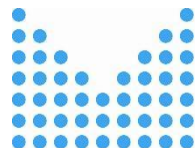


Příjemci podpory:

Výzkumný ústav vodohospodářský, T.G.M, v.v.i.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy



**MINISTERSTVO VNITRA
ČESKÉ REPUBLIKY**

Poskytovatel: 4. VS BV III

Souhrnná výzkumná zpráva projektu

VI04000017

**Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování
před vznikem epidemiologické situace**

2021-2022

Řešitelský tým:

Aktuální složení týmu v pořadí za sebou bez titulů - manažer, hlavní řešitel, odpovědná osoba projektu či dalšího řešitele, člena realizačního týmu.

manažer projektu: Eva Juranová

hlavní řešitel: Hana Zvěřinová Mlejnková

další řešitelé: Petra Vašíčková, Monika Morávková, Milena Bušová

členové řešitelského týmu: Kateřina Sovová, Vojtěch Valášek, Věra Očenášková, Miroslava Krzyžánková, Jakub Hrdý, Milan Tuček, Vladimír Bencko, Miroslav Váňa

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	4
SEZNAM TABULEK	7
1 Popis cílů a plánovaných výstupů projektu	9
1.1 Popis výstupů projektu.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Monitoring odpadních vod jako nástroj včasného varování.....	10
2.2 Koronaviry	10
2.3 Viry v odpadních vodách	11
2.4 Síť ČOV v ČR.....	12
2.5 Zkušenosti z monitoringu SARS-CoV-2 a jiných biomarkerů v odpadních vodách.....	13
2.6 Epidemiologie založená na odpadních vodách	17
2.7 Významná opatření v průběhu epidemie covid-19 v ČR	19
2.8 Interpretace výsledků WBE přístupu.....	21
2.9 Mutace a varianty SARS-CoV-2.....	23
2.10 Charakteristika neopterinu jako epidemiologického biomarkeru	23
3 Praktická část	25
3.1 Vývoj a využití metodiky PCR pro detekci RNA SARS-CoV-2 a dalších virů v odpadních vodách 25	
3.1.1 Optimalizace metody RT-qPCR pro stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách .	25
3.1.2 Mezilaboratorní porovnání metody RT-qPCR pro stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách.....	28
3.1.3 Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR	29
3.1.4 Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR	30
3.1.5 Detekce specifických oblastí genomu norovirů NoV GI a NoV GII	31
3.1.6 Vyhodnocení duplicitních vzorků a definice nejistoty stanovení RNA SARS-CoV-2	32
3.2 Vzorkování odpadních vod	37
3.2.1 Optimalizace způsobu odběru vzorků pro monitorování odpadních vod.....	37
3.2.2 Testování rozdílů ve složení odpadních vod v průběhu 24hodinového cyklu.....	38
3.2.3 Porovnání rozdílů mezi prostými a slévanými vzorky	43
3.2.4 Porovnání rozdílů mezi slévanými 24hodinovými a 18hodinovými vzorky.....	44
3.2.5 Porovnání homogenity vzorků	44
3.2.6 Porovnání uchování vzorků při -70/-20/5±3 °C.....	46
3.2.7 Testování vlivu zvýšené četnosti odběru vzorků – 2x týdně	46
3.3 Výběr ČOV	48
3.4 Stanovení neopterinu v odpadních vodách.....	51
3.4.1 Vývoj metody stanovení neopterinu v odpadních vodách.....	51
3.4.2 Vyhodnocení výsledků stanovení neopterinu	55

3.4.3	Shrnutí výsledků monitoringu neopterinu v odpadních vodách	63
3.5	Testování klinických vzorků	64
3.5.1	Stanovení viru SARS-CoV-2 a neopterinu v moči.....	64
3.5.2	Stanovení neopterinu v moči	64
3.6	Výsledky monitoringu RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách	65
3.6.1	Etapy monitoringu ČOV	65
3.6.2	Porovnání vhodnosti velikostních kategorií ČOV k WBE monitoringu	68
3.6.3	Epidemiologická data použitá pro hodnocení.....	69
3.6.4	Porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách s počty pozitivně testovaných osob	69
3.6.5	Výsledky monitoringu na jednotlivých ČOV	70
3.6.6	Výsledky dlouhodobého monitoringu	104
3.6.7	Statistické vyhodnocení výsledků.....	110
3.6.7.1	Korelační analýza SARS-CoV-2 GE/ml s počty pozitivně testovaných osob, chemickými parametry odpadních vod a vybranými charakteristikami ČOV	110
3.6.7.2	Korelační analýza SARS-CoV-2 GE/ml s počty hospitalizovaných osob	115
3.6.7.3	Korelace SARS-CoV-2 GE/ml s počty pozitivně testovaných osob v závislosti na velikostní kategorii ČOV, typu odběru a variantě viru	116
4	Souhrn.....	118
5	Závěr	121
6	Přílohy.....	122

