně - predikce výskytu nemoci COVID 19 v populaci pomocí SARS-CoV-2 RNA**



Denní odnosy extáze (stoka ACK); modrou barvou jsou vyznačeny pracovní dny, červenou víkendové dny, zelenou státní svátek, kterému předcházelo „pálení čarodějnic“

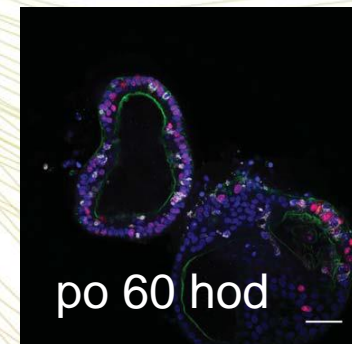
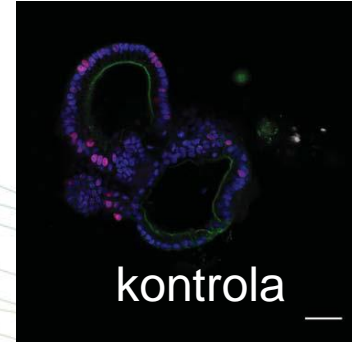


Záznam měření metodou RT-qPCR

SARS-CoV-2 a odpadní vody

- koronaviry - přednostně respirační sekrety,
- genové fragmenty SARS-CoV-2 - prokázány ve stolici infikovaných osob (u více než 50 % nakažených),
- střevo může být dalším cílovým orgánem viru,
- pomocí buněčných kultur prokázána možnost pomnožení virů ve stolici,
- popsány i gastrointestinální příznaky jako bolesti břicha, zvracení, často i průjem (u cca 2 až 50 % nakažených),
- GI příznaky - často před vypuknutím nemoci a i dlouho (cca 10–14 dní) po odeznění respiračních potíží a průkazu viru v dýchacích cestách,
- **v ČR - rozsáhlá síť ČOV,**
- **aktuálně 3 166 ČOV = podchytí situaci pro cca 80 % obyvatel ČR.**

VÚV
TGM



Metodika monitoringu

- vzorkování: duben až červen 2020 s týdenní až 14denní četností (10 týdnů),
- odběry: surová odpadní voda na nátoku na ČOV,
- vzorky: prosté - bodový odběr, 2hodinové směsné, 24hodinové směsné, 24hodinové směsné úměrné průtoku, vzorky do 24 hodin předány do laboratoře VÚVeL ke zpracování nebo uskladnění (-70 °C).
- monitoring: VÚV a SOVAK
- celkem zapojeno: 40 ČOV různých velikostí
- celkem napojených obyvatel: cca 2 670 000
- lokalizace: celá ČR



PCR analýza (VÚVeL Brno)

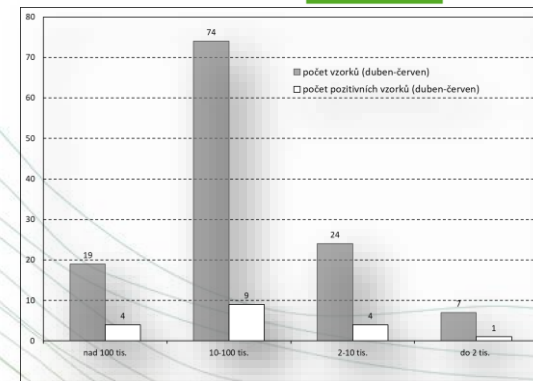
- Real Time Reverse Transcription PCR (RT-qPCR),
- extrakce RNA: přímá flokulace a třepání po dobu 10 hodin
- izolace RNA: NucliSENS® miniMAG® systém
- kontrola procesu: prasečí koronavirus TGEV, kmen M42 ze Sbírký zoopatogenních organismů VÚVeL,
- vlastní detekce: 3 nezávislé cíle genu N viru SARS-CoV-2 - kit EliGene COVID19 Basic A RT (Elizabeth Pharmacon, ČR),
- pozitivní vzorky: Cq<40.



Výsledky

- analyzováno: 137 vzorků nátoků na ČOV (celkem 189 vzorků)
- pozitivní vzorky: 20 = **15 %**
- pozitivní ČOV: 11 = **28 %**
- pozitivní nálezy - ve všech kategoriích ČOV v podobném procentuálním podílu (14-21 %),
- jarní vlna: velmi nízké % pozitivních osob z počtu obyvatel napojených na sledované ČOV (**0-1,2 %**; průměr 0,2 %) – výběr oblastí se zvýšeným výskytem nemoci,
- podzimní vlna: cca **2 %** pozitivních osob z počtu napojených na sledované ČOV, vzorky zamražené,
- zimní vlna (01/21): **0,1-2,6 %**; průměr 1,4 %
- údaje z medií – nespolehlivé?, mění se!

VÚV
TGM

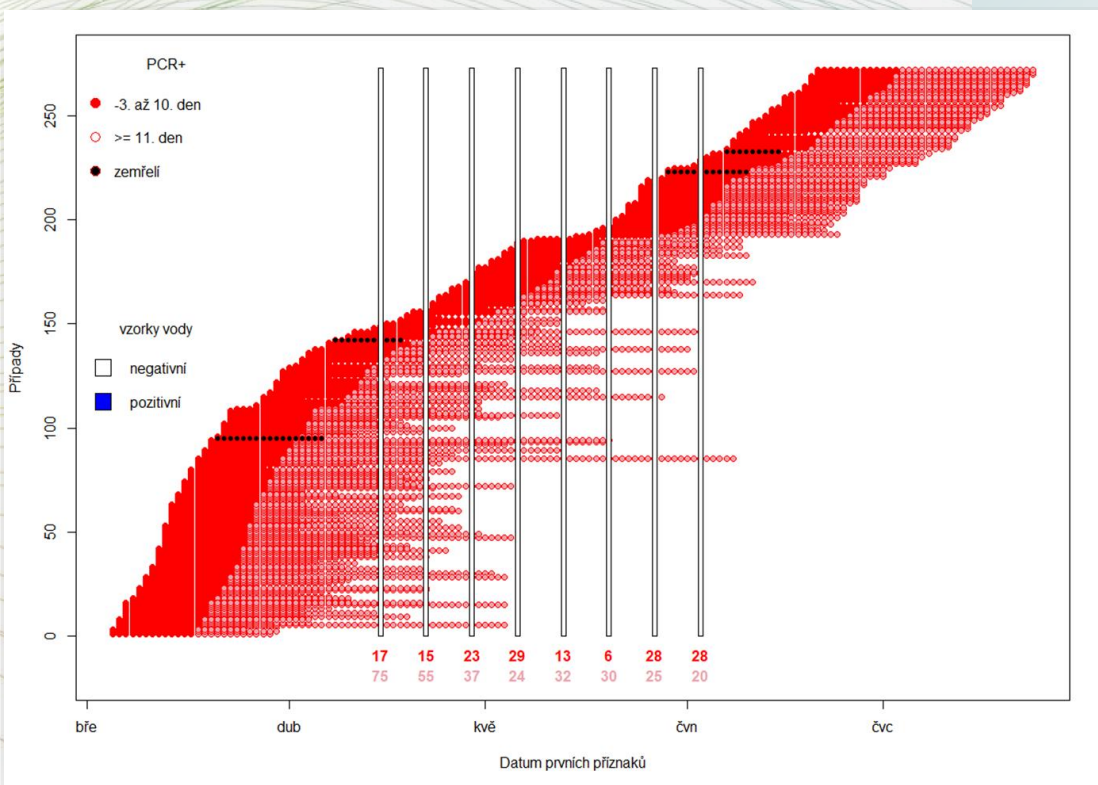


Korelace mezi pozitivní vzorky OV a hlášenými počty nakažených: 3 varianty výsledků

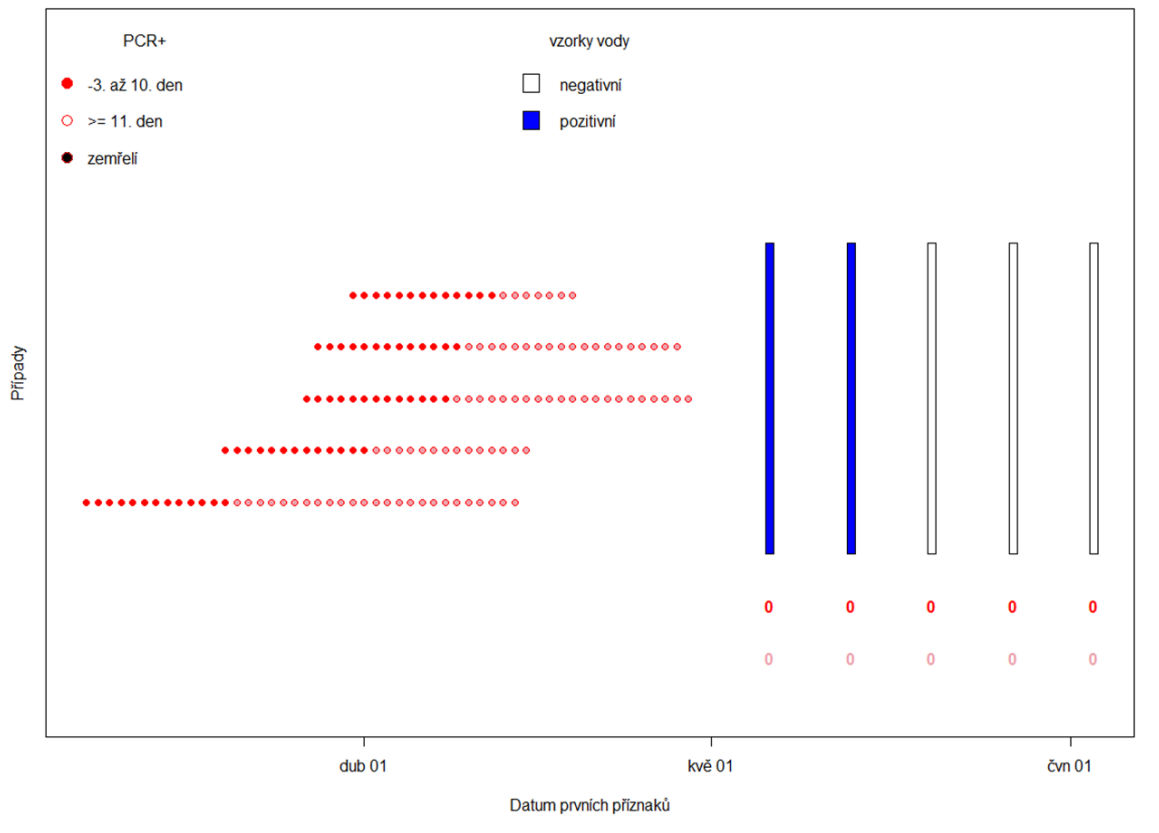
1) absence viru v OV v lokalitách, kde byl evidován výskyt pozitivně testovaných osob

Možné příčiny:

- velké naředění OV = hledaná částice genomu nebyla do vzorku zachycena v detekovatelném množství nebo stavu (např. enzymatická degradace RNA již před odběrem nebo při transportu vzorku),
- virové částice se nedostaly do trávicího nebo vylučovacího systému infikovaných osob,
- osoby se v době nemoci nevyskytovaly v místě, kde byly evidovány jako infikované (pobyt v zaměstnání, v rekreačních objektech apod.).



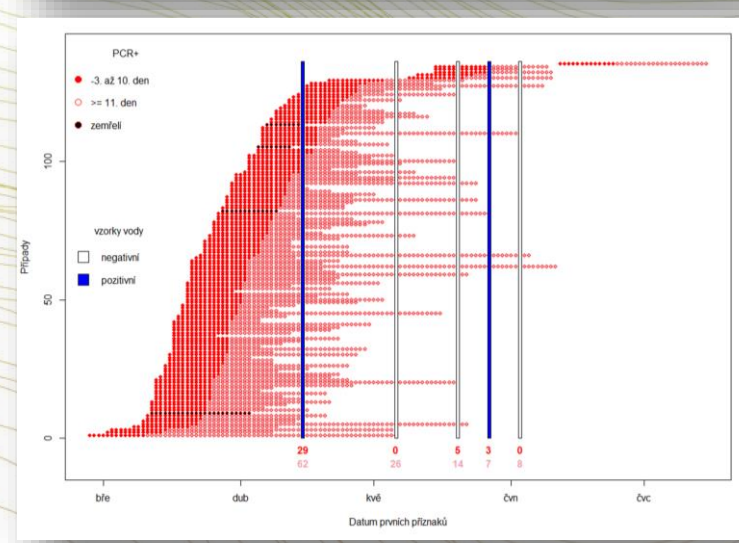
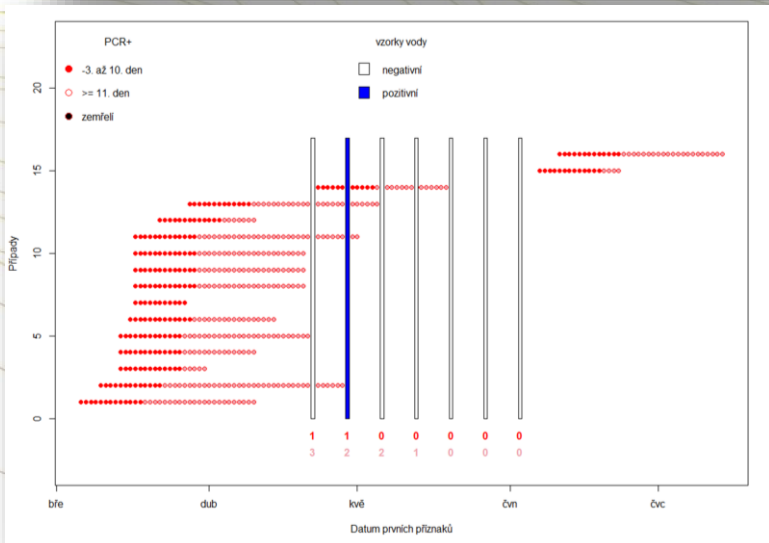
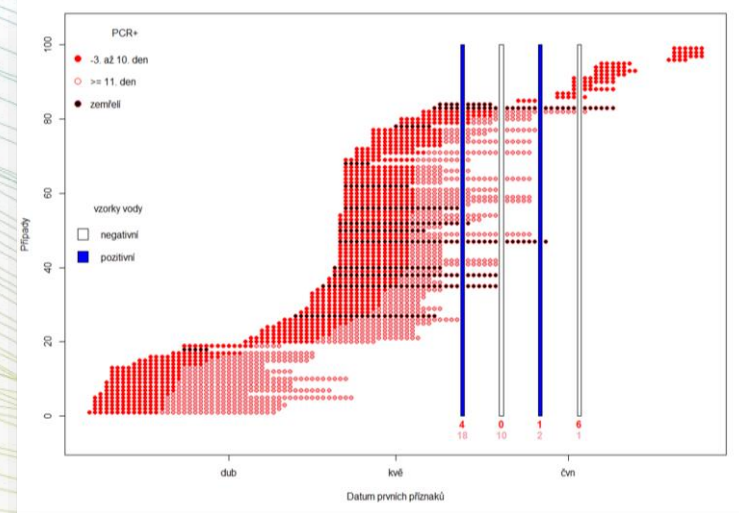
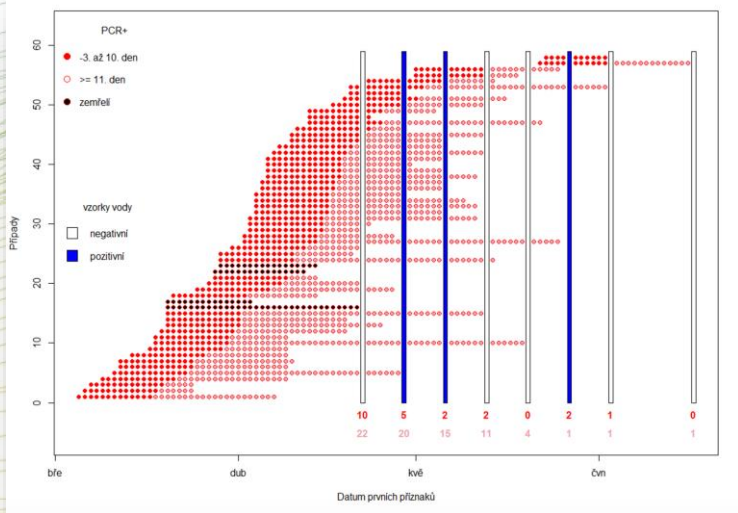
2) pozitivní nález virových fragmentů v odpadních vodách v lokalitách, kde nebyly hlášeny žádné infikované osoby



Možné příčiny:

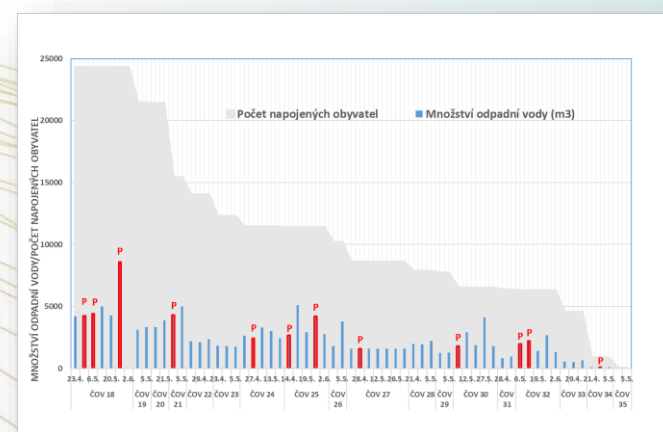
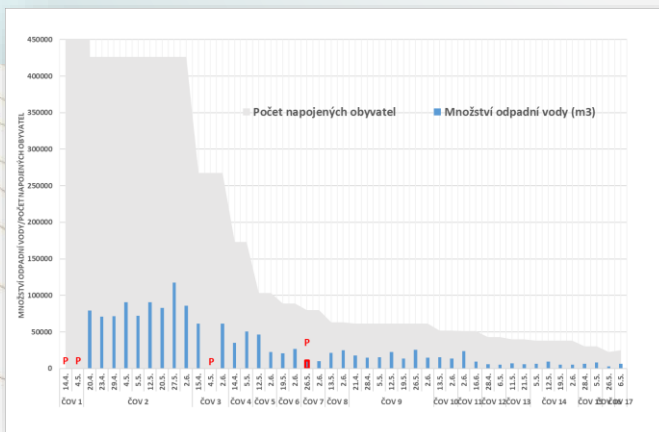
- přítomnost neevidovaných infikovaných osob, tj. buď bezpříznakových, nenahlášených nebo evidovaných v jiném místě než skutečně pobývaly.

3) pozitivní vzorky odpadních vod + evidovaná přítomnost pozitivně testovaných osob



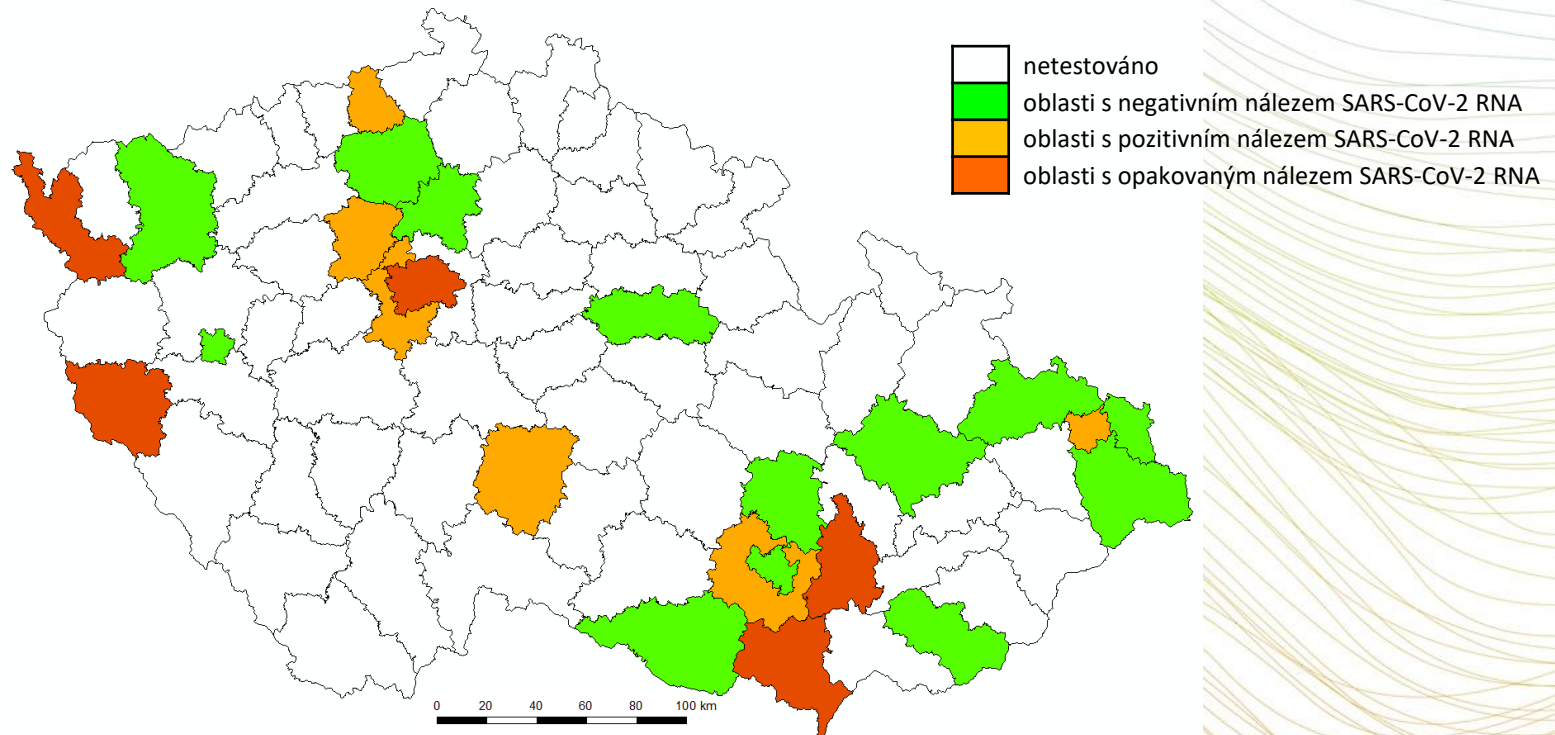
Interpretace výsledků

- důrazně akceptovat rozdíly mezi typy a charakterem čistíren odpadních vod neboť ne všechny jsou vhodné pro epidemiologické prognózy,
- ČOV se liší
 - množstvím odpadních vod, které jsou na ně přiváděny,
 - počtem napojených obyvatel,
 - délkou a větvením kanalizační sítě,
 - zpracováním směsi komunálních a průmyslových odpadních vod,
 - u velkých ČOV - síť dílčích stok.



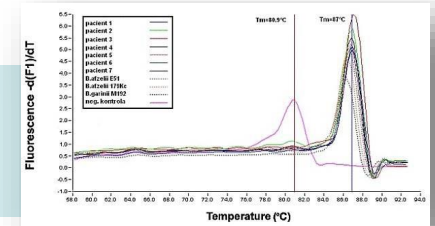
Výskyt v jednotlivých okresech ČR

Absolutní počty evidovaných osob s pozitivním PCR testem se ve sledovaných oblastech pohybovaly od 0 do 2 400, což představovalo 0 až 1,2 % obyvatel napojených na danou ČOV.





Perspektiva



- byly potvrzeny informace publikované v Nizozemí, o výskytu fragmentů viru SARS-CoV-2 v nečištěných odpadních vodách,
- mnoho studií – klinické i epidemiologické,
- viry SARS-CoV-2 mohou infikovat buňky střev a množit se v nich = významné zvýšení významu monitoringu odpadních vod a studia možné kontaminace vodního prostředí,
- nízké počty infikovaných osob v ČR v jarní vlně = zachycení dolní meze detekce metody (3-5 infikovaných osob z objemu odpadních vod od 6 000 do 80 000 napojených obyvatel) = vysoká citlivost metody,
- nebyly zachyceny vyšší počty = potřeba doladit metodu stanovení (hlavně extrakce RNA z odpadních vod) a další faktory (ředění, odběr, směsné odpadní vody...)



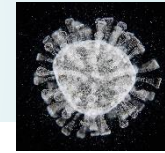
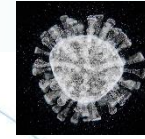
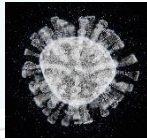
...zatím mnoho otazníků



- zda se v tělních exkretech vyskytují fragmenty viru u všech infikovaných osob?
- zda záleží na průběhu a symptomech?
- v jakém množství, po jak dlouhou dobu, v které fázi nemoci a zda i u bezpříznakových jedinců se virus vylučuje trávicím a vylučovacím traktem?
- jak zafunguje konkrétní imunitní odpověď infikované osoby (různé mechanismy, možný rozklad genomu viru na nedetekovatelné fragmenty)?

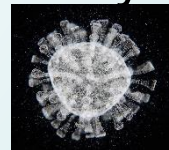
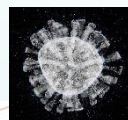
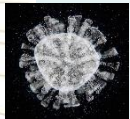
= dá se najít přímá úměra mezi počtem infikovaných osob a kontaminací odpadních vod virovými fragmenty?

Závěrem



VÚV
TGM

- Získané výsledky jsou velmi cenné a nezbytné pro další práci na tvorbě systému, jehož cílem je včasné zachycení varovného signálu nastupující epidemiologické situace v ČR a lokalizace rizikových míst.
- Budou využity v projektu „**Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace**“ (2021-2022) - Program BV III/1-VS.
- Výstupy:
 - „Metodika využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování“
 - „Metodika detekce vybraných rizikových mikrobiologických agens pomocí PCR v odpadních vodách“
- Metodiky budou nabídnuty kompetentním složkám státu k využití v praxi.



Děkuji za pozornost

VÚV
TGM

Práce byla financována z institucionálních prostředků MŽP prostřednictvím interního grantu 3600.52.33 VÚV TGM, v.v.i.

Autoři děkují za poskytnutí výsledků sdružení SOVAK ČR a provozovatelům ČOV za poskytnutí vzorků odpadní vody.