

Příloha P10

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

Projektový tým: Hana Zvěřinová Mlejnková, Kateřina Sovová, Petra Vašíčková, Eva Juranová, Věra Očenášková, Milena Bušová, Milan Tuček, Vladimír Bencko, Miroslav Váňa

Uvedený metodický postup je součástí souhrnné výzkumné zprávy (Vsouhrn), která je výstupem projektu Ministerstva vnitra VI04000017 (Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace). Zveřejňování tohoto postupu či jeho částí podléhá omezením vyplývajícím z požadavků MV ČR a MZ ČR.

Obsah

1.	Úvod.....	3
2.	Definice hledaného rizikového biologického agens nebo biomarkeru	4
3.	Výběr reprezentativních odběrových profilů	4
4.	Výběr laboratoře pro analýzy odpadních vod	6
5.	Plán odběru vzorků – volba typu vzorku, lokalizace profilů, četnost odběrů.....	7
6.	Zajištění odběrů vzorků a jejich transportu do laboratoře.....	8
7.	Zpracování vzorků ve spádové laboratoři	8
8.	Předání výsledků kompetentním orgánům	9

1. Úvod

Metodický postup vychází z ověřených výsledků projektu VI04000017 - Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace (COVMON) - 4.VS BV III a je součástí „Souhrnné výzkumné zprávy projektu VI04000017 Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace, 2021-2022“, která shrnuje veškeré poznatky získané během řešení projektu. Projekt byl realizován v období pandemie viru SARS-CoV-2, na který byl primárně cílen.

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.

Z výsledků řešení projektu vyplynulo, že pro provádění monitoringu odpadních vod, jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace, je nutný cílený a systematický monitoring odpadních vod, splňující uvedená hlediska:

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

2. Definice hledaného rizikového biologického agens nebo biomarkeru

Definice hledaného rizikového biologického agens nebo biomarkeru je a bude vždy závislá na aktuální epidemické situaci.

Předložená metodika byla vytvořena primárně pro stanovení přítomnosti specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách (Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2; přístupná zde: https://www.vri.cz/wp-content/uploads/2022/02/141_MetPostup_Final_Vasickova.pdf).

Dále byly vytvořeny a validovány tyto postupy:

- Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR
- Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR
- Stanovení neopterinu jako biomarkeru buněčné imunitní reakce těla na virové a bakteriální infekce

Uvedené postupy jsou součástí Souhrnné výzkumné zprávy projektu VI04000017 Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace, 2021-2022.

3. Výběr reprezentativních odběrových profilů

Epidemiologické sledování odpadních vod je možné provádět na čistírnách odpadních vod (ČOV) všech velikostních kategorií a na kanalizačních stokách. Výběr odběrových profilů je závislý na účelu sledování. Pro získání validních výsledků je nutné zvolit reprezentativní odběrové profily, odpovídající účelu sledování, který je třeba při přípravě plánu monitoringu zohlednit – viz tabulka:

Účel sledování	Postup
preventivní sledování výskytu hledaných agens v celé ČR	provádět monitoring na velkých ČOV (>100 000 napojených obyvatel), tj. ÚČOV Praha, ČOV Brno, ČOV Ostrava, ČOV Plzeň, ČOV České Budějovice), která poskytují informace od cca 26 % obyvatel ČR
sledování lokálního výskytu hledaných agens v krajích	provádět monitoring v příslušných krajských městech
sledování lokálního výskytu hledaných agens na nižší geografické úrovni (města, obce)	vybrat reprezentativní odběrový profil se zohledněním dále uvedených faktorů
sledování výskytu hledaných agens na strategických lokalitách (letišť, utečenecké tábory, aj.)	vybrat reprezentativní odběrový profil se zohledněním dále uvedených faktorů
sledování výskytu hledaných agens v konkrétních objektech nebo oblastech (školy, domovy důchodců, firmy, sídliště, aj.),	vybrat reprezentativní odběrový profil se zohledněním dále uvedených faktorů

Četnost odběru vzorků musí odpovídat účelu sledování: v době epidemie 2-3x týdně, preventivně 1x týdně.

Při výběru reprezentativních profilů je potřeba zohlednit možnost ovlivnění odebraných vzorků těmito faktory:

- počet napojených obcí a/nebo rezidentů (podle účelu sledované lokality/územního celku);
- charakter kanalizační sítě (možnost degradace hledaného biologického materiálu průtokem kanalizací - délka potrubí, průměrná doba setrvání OV v síti, čerpací stanice OV v síti);

- dostupnost odběrového profilu (možnost umístění automatického vzorkovače nebo provedení prostého odběru);
- typ kanalizace (oddílná/jednotná) - podíl komunálních odpadních vod a průmyslových vod (možnost přítomnosti inhibitorů nebo jiného ovlivnění biologického materiálu určitými průmyslovými vodami);
- průtok odpadní vody (okamžitý, průměrný za posledních 24 hodin, odchylka od dlouhodobého průměrného průtoku).

4. Výběr laboratoře pro analýzy odpadních vod

Pro vytvoření funkčního systému monitoringu odpadních vod je třeba vytvořit síť laboratoří zaměřenou na práci s odpadními vodami. Laboratoře musí mít validovaná příslušná stanovení a vybavení technikou umožňující požadovanou analýzu nebo jsou vzhledem ke zkušenostem a vybavení schopny v krátké době zavést nová stanovení pro matici odpadních vod.

Dále musí být určena referenční laboratoř pro kontrolu kvality práce zapojených laboratoří, která bude organizačně i odborně zajišťovat mezilaboratorní porovnání používaných metod.

V rámci této sítě musí být určena spádová oblast laboratoří pro sledované lokality odběrů vzorků odpadních vod. V případě potřeby dlouhodobého porovnání výsledků kvantitativních stanovení by mělo být preferováno zpracování pravidelných/opakovaných vzorků vždy ve stejné laboratoři (vyplývá ze zkušeností celosvětového monitoringu SARS-CoV-2).

5. Plán odběru vzorků – volba typu vzorku, lokalizace profilů, četnost odběrů

Před zahájením monitoringu (systematického/mimořádného) je nutné sestavit plán odběru vzorků, který musí obsahovat:

- typ a objem vzorku (prosté/slévané typ B/C/jiný; vzorkovací zařízení; typ vzorkovnice; způsob homogenizace);
- přesnou lokalizaci odběrových profilů (popis, GPS, nákres (plánek) místa odběru, fotodokumentace);
- četnost odběru vzorků (pravidelná četnost, řešení mimořádných situací);
- lokalizace spádové a záložní laboratoře pro konkrétní vzorky;
- personální zajištění odběrů (školený vzorkař, spolupráce s provozovateli);
- bezpečnostní pokyny pro práci s infekčním materiálem v rizikovém prostředí, včetně seznamu ochranných pracovních prostředků.

Při výběru odběrových profilů a při vlastních odběrech vzorků je třeba zohlednit možnost ovlivnění vzorku následujícími faktory:

- aktuálním množstvím odpadní vody (naředění množství hledaného biologického materiálu);
- aktuálním naředěním odpadní vody dešťovou vodou, jehož důsledkem může být nadměrné naředění množství hledaného biologického materiálu (vést záznamy o průtocích odpadních vod);
- režimem životního stylu v době odběru vzorků (pracovní dny/víkendy/svátky);
- homogenitou odebraného vzorku (důkladná homogenizace po/v průběhu odběru);
- mimořádnými okolnostmi (záznam teploty vzorku, poruchy vzorkovačů, jiné technologické problémy, nárazové vypouštění odpadních vod ze zemědělství i průmyslové výroby, změna místa odběru, aj.);

6. Zajištění odběrů vzorků a jejich transportu do laboratoře

Ve spolupráci s provozovateli ČOV nebo kanalizační sítě je pro zajištění reprezentativních vzorků třeba dodržovat tyto zásady:

- pokud je to možné odběr provádět za hrubým mechanickým předčištěním (v případě ČOV česle);
- optimálně odebírat 24hodinový slévaný vzorek (typ B nebo C) s využitím chlazeného automatického vzorkovače;
- v případě odběru prostého vzorku odebírat v době odpovídající účelu sledování (v závislosti na režimu napojených osob);
- zajistit důkladnou homogenizaci vzorku před naplněním do vzorkovnic;
- stanovit teplotu, pH a elektrolytickou konduktivitu vzorku při odběru;
- zajistit rychlý a bezpečný transport do laboratoře;
- vzorek transportovat chlazený (podle typu stanovení).

7. Zpracování vzorků ve spádové laboratoři

Odebrané vzorky podle výše uvedených pokynů musí být transportovány do předem zvolené spádové, příp. záložní laboratoře k okamžitému zpracování. V případě nemožnosti okamžitého zpracování musí být v rámci validace metody pro každou laboratoř definovány postupy uchování vzorků (stabilizace, chlazení, mražení aj.).

Postup při detekci RNA SARS-CoV-2:

- vzorek zpracovat nejlépe do 24 hodin po odběru, do zpracování uchovávat v chladničce při 5 ± 3 °C (podle metody stanovení)
- není-li to možné, vzorek stabilizovat (např. přidáním polyetylglykolu - PEG a NaCl), uchovat v chladničce při 5 ± 3 °C a analyzovat do 7 dnů;
- v případě nemožnosti okamžitého zpracování provést rychlé zamražení vzorku na -70 °C (lze uchovat cca 6 měsíců; dochází ke ztrátě výtěžku cca 5x)

8. Předání výsledků kompetentním orgánům

Získané výsledky, včetně charakteristik odběru, musí být neprodleně předány kompetentním orgánům, např. SZÚ, ÚZIS, k dalšímu využití v systému včasného varování před vznikem nebo v průběhu epidemiologické situace tak, aby mohly být co nejdříve využity pro ochranu veřejného zdraví.