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Síť ČOV v ČR.....	13
Obr. 2 Schéma epidemiologického přístupu k odpadním vodám.....	17
Obr. 3 Typical Workflow for Wastewater Surveillance, after WHO (2022).	23
Obr. 4 Neopterin (zdroj PubChem).....	24
Obr. 5 Výskyt specifických oblastí genomu virů chřipky A a B a SARS-CoV-2 v odpadních vodách (2020-2022).....	30
Obr. 6 Výskyt specifických oblastí genomu virů HAV, NoV GI a NoV GII v odpadních vodách (2020-2022).	32
Obr. 7 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno.....	33
Obr. 8 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno.....	33
Obr. 9 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Brno.	34
Obr. 10 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Brno.	34
Obr. 11 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Praha.....	35
Obr. 12 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Praha.....	35
Obr. 13 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno a VÚV Praha.....	36
Obr. 14 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno a VÚV Praha.....	36
Obr. 15 Časové změny mikrobiálních a fyzikálně-chemických parametrů v hodinových vzorcích odebraných 2. 2. 2021 na nátoky ČOV Brno.....	39
Obr. 16 Odpadní voda ČOV Brno: 2. – 3. 2. 2021 (lockdown) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru.....	39
Obr. 17 Časové změny mikrobiálních a fyzikálně-chemických parametrů v hodinových vzorcích odebraných 3. 2. 2021 na nátoky ČOV Břeclav.....	40
Obr. 18 Odpadní voda ČOV Břeclav: 3. – 4. 2. 2021 (lockdown) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru.....	40
Obr. 19 Odpadní voda ČOV Brno 11. - 12. 10. 2021 (normální režim) - změny v průběhu 24hodinového odběru.....	41
Obr. 20 Odpadní voda ČOV Brno: 10. – 11. 10. 2021 (normální režim) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru	41
Obr. 21 Odpadní voda ČOV Břeclav 4. – 5. 10. 2021 (normální režim) - změny v průběhu 24hodinového odběru.....	42
Obr. 22 Odpadní voda ČOV Břeclav: 4. – 5. 10. 2021 (normální režim) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru	42
Obr. 23 Mikrobiální znečištění 24h kompozitních vzorků surové odpadní vody z ČOV Břeclav.....	43
Obr. 24 Rozdíl výtěžků SARS-CoV-2 GE/ml u vzorků typu P a S24.	44
Obr. 25 Porovnání výsledků stanovení RNA SARS-CoV-2 GE v 10 podílech vzorků odpadní vody.	45
Obr. 26 Porovnání výsledků stanovení SARS-CoV-2 GE v podílech vzorků odpadní vody s různým typem homogenizace.	46
Obr. 27 Posouzení vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně na ČOV Brno.	47
Obr. 28 Posouzení vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně na ČOV Kladno (Vrapice).....	47
Obr. 29 Srovnání vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně).....	48
Obr. 30 kalibrační graf stanovení neopterinu 0,05-10 ug/l.....	53
Obr. 31 Nízká intenzita signálu v neřaděném vzorku.....	54
Obr. 32 Zvýšená intenzita signálu v řaděném vzorku.....	54

Obr. 33 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice).....	56
Obr. 34 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice).....	56
Obr. 35 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice).....	57
Obr. 36 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – SVL.....	58
Obr. 37 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – SVL.....	58
Obr. 38 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – NVL.....	59
Obr. 39 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – NVL.....	60
Obr. 40 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběr a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – NVL.....	60
Obr. 41 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Brno.....	61
Obr. 42 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Brno.....	62
Obr. 43 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběr a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Brno.....	62
Obr. 44 Hodnoty neopterinu/kreatinin ($\mu\text{mol/mol}$) v moči dětských pacientů s covid-19.....	65
Obr. 45 Lokalizace 66 sledovaných ČOV na území ČR.....	66
Obr. 46 Lokalizace 34 ČOV sledovaných v 1. etapě monitoringu.....	66
Obr. 47 Lokalizace 49 ČOV sledovaných ve 2. etapě monitoringu.....	67
Obr. 48 Lokalizace 13 ČOV sledovaných ve 3. etapě monitoringu.....	67
Obr. 49 Lokalizace 4 ČOV sledovaných ve 4. etapě monitoringu.....	68
Obr. 50 Porovnání záchytu pozitivních vzorků v jednotlivých velikostních kategoriích ČOV.....	69
Obr. 51 ČOV Beroun.....	71
Obr. 52 ČOV Brno.....	72
Obrázek 53 ČOV Břeclav.....	73
Obrázek 54 ČOV Blansko.....	74
Obr. 55 ČOV Bučovice.....	75
Obr. 56 ČOV Buchlovice.....	76
Obrázek 57 ČOV Domažlice.....	78
Obr. 58 ČOV Hostivice.....	81
Obr. 59 ČOV Cheb.....	82
Obr. 60 ČOV Karlovy Vary.....	84
Obr. 61 ČOV Litoměřice.....	86
Obr. 62 ČOV Mělník.....	87
Obr. 63 ČOV Nové Město nad Metují.....	88
Obr. 64 ČOV Ostrava.....	90
Obr. 65 ČOV Pardubice.....	91
Obr. 66 ČOV Plzeň.....	93
Obr. 67 ÚČOV Praha (obě vodní linky - SVL i NVL).....	94
Obr. 68 ČOV Přerov.....	95
Obr. 69 ČOV Slavkov u Brna.....	96
Obr. 70 ČOV Tišnov.....	99
Obr. 71 ČOV Uherský Brod.....	100
Obr. 72 ČOV Kladno (Vrapice).....	102

Obr. 73 Výsledky dlouhodobého monitoringu na vybraných ČOV – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtů pozitivně testovaných osob v celé ČR (na 100 tis. obyvatel).	105
Obr. 74 Výsledky dlouhodobého monitoringu na ČOV Brno – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).	106
Obr. 75 Výsledky dlouhodobého monitoringu na ČOV Břeclav – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).	107
Obr. 76 Výsledky dlouhodobého monitoringu na ČOV Kladno (Vrapice) – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).	108
Obr. 77 Výsledky dlouhodobého monitoringu na stávající vodní lince ÚČOV Praha – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel). ...	109
Ob. 78 Výsledky dlouhodobého monitoringu na nové vodní lince ÚČOV Praha – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel). ...	109
Obr. 79 Porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách s počty pozitivně testovaných osob na 100 tis. napojených obyvatel.	110
Obr. 80 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – všechny etapy.....	111
Obr. 81 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – Varianta ALFA.....	112
Obr. 82 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – Varianta DELTA.....	113
Obr. 83 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – Varianta OMIKRON.	114
Obr. 84 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů hospitalizovaných osob – varianta ALFA.	115
Obr. 85 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů hospitalizovaných osob – varianta DELTA.	115
Obr. 86 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů hospitalizovaných osob – varianta OMIKRON.	116

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Webové stránky monitoringu SARS-CoV-2 v odpadních vodách.....	15
Tab. 2 Výsledky experimentů, zaměřených na výběr vhodné metodiky analýzy vzorků odpadních vod.	26
Tab. 3 Citlivost/limit detekce (LOD), opakovatelnost a účinnost metodického postupu.	28
Tab. 4 Porovnání výtěžků SARS-CoV-2 GE/ml u vzorků typu S18 a S24.	44
Tab. 5 Rozložení sledovaných ČOV v krajích ČR.	49
Tab. 6 Rozdělení sledovaných ČOV podle kategorií.	50
Tab. 7 Přehled množství čištěných odpadních vod na sledovaných ČOV za rok a průměrný denní průtok.	50
Tab. 8 MS přechody.....	52
Tab. 9 Gradient mobilní fáze.	53
Tab. 10 ČOV Beroun.	70
Tab. 11 ČOV Brno.	71
Tab. 12 ČOV Břeclav.	72
Tabulka 13 ČOV Blansko.	73
Tab. 14 ČOV Broumov.	74
Tab. 15 ČOV Bučovice.....	75
Tab. 16 ČOV Buchlovice.....	75
Tab. 17 ČOV Bzenec.....	76
Tab. 18 ČOV Černošice.	77
Tab. 19 ČOV České Budějovice.	77
Tab. 20 ČOV Dobříchovice.....	77
Tab. 21 ČOV Domažlice.	78
Tab. 22 ČOV Frýdek-Místek.	79
Tab. 23 ČOV Havlíčkův Brod.	79
Tab. 24 ČOV Holýšov.	79
Tab. 25 ČOV Horšovský Týn.....	80
Tab. 26 ČOV Hostivice.	80
Tab. 27 ČOV Husinec.	81
Tab. 28 ČOV Cheb.	82
Tab. 29 ČOV Ivančice.	83
Tab. 30 ČOV Karlovy Vary.	83
Tab. 31 ČOV Karviná.	84
Tab. 32 ČOV Konice.	85
Tab. 33 ČOV Litoměřice.....	85
Tab. 34 ČOV Mariánské Lázně.	86
Tab. 35 ČOV Mělník.	86
Tab. 36 ČOV Meziměstí.	87
Tab. 37 ČOV Náchod.....	87
Tab. 38 ČOV Nové Město nad Metují.....	88
Tab. 39 ČOV Nové Město nad Metují – bez Čistí.....	89
Tab. 40 ČOV Olomouc.	89
Tab. 41 ČOV Opava.....	89
Tab. 42 ČOV Ostrava.....	90
Tab. 43 ČOV Pardubice.	90
Tab. 44 ČOV Petrovice (okres Ústí n. L.).....	91
Tab. 45 ČOV Pelhřimov.....	92
Tab. 46 ČOV Písek.....	92
Tab. 47 ČOV Plzeň.....	92
Tab. 48 ÚČOV Praha (obě vodní linky - SVL i NVL).	93

Tab. 49 ČOV Prostějov.....	94
Tab. 50 ČOV Přerov.	94
Tab. 51 ČOV Roztoky.	95
Tab. 52 ČOV Slavkov u Brna.....	96
Tab. 53 ČOV Staňkov.	96
Tab. 54 ČOV Strážnice.	97
Tab. 55 ČOV Studnice.	97
Tab. 56 ČOV Tábor.....	97
Tab. 57 ČOV Tábor – Klokoty.....	98
Tab. 58 ČOV Teplice nad Metují.....	98
Tab. 59 ČOV Teplice nad Metují – Podhradí.....	98
Tab. 60 ČOV Tetčice.....	99
Tab. 61 ČOV Tišnov.....	99
Tab. 62 ČOV Uherské Hradiště´.....	100
Tab. 63 ČOV Uherský Brod.	100
Tab. 64 ČOV Uhřice.....	101
Tab. 65 ČOV Uničov.	101
Tab. 66 ČOV Ústí nad Labem.	101
Tab. 67 ČOV Velehrad.....	102
Tab. 68 ČOV Kladno (Vrapice).	102
Tab. 69 ČOV Vyškov.....	103
Tab. 70 ČOV Znojmo.....	103
Tab. 71 ČOV Židlochovice.	103
Tab. 72 ČOV Ždírec nad Doubravou.	104
Tab. 73 Určení vztahu mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a počtem pozitivně testovaných osob v závislosti na velikostní kategorii ČOV, typu odběru a variantě viru.....	117

Souhrnná zpráva projektu je rozdělena na 3 části – teoretickou, praktickou a část, obsahující „Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2“ V teoretické části je zahrnut úvod do řešené problematiky a popsán aktuální stav výzkumu, zaměřeného zejména na využití sledování koronaviru SARS-CoV-2 v odpadních vodách. Řešená problematika se od začátku epidemie covid-19 velmi intenzívně vyvíjí, věnují se jí desítky odborníků z celého světa a je stále velmi aktuální.

Druhá část souhrnné zprávy je zaměřena na praktické výsledky terénních a laboratorních činností, provedených v průběhu řešení projektu, doplněné o činnosti prováděné v rámci interních grantů v letech 2020 a 2022.

1 POPIS CÍLŮ A PLÁNOVANÝCH VÝSTUPŮ PROJEKTU

Cílem projektu bylo vytvoření strategie včasného zachycení varovného signálu nastupující epidemie v ČR a lokalizace ohnisek nákazy. Tato strategie má předpoklad být účinným nástrojem bezpečnostního systému a krizového řízení ČR pro prevenci epidemického šíření závažných onemocnění. Jejím základem je systematický monitoring komunálních odpadních vod (OV) za účelem detekce vhodných rizikových mikrobiologických agens a biomarkerů (neopterin) vylučovaných do OV.

Součástí řešení byla optimalizace a validace metody detekce rizikových mikrobiologických agens (SARS-CoV-2, virus hepatitidy A a chřipky) v OV pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR), včetně účinné primární úpravy vzorku a následné izolace nukleových kyselin.

Řešení projektu využilo jedinečných dat pilotního monitoringu výskytu SARS-CoV-2 v OV, prováděného od dubna 2020.

V projektu byly dle návrhu projektu plánovány tyto dva hlavní a dva vedlejší výsledky:

- 1) NmetS VI04000017-V3 Metodika využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování.
- 2) Vsouhrn VI04000017-V4 Souhrnná výzkumná zpráva, obsahující metodiku detekce vybraných rizikových mikrobiologických agens pomocí PCR v odpadních vodách.
- 3) Jost Článek prezentující výsledky odborné veřejnosti.
- 4) W Workshop prezentující výsledky široké veřejnosti.

Další plánované výstupy měly směřovat k publikaci a popularizaci výsledků projektu. Průběžné výsledky měly být prezentovány na odborných konferencích v závislosti na příležitostech v době trvání projektu.

1.1 Popis výstupů projektu

- NmetS VI04000017-V3 Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2.

V průběhu řešení projektu vyvstal požadavek Ministerstva zdravotnictví (MZ) na zpracování a předání „Metodického postupu analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2“. Metodika byla předána MZ 27. 10. 2021 a schválena 11. 1. 2022. Výsledek včetně doložení jeho přijetí uživatelem byl vložen do systému ISTA jako NmetS VI04000017-V3. Tím bylo splněno vytvoření výstupu NmetS.

- Vsouhrn VI04000017-V4 Souhrnná výzkumná zpráva obsahující metodický postup využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování.

Z důvodu změny vyžádané MZ a potřeby dodržení počtu plánovaných výstupů byla původně plánovaná NmetS „Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2“ zpracována jako součást plánované Vsouhrn.

- Jost VI04000017-V5 Mlejnková, H., Sovová, K., Jašíková, L., Vašíčková, P., Očenášková, V., Gharwalová, L., Fialová, A., Juranová, E.: MONITORING KORONAVIRU SARS-COV-2 V ODPADNÍCH VODÁCH V ČR PRO VYUŽITÍ V SYSTÉMU VČASNÉHO PROTIEPIDEMICKÉHO VAROVÁNÍ. SOVAK 7–8/2021, s. 34-39. ISSN 1210–3039.
- W Piekhlaková Alena; Ansorge Libor; Juranová Eva; Zvěřinová Mlejnková Hana; Vašíčková Petra; Tuček Milan: Czech - Israeli Seminar on Potential benefits and dilemmas in the development of a national viruses control system via sewage technologies for treatment of drinking water and waste water (technologies that are developed and used in Israel). Uspořádání (zorganizování) workshopu. 2022.

Dne 26. 5. 2022 se uskutečnil mezinárodní workshop ve spolupráci s MŽP, za účasti českých a izraelských partnerů, kde si odborníci z obou zúčastněných stran vyměnili zkušenosti s WBE přístupem k odpadním vodám, s monitoringem SARS-CoV-2 v odpadních vodách i s dalšími tématy spojenými s nakládáním s odpadními vodami. Workshop proběhl online prostřednictvím aplikace webex.

- ZVĚŘINOVÁ MLEJNKOVÁ, H., GHARWALOVÁ, L., SOVOVÁ, K., VAŠÍČKOVÁ, P., HRDÝ, J., KRÁSNA, M., OČENÁŠKOVÁ, V., BENCKO, V., TUČEK, M., BUŠOVÁ, M. a JURANOVÁ, E. Využití monitoringu viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách z ČOV různých kategorií pro sledování vývoje epidemické situace v ČR. Vodohospodářské technicko-ekonomické informace, 2022, roč. 64, č. 2, str. 4–9. ISSN 0322-8916
- Vzhledem k důležitosti dané problematiky vzniklo mnoho dalších výstupů projektu, které zcela nebo částečně využívaly výsledky vytvořené v projektu. Část výsledků vznikla v rámci řešení dílčích grantů financovaných z institucionální podpory MŽP:

„Monitoring SARS-CoV-2 v odpadních vodách“ 05-12/2020

„Kontinuální sledování přítomnosti SARS-CoV-2 v odpadních vodách“ 04-12/2022

Výčet všech odborných článků, přednášek a dalších popularizačních aktivit, které vznikly v souvislosti s projektem je uveden v **Příloze P9**.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Monitoring odpadních vod jako nástroj včasného varování

Epidemiologický přístup k odpadním vodám (WBE – wastewater based epidemiology) je interdisciplinární aktivita sdružující odborníky z příslušných vědních oblastí, kteří se zajímají o aplikaci a vývoj používání kvantitativního měření lidských biomarkerů v odpadních vodách (OV) za účelem hodnocení životního stylu, zdraví a expozice populace nejruznějším látkám. Tento přístup je aktuálně využíván nejen ve Výzkumném ústavu vodohospodářském T. G. Masaryka, v. v. i. (Očenášková, 2018), ale i jinde ve světě (Gracia-lor, 2017) například pro monitoring spotřeby nezákonných návykových a dalších látek v populaci.

Epidemiologický přístup se využívá také při predikci potenciálního šíření infekcí, a to detekcí výskytu infekčních agens v odpadních vodách. Lze použít pro sledování virů, bakterií, parazitů, markerů infekčních onemocnění apod.

2.2 Koronaviry

Koronaviry jsou známé jako původci infekcí zvířat (ptáků a savců) od 30. let 20. století, kdy byly prokázány jako původci akutního respiračního onemocnění kuřat. Genom koronavirů je zakódován v jednořetězcové RNA s pozitivní polaritou dosahující velikosti 30 tisíc bází, což je nejvíce mezi známými RNA viry s nesegmentovaným genomem. Od 60. let 20. století jsou tyto viry známy i u člověka jako

původci infekcí dýchacího ústrojí a pravděpodobně i trávicího traktu, u zvířat způsobují systémová onemocnění, včetně střevních. Přenos infekce je primárně vzdušnou cestou, tj. inhalací kapének nebo aerosolů, které vznikají zejména při kašli a kýchní infikovaných osob, a rovněž kontaminovanými předměty. Nalezeny byly také ve stolici (Greenwood, 1999; Přecechtěl, 1988).

V roce 2002 byl v Číně identifikován koronavirus SARS-CoV, který způsoboval těžký akutní respirační syndrom (SARS = Severe Acute Respiratory Syndrome). Virus byl identifikován až po několika měsících, čímž došlo k jeho rozšíření do 29 zemí světa na všech kontinentech. Během dvou let se nakazilo 8 tisíc lidí a téměř 10 % z nich zemřelo. Již několik let se žádný nový případ nevyskytl, proto nebyla ani odzkoušena vyvinutá vakcína. Předpokládá se, že virus byl přenesen na člověka z netopýra a aktivním mezipřevodcem byli drobní savci, např. cibetky (Chan, 2013; MZČR, 2020; SZÚ, 2020). U tohoto viru byla zkoumána distribuce v těle zemřelých a byl nalezen v mnoha orgánech, včetně střevního traktu, což potvrdilo předpoklad, že může být vylučován i močí, výkaly nebo potem (Ding, 2004).

Další zoonózu koronavirového původu, která po přenosu na člověka způsobila akutní respirační onemocnění MERS (tj. Middle East Respiratory Syndrome), způsobil virus MERS-CoV, poprvé prokázáný v roce 2012 u osob, které přicestovaly z Arabského poloostrova. Nákaza proběhla v několika vlnách a postihla 2 500 lidí, z nichž jí podlehl přes 850 osob (34 %). Pravděpodobným zdrojem byli infikovaní velbloudi (WHO, 2020).

Nový virus SARS-CoV-2 se rozšířil z Číny na konci roku 2019 postupně do více než 200 zemí. Ke konci října 2022 bylo prokázáno 627 milionu případů, z toho cca 6,5 milionu zemřelých (1 %), (WHO, 2022), v ČR u 4,56 mil., z toho 41 900 zemřelých (0,9 %), (Komenda a kol., online). Při přenosu tohoto koronaviru z původního hostitele, kterým byli patrně netopýři, hrál roli některý mezipřevodce, pravděpodobně drobní savci luskouni (Corman, 2020). Virus se extrémně rychle šířil díky jeho pozdním symptomatickým projevům (Chin, 2020).

2.3 Viry v odpadních vodách

Viry se v odpadních vodách vyskytují běžně, často jsou v nich perzistentní. Z vod jsou známy původci klinicky významných onemocnění: *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* (noroviry), *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*, *Matonaviridae*, *Papillomaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* a *Togaviridae*.

Nejčastější jsou noroviry, které způsobují epidemickou akutní virovou gastroenteritidu, dále adenoviry, vyvolávající onemocnění trávicího a respiračního traktu, záněty (např. nachlazení, horečku, bolest v krku, průjem, zvracení či zčervenání očí). Ve vodách lze najít také Influenza virus (*Orthomyxoviridae*), který je hrozbou pandemického šíření chřipky. Problém šíření chřipky nespočívá prioritně v závažnosti onemocnění a vysoké úmrtnosti, ale v celospolečenském významu důsledku velmi vysoké nemocnosti a pracovní neschopnosti s rychlým nástupem nemoci, nicméně chřipka je stále závažným onemocněním s významnou úmrtností. Dalším významným virem z vodního prostředí je virus hepatitidy A (HAV; *Picornaviridae*). Je odolný k zevnímu prostředí, šíří se fekálně-orální cestou, zejména přímým kontaktem s infikovanou osobou, případně kontaminovanými potravinami a vodou. Inkubační doba je 14 - 28 dní, infekce často probíhá bez příznaků, virus je vylučován stolicí už před objevením klinických příznaků. Pro onemocnění stačí nízká infekční dávka, cca 10 – 50 virových částic.

Nejaktuálnější jsou koronaviry, které jsou přednostně vylučovány respiračními sekrety, genové segmenty však byly prokázány také ve stolici infikovaných osob (Wang, 2020; Miri, 2020; Zhang, 2020; Lo, 2020; Tian, 2020; Hindson, 2020; Yeo, 2020). Vylučování viru stolicí bylo zjištěno u cca 50 % nakažených, střevo může být dalším cílovým orgánem viru, pomocí buněčných kultur byla prokázána možnost pomnožení virů v buňkách trávicího traktu. Byly popsány i gastrointestinální příznaky jako bolesti břicha, zvracení, často i průjem (u cca 2 až 50 % nakažených), (Xiao, 2020; Medema, 2020). Genové segmenty SARS-CoV-2 byly detekovány i ve stolici osob, včetně dětí, vykazujících pouze mírné nebo žádné příznaky onemocnění, a to i dlouho po jejich odeznění a negativním vyšetření respiračních sekretů (Xu, 2020; Cao, 2020). RNA SARS-CoV-2 byla detekována v nemocniční vodě 15 dní

a v komunálních čistírnách odpadních vod (ČOV) 19 dní po ukončení epidemie, přičemž RNA SARS-CoV-2 lze ve vodě prokázat za >14 dní, zvláště při nízkých teplotách (Yang, 2022).

Kontaminace odpadních vod je tedy možná respiračními sekrety, fekáliemi a močí infikovaných osob nebo jimi kontaminovanými předměty (vlhčené ubrousky, pleny apod.).

Prvotní výzkumy přítomnosti viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách byly provedeny v Nizozemí. Metodou RT-qPCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí) byly nalezeny specifické genové sekvence RNA, které prokázaly přítomnost genomu viru SARS-CoV-2 v surových odpadních vodách na nátoku na ČOV, dokonce již před prvním prokázaným klinickým průkazem u pacientů. Naopak byly popsány PCR nálezy ve stolici měsíce po negativním výsledku z dýchacích cest (slizniční mRNA), (Neurath, 2021).

Použitou metodou však nelze určit životaschopnost a virulenci viru ve vodním prostředí (Medema, 2020; KWR, 2020). Vzhledem k malé stabilitě koronavirů, pravděpodobné deaktivaci technologickými procesy na ČOV, nepříznivými fyzikálně-chemickými podmínkami prostředí a dobou zdržení lze v čistěných komunálních odpadních vodách předpokládat přítomnost pouze virových částic, nikoliv viabilních virů.

Je zřejmé, že s počtem infikovaných jedinců v monitorované populaci narůstá i množství vyloučených virů do odpadní vody. Ve stolici bylo zjištěno $5-10^7$ kopií/ml v závislosti na průběhu infekce, v kanalizaci dojde k naředění a do ČOV se dostává 2/100 ml – 3/1 ml kopií podle úrovně epidemie (Foladori, 2020).

Prostřednictvím jejich detekce v odpadních vodách je možné poskytnout jedinečné epidemiologické informace o výskytu SARS-CoV-2 v populaci (přítomnost, absence, trendy – nárůst, stagnace, úbytek) (Hart, 2020). Při správně nastaveném systému monitoringu odpadních vod bude možné sledovat nástup a vývoj počtu virových onemocnění v dalších obdobích, nebo monitoring využít jako nástroj včasného varování pro nastavení systému účinného dohledu nad šířením nákazy.

Z pohledu rizikovosti odpadních vod je nutné si uvědomit, že se v nich mohou vyskytovat vodou mnohem snadněji (fekálně orální cestou) přenosné patogenní mikroorganismy - noroviry, adenoviry, rotaviry, virus hepatitidy A a E, parazitičtí prvoci, patogenní bakterie, např. *Campylobacter*, *Escherichia coli*, včetně vysoce rizikových patogenů se získanou rezistencí na antibiotika, aj. (Cacace, 2019). Od roku 2011 se v EU zdvojnásobil počet infekcí, které mají souvislost s kontaminovanou vodou. Jedná se zejména o viry se zvýšenou odolností ve vnějším prostředí (mezi něž však koronaviry nepatří), (Vašíčková, 2020).

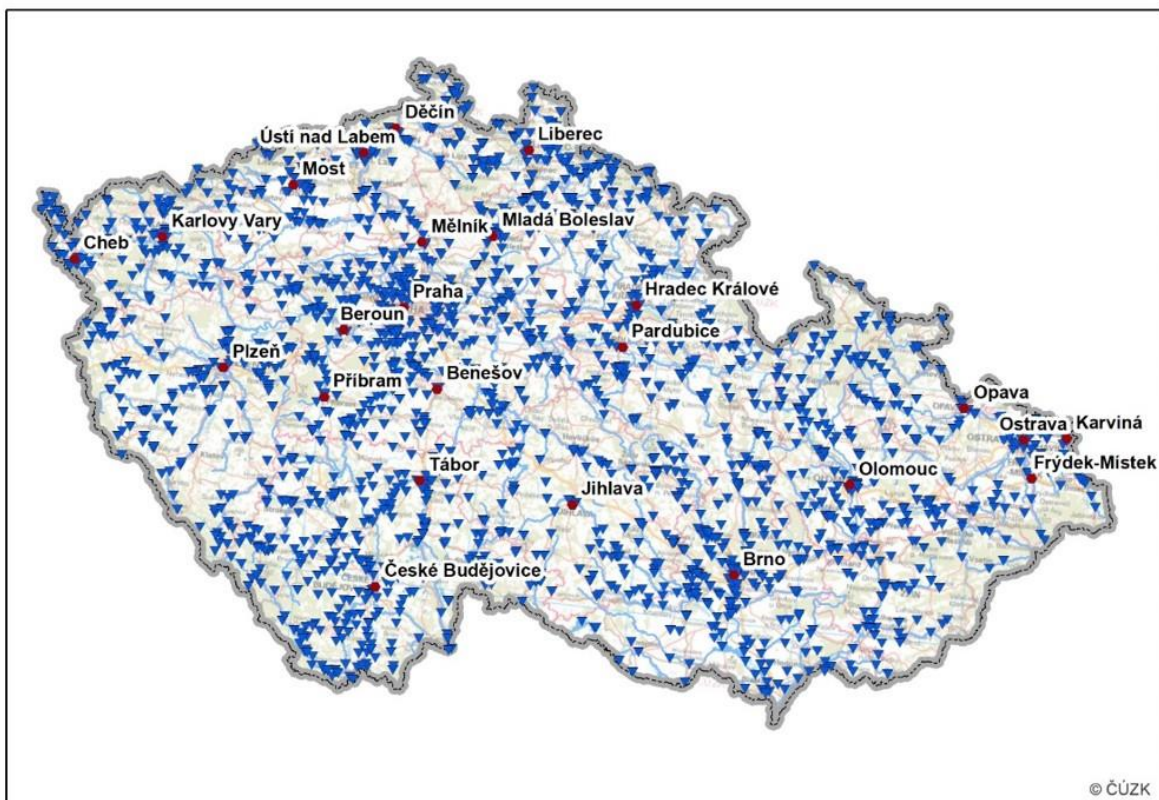
2.4 Sít ČOV v ČR

V České republice je vybudována velmi hustá síť ČOV. Podle evidence MZE ČR jich bylo v roce 2021 celkem 3 345, viz. **obr. 1**. Podle dat z Českého statistického úřadu (Údaje o vodovodech a kanalizacích v roce 2021 podle krajů) bylo v roce 2021 na území ČR napojeno na kanalizaci 87,4 % obyvatelstva, což činí 9,174 milionů obyvatel ČR. Z tohoto počtu je naprostá většina obyvatel (8,887 milionu) napojena na mechanicko-biologické ČOV. Takto vysoký podíl napojených obyvatel na kanalizaci představuje velmi dobrý potenciál pro zavedení systematického monitoringu odpadních vod. Podle počtu napojených obyvatel v ČR na ČOV by monitoringem ČOV (Praha, Brno, Ostrava, Plzeň, české Budějovice) o velikosti nad 100 000 napojených obyvatel bylo podchyceno více než 26 % obyvatel.

Kromě reálného počtu napojených obyvatel se často používá kategorizace podle počtu ekvivalentních obyvatel (EO). Ekvivalentní obyvatel představuje normovou produkci odpadní vody o objemu 150 l/den a produkci znečištění 60 g BSK₅/den.

Většina území ČR je napojena na jednotnou kanalizaci, která na ČOV přivádí jak splaškovou, tak srážkovou vodu. V tomto případě se při srážkové činnosti na ČOV dostávají splaškové vody naředěné

o vody srážkové. Ve chvíli, kdy jsou na území obce srážky silné, odchází odlehčovými stokami do recipientu společně se srážkovými vodami i část splaškových vod. Tak je tomu i v případě námi sledovaného výběru ČOV, na nichž byl prováděn monitoring SARS-CoV-2 v OV. Z celkových 64 ČOV je na výhradně oddílnou kanalizaci napojeno pouze šest obcí (Černošice, Dobřichovice, Hostivice, Karlovy Vary, Tábor a Teplice nad Metují). Délka kanalizační sítě souvisí s velikostí a množstvím napojených obcí – nejdelší je v Praze (3 706 km) poté v Brně (1 146 km) a postupně se s velikostí obcí snižuje. Většina OV, která je kanalizací přiváděna na vybrané ČOV je dle vodní bilance, kterou spravuje oddělení HEIS VÚV TGM, voda splašková – tedy voda z domácností a sociálních zařízení. Průmyslová OV je přiváděna v menší míře. Některé průmyslové podniky mají svou vlastní ČOV a do veřejné kanalizace buď OV nevypouští, nebo provádí předčištění, tak aby byla do veřejné kanalizace vypouštěna voda o stanovené kvalitě (dáno místně příslušným kanalizačním řádem). Do veřejné kanalizace vypouští průmyslové podniky i vodu splaškovou – z administrativních budov a jídelen, ve které se také může vyskytovat SARS-CoV-2.



Obr. 1 Síť ČOV v ČR.

2.5 Zkušenosti z monitoringu SARS-CoV-2 a jiných biomarkerů v odpadních vodách

Problematika SARS-CoV-2 v OV se od roku 2020 řeší v mnoha zemích světa, vzhledem k závažnosti problému bylo publikováno velké množství odborných článků (Ahmed, 2020; Wu, 2020) a díky celosvětovému rozsahu vznikla řada mezinárodních platform. Neaktivnější jsou:

- "Wastewater-Based Epidemiology for covid-19" (<https://www.protocols.io/groups/2019ncov-wastewater-epidemiology>), sloužící především pro výměnu poznatků s metodami detekce.
- HERA (Health Emergency Preparedness and Response Authority) https://ec.europa.eu/info/departments/health-emergency-preparedness-and-response-authority_en. HERA je klíčovým pilířem Evropské zdravotnické unie, která zaplní mezeru v reakci

a připravenosti EU na mimořádné události v oblasti zdraví. HERA, vytvořená v důsledku pandemie covid-19, bude předvídat hrozby a potenciální zdravotní krize prostřednictvím shromažďování zpravodajských informací a budování potřebných zodpovědných kapacit.

- EU4US-DEEP „EU Sewage Sentinel System for SARS-CoV-2“ (<https://wastewater-observatory.jrc.ec.europa.eu/#/dashboards/national>) je platforma digitální evropské výměny výsledků sledování odpadních vod pro SARS-CoV-2 a jeho varianty, postavená na faktu, že se monitorování odpadních vod ukázalo jako užitečný, doplňkový a nezávislý, objektivní přístup ke strategiím sledování a testování covid-19.

Po zveřejnění doporučení EK ze dne 17. března 2021 o společném přístupu k zavedení systematického dozoru nad SARS-CoV-2 a jeho variantami v odpadních vodách v EU nabyly dozorové činnosti v oblasti odpadních vod v Evropě významnou dynamiku a vytvořily panevropské společenství postupů sdružené v rámci systému EU pro hlídání odpadních vod pro SARS-CoV-2 (EU4S).

EU4US-DEEP se zaměřuje na tyto aktivity:

- shromažďování a sdílení osvědčených postupