

VYUŽITÍ MONITORINGU ODPADNÍCH VOD PRO SLEDOVÁNÍ VÝVOJE EPIDEMIE

Hana Zvěřinová Mlejnková¹⁾, Kateřina Sovová¹⁾, Vojtěch Valášek¹⁾, Petra Vašíčková²⁾, Věra Očenášková¹⁾, Milena Bušová³⁾, Milan Tuček³⁾, Vladimír Bencko³⁾, Eva Juranová¹⁾

¹⁾ *Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka veřejná výzkumná instituce, e-mail: hana.mlejnkova@vuv.cz, tel.: 724 583 662*

²⁾ *Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. e-mail: vasickova@iapg.cz*

³⁾ *I. LF UK, Ústav hygieny a epidemiologie, e-mail: milena.busova@lfl.cuni.cz*

Souhrn

V průběhu epidemie koronaviru SARS-CoV-2 byl odzkoušen epidemiologický přístup k odpadním vodám (WBE=waste water based epidemiology) ke sledování úrovně a vývoje epidemie. Během více než dvouletého monitoringu surových odpadních vod z vybraných ČOV v ČR bylo nashromážděno množství dat a informací, které při korelaci s počty pozitivně testovaných osob potvrdily využitelnost zvoleného přístupu pro ochranu veřejného zdraví. Získaná data a zkušenosti byly zpracovány do metodického postupu, který je připraven pro využití v případě další epidemické situace.

Klíčová slova: WBE; SARS-CoV-2; covid-19; odpadní vody; ČOV

Summary

During the SARS-CoV-2 coronavirus epidemic, an epidemiological approach to wastewater (WBE=wastewater based epidemiology) was tested to monitor the level and development of the epidemic. During more than two years of monitoring of raw wastewater from selected WWTPs in the Czech Republic, a large amount of data and information was collected, which with the correlation with numbers of positively tested persons, confirmed the usability of the chosen approach for the protection of public health. The obtained data and experience were processed into a methodical procedure, which is ready for use in the event of another epidemic situation.

Keywords: WBE; SARS-CoV-2; COVID-19; waste water; WWTP

Úvod

Epidemiologický přístup k odpadním vodám (WBE – wastewater based epidemiology) je interdisciplinární aktivita využívající kvantitativního měření lidských biomarkerů v odpadních vodách (OV) za účelem predikce potenciálního šíření infekcí, a to detekcí výskytu markerů infekčních agens v odpadních vodách. Přístup lze v epidemiologii použít pro sledování virů, bakterií, parazitů a dalších markerů infekčních onemocnění. Není omezen jen na onemocnění trávicího a vylučovacího traktu. Do odpadních vod se dostávají i genomové fragmenty specifické pro původce mnoha jiných infekčních onemocnění, např. virů chřipky, RSV (respirační syncytiální virus), viru hepatitidy A (HAV), aj. WBE přístup je vhodným doplňkovým epidemiologickým nástrojem pro identifikaci blížící se epidemie a pro sledování jejího vývoje, což může být významným přínosem pro omezení ekonomických důsledků šíření epidemie, tj. stavu, kdy je v ČR hlášeno 1 600-1 800 nemocných na 100 tisíc obyvatel.

Cílem studie bylo pomocí rozsáhlého monitoringu čistíren odpadních vod (ČOV) v průběhu epidemie koronaviru SARS-CoV-2 v letech 2020 až 2022 prokázat korelaci mezi množstvím detekovaného genetického materiálu rizikového biologického agens nebo biomarkeru v odpadních vodách a hlášenými klinickými případy onemocnění nebo rozšířením onemocnění ve sledované populaci, což je konečným cílem WBE přístupu. Informativně byl výzkum doplněn sledováním změn koncentrací neopterinu v OV jako markeru zánětlivých onemocnění. WBE přístup se v době pandemie SARS-CoV-2 velmi rozšířil v celém světě a v mnoha zemích se stal systematickou podporou epidemiologického sledování. Informace o zavedení a využívání WBE přístupu jsou dostupné na webových stránkách jednotlivých státních nebo výzkumných institucí, mnoho odkazů je sdruženo na stránce <https://wastewater-observatory.jrc.ec.europa.eu/#/dashboards>. Výsledky našeho monitoringu jsou dostupné na: <http://covmon.vuv.cz>; <https://www.vuv.cz/virus-covid19-v-odpadnich-vodach/o-tematu-23/>.

Metodika

Od dubna 2020 do konce roku 2022 byly prováděny aktivity vedoucí k ověření možnosti využití odpadních vod jako pomocného protiepidemického nástroje. Monitoring výskytu SARS-CoV-2 v OV byl prováděn v rámci interních grantů VÚV financovaných z institucionálních prostředků MŽP a

z projektu COVMON (VI04000017 Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace, 4. VS BV III). V průběhu tohoto období bylo získáno množství zásadních informací čerpajících z obdobných studií a mnoho empiricky získaných údajů, ze kterých byly vyvozeny závěry s cílem navržení nejhodnějšího přístupu k monitoringu odpadních vod pro podmínky ČR.

Prakticky byly testovány jednotlivé kroky postupu, které by mohly mít vliv na kvalitu výsledků monitoringu. Otestovány byly následující kroky:

- postupy vzorkování (testování rozdílů ve složení odpadních vod v průběhu 24hodinového cyklu; porovnání rozdílů mezi prostými a slévanými vzorky; porovnání rozdílů mezi slévanými 24hodinovými a 18hodinovými vzorky; porovnání homogenity vzorků; testování vlivu zvýšené četnosti odběru vzorků – 2x týdně),
- postupy stabilizace a uchování vzorků (porovnání různých způsobů stabilizace vzorků; porovnání uchování vzorků při $-70\pm 4/-20\pm 2/5\pm 3$ °C),
- výběr vhodných ČOV (porovnání ČOV různých kategorií, charakteru stokových sítí a podílů komunálních a průmyslových odpadních vod),
- vlastní stanovení SARS-CoV-2 pomocí RT-qPCR (vývoj a optimalizace metody pro odpadní vody)
- PCR stanovení přítomnosti RNA virů chřipky A a B a hepatitidy A (HAV) (vývoj a optimalizace metod pro odpadní vody),
- stanovení neopterinu jako biomarkeru buněčné imunitní reakce těla na virové a bakteriální infekce (vývoj a optimalizace metody, porovnání naměřených dat s epidemiologickými údaji a s množstvím RNA SARS-CoV-2),
- stanovení viru SARS-CoV-2 a neopterinu v klinických vzorcích (studie na skupině pediatrických pacientů),
- korelace množství RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách s klinickými daty (porovnání mezi rozdílnými etapami monitoringu; vyhodnocení pro jednotlivé ČOV; statistické hodnocení korelací mezi všemi sledovanými faktory).

Výsledky

Podrobné výsledky a rozsáhlé datové a grafické přílohy jsou uvedeny v souhrnné výzkumné zprávě projektu VI04000017 Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace, umístěné na: https://heis.vuv.cz/data/webmap/datovesady/projekty/covmon/docvystupy/Vsouhrn_COVMON-VI04000017_2022_final.pdf [1].

Zde uvádíme stručný výtah výsledků pro jednotlivé studované oblasti.

Vzorkování:

- Existují velké rozdíly ve fekálním znečištění odpadních vod na nátoky na ČOV v průběhu dne (cca 70 % denního znečištění vstupuje do ČOV mezi 10. a 23. hodinou). V této době byly zjištěny i nejvyšší koncentrace RNA SARS-CoV-2 [2, 3].
- Statistické vyhodnocení pomocí korelačních koeficientů potvrdilo pro monitoring RNA SARS-CoV-2 jako vhodnější slévané vzorky. Pro menší ČOV lze spolehlivě použít i prosté vzorky. Odběr prostých vzorků by měl být směřován do doby vysokého fekálního zatížení odpadních vod.
- Četnost 2 odběrů týdně ukazuje přesnější stav aktuální epidemické situace a je vhodná pro sledování trendu aktivně probíhající epidemie, zpřesnění a potvrzení nastalé významnější změny a eliminaci výkyvů v obsahu virové RNA. Pro dlouhodobé preventivní sledování je dostačující četnost odběrů 1x týdně.

Stabilizace a uchování vzorků

- Jako optimální byl vyhodnocen postup okamžitého zpracování vzorku do 24 hodin po odběru, stabilizace PEG + NaCl co nejdříve po odběru. V případě nutnosti je možné vzorek skladovat v lednici při 5 ± 3 °C po přidání PEG + NaCl po dobu jednoho týdne. Při nutnosti delšího uchování vzorku před analýzou je nezbytné rychlé zamražení na -70 ± 4 °C.
- Při skladování vzorků při -20 ± 2 °C dochází k významným poklesům koncentrací virové RNA virů v průběhu času (po 1 měsíci klesla koncentrace o 90 %, po 3 měsících o 95 % a po 6 měsících až o 97 %).

- Významnou částí přípravy vzorku je jeho homogenizace. Nedostatečná homogenita může být významným příspěvkem chyby stanovení. Tento fakt je nezbytné brát při analýzách odpadní vody v úvahu, i přesto, že výsledek našich pokusů nezjistil zásadní rozdíly v alikvotních podílech vzorku.

Výběr ČOV

- Do souboru sledovaných ČOV byly vybrány čistírny různých kategorií na území celé ČR s různými charakteristikami (množství odpadních vod, podíl průmyslových odpadních vod, délka kanalizační sítě a počet napojených obyvatel), aby bylo možné udělat porovnání a vybrat ČOV nejvhodnější pro účely epidemiologického monitoringu. Pro účely projektu bylo vybráno 66 ČOV, na kterých bylo prováděno od dubna 2020 do 2022 vzorkování odpadních vod.
- Ve vzorcích byly pro informaci o charakteru OV sledovány fyzikálně-chemické a mikrobiologické ukazatele.
- Nebyla prokázána korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a fyzikálně-chemickými a mikrobiologickými ukazateli, ani korelace s množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.
- Detekce virové RNA byla úspěšná na ČOV všech velikostních kategorií i při nízké prevalenci nakažených osob ve spádové oblasti.
- Statistické analýzy neprokázaly, že by některé z uvedených velikostních kategorií ČOV byly pro účel monitoringu vhodnější než jiné.
- Rozsáhlá síť ČOV a velký rozsah kanalizačních sítí v ČR nabízí velmi vhodné prostředí pro provádění WBE monitoringu.

Stanovení RNA SARS-CoV-2

- Byl vyvinut, odzkoušen a publikován „Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2 metoda stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách“ (https://www.vri.cz/wp-content/uploads/2022/02/141_MetPostup_Final_Vasickova.pdf), včetně izolace RNA ze vzorku odpadní vody. Principem postupu je zakoncentrování a stabilizace vzorku přímou flokulací s přidávkem PEG a NaCl, izolace RNA pomocí QIAamp Viral RNA Mini Kitu a kvantitativní detekce RNA viru SARS-CoV-2 pomocí RT-qPCR cílená na gen N a nestrukturální protein nsp12.
- Metoda je vysoce citlivá, limit detekce celého postupu je 2,5 virové částice (GE) v 1 ml odpadní vody.
- Pozitivní nález virové RNA byl zjištěn již pro jednotky až desítky osob zachycených klinickým PCR testováním.
- Metoda byla modifikována i pro stanovení RNA SARS-CoV-2 v moči. Výsledky provedené klinické studie prokázaly vylučování RNA SARS-CoV-2 močí u téměř 30 % příznakových jedinců.

PCR stanovení přítomnosti RNA virů chřipky A a B

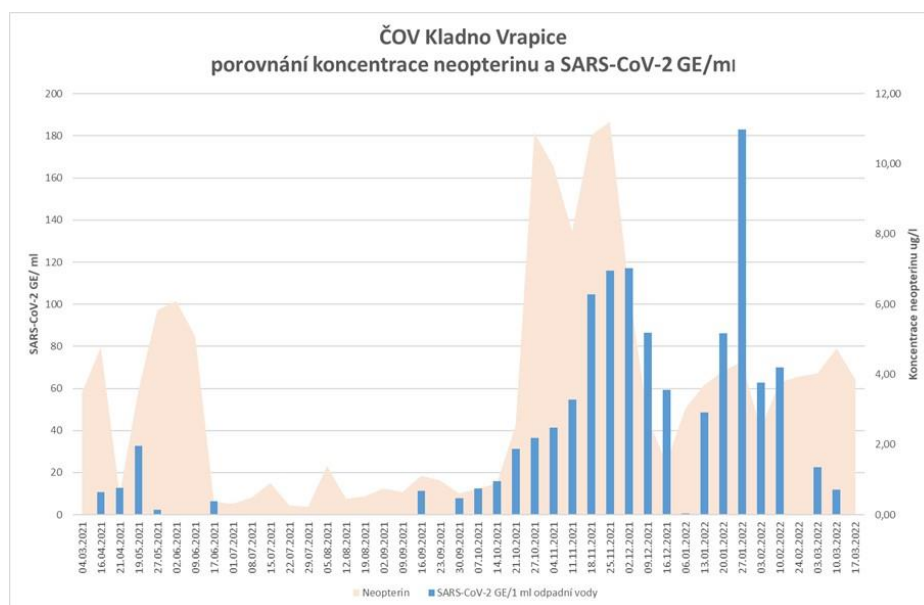
- Byly vytvořeny a validovány postupy detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B a viru hepatitidy A metodou RT-qPCR v odpadních vodách. V analyzovaných vzorcích (118) z velkých měst, kde byl v době epidemie předpokládán alespoň minimální výskyt chřipky, nebyly detekovány specifické oblasti genomu virů chřipky A a B, což bylo způsobeno úplným potlačením výskytu chřipky na území ČR v období epidemie.
- Aktuálně jsou v odpadních vodách ve světě metodou PCR úspěšně sledovány i další respirační viry (respirační syncytiální virus, rhinovirus A a B, aj.) [5].

PCR stanovení přítomnosti RNA hepatitidy A (HAV)

- Detekce specifických oblastí genomu HAV byla do projektu zařazena jako alternativní biomarker a současně původce velmi nebezpečného onemocnění. Stanovení byla doplněna detekcí RNA virů NoV GI a NoV GII. Přestože byla RNA HAV stanovována ve vzorcích vybraných dle informací o výskytu VHA v populaci ČR ve sledovaném období, nebyla v žádném ze 121 vzorků prokázána přítomnost RNA HAV. Příčinou byl pravděpodobně velmi nízký výskyt HAV v ČR ve sledovaném období (cca 400 případů) a výběr lokalit, cílený na jiný účel.
- Z předchozích studií autorů jsou však známy epidemiologické souvislosti, při nichž byla prokázána RNA HAV v odpadních vodách.

Stanovení neopterinu

- Byl vyvinut a odzkoušen postup stanovení neopterinu v odpadních vodách jako biomarkeru buněčné imunitní reakce těla na virové a bakteriální infekce na principu kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Byla dosažena mez stanovitelnosti metody 0,05 µg/l odpadní vody.
- Na ČOV, kde byl prováděn dlouhodobý monitoring (ÚČOV Praha, ČOV Brno, ČOV Kladno (Vrapice), bylo zjištěno, že v odpadních vodách dochází nejdříve ke zvyšování koncentrace neopterinu, které je následováno zvyšováním koncentrace RNA SARS-CoV-2 (obr. 1).
- Provedená studie stanovení neopterinu v moči prokázala vyšší koncentraci neopterinu u příznakových jedinců s covid-19.
- Neopterin jako prediktor zánětlivých onemocnění se ukázal být vhodným nástrojem pro monitoring těchto onemocnění prostřednictvím odpadních vod.



Obr. 1: Porovnání koncentrace neopterinu a RNA SARS-CoV-2 na ČOV Kladno

Korelace množství RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách s klinickými daty

- Výsledky stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách byly korelovány s počty pozitivně testovaných (od -10. dne do +3. dne od data prvních klinických příznaků) a hospitalizovaných osob v průběhu celé epidemie covid-19.
- Vyhodnocení bylo ovlivněno průběhem protiepidemických opatření, kdy se velmi často měnily možnosti a povinnosti testování, které významně ovlivňovaly přirozené epidemiologické údaje o počtech pozitivně testovaných osob. Hodnocení výsledků bylo ovlivněno i nepřesnou lokalizací evidovaných pozitivně testovaných osob.
- Výsledek korelační analýzy všech získaných dat ukázal na korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob napojených na sledované ČOV a množstvím detekované RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách. Podobná korelace byla pozorována mezi množstvím detekované RNA SARS-CoV-2 a podílem pozitivně testovaných osob napojených na jednotlivé ČOV.

Korelace množství RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách s klinickými daty pro jednotlivé varianty

- Výsledek korelační analýzy mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekované RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách pro jednotlivé varianty prokázal vysokou korelaci pro variantu delta, neprokával korelaci pro variantu alfa a omikron (což bylo způsobeno počtem a skladbou analyzovaných dat a odlišným přístupem k testování v průběhu epidemie).
- Analyzovaná data ukázala pozitivní korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a počty hospitalizovaných osob v případě varianty delta. Výsledky pro variantu alfa a omikron byly více ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat a závažností klinických příznaků infekce.
- Charakter hodnocených dat (tj. prokázané korelace údajů 10 dní před datem prvních klinických příznaků s údaji o množství RNA SARS-CoV-2 ve dnech odběru vzorků) potvrzuje předpoklad, že WBE přístup umožňuje predikci vývoje epidemie

Metodický postup využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování

- Z uvedených výsledků projektu byl navržen „Metodický postup využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování“, který je součástí souhrnné výzkumné zprávy projektu. Metodický postup je koncipován tak, aby byl využitelný jako nástroj pro včasné epidemiologické varování na území ČR i pro jiná riziková biologická agens a biomarkery vyskytující se v komunálních odpadních vodách.
- Metodický postup navrhuje pro daný účel provádění cíleného a systematického monitoringu odpadních vod s předpokladem splnění následujících hledisek dle návrhu:
 1. definice hledaného rizikového biologického agens nebo biomarkeru
 2. výběr reprezentativních odběrových profilů
 3. výběr laboratoře pro analýzy odpadních vod
 4. plán odběru vzorků – volba typu vzorku, lokalizace profilů, četnost odběrů
 5. zajištění odběrů vzorků a jejich transportu do laboratoře
 6. zpracování vzorků ve spádové laboratoři
 7. předání výsledků kompetentním orgánům

Závěr

Studie prokázala, že existuje korelace mezi naměřeným množstvím RNA SARS-CoV-2 a klinickými případy onemocnění covid-19. Tento fakt potvrzuje, že cílený systematický monitoring odpadních vod poskytuje dostatečně robustní data pro predikční modely, které mohou poskytovat objektivní informace pro sledování trendu výskytu sledovaného onemocnění nebo jiného významného kritického jevu v populaci. Při akceptování zjištěných poznatků a včasné a správné interpretaci výsledků může být WBE monitoring schopen velmi účinně přispět k prevenci šíření, sledování a prognózy vývoje výskytu epidemicky významných etiologických agens a zavádění vhodných opatření v ČR.

Nezbytným předkladem úspěšného WBE monitoringu je však vytvoření vhodných podmínek pro jeho cílené a systematické provádění (viz Metodický postup využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování).

Poděkování

Článek byl vytvořen s podporou projektu COVMON (VI04000017 Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace, 4. VS BV III) a interních grantů VÚV TGM, v.v.i., financovaných z institucionálních prostředků MŽP.

Literatura

- [1] ZVĚŘINOVÁ MLEJNKOVÁ H. A KOL (2022): Souhrnná výzkumná zpráva projektu VI04000017 Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace 2021-2022. VÚV TGM, v.v.i., 122 s.
- [2] GHARWALOVÁ LUCIA, JURANOVÁ EVA, MLEJNKOVÁ HANA, OČENÁŠKOVÁ VĚRA, SOVOVÁ KATEŘINA, VAŠÍČKOVÁ PETRA (2021): Optimalizace způsobu odběru vzorků pro monitorování viru SARS-COV-2 v odpadních vodách. TZB-info, 1. 11. 2021. <https://voda.tzb-info.cz/likvidace-odpadnich-vod/23005-optimalizace-zpusobu-odberu-vzorku-pro-monitorovani-viru-sars-cov-2-v-odpadnich-vodach>.
- [3] HEATON, K. & kol. (1992): Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: A prospective study, Gut.
- [4] VAŠÍČKOVÁ P. A KOL. (2021): Metodický postup 141/2022 - Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2. VÚVeL, v.v.i., 27 s.
- [5] AHMED W. ET AL. (2022): Occurrence of multiple respiratory viruses in wastewater in Australia: Potential for community disease surveillance. Sci Total Environ. 2022 Dec 17;864:161023. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.161023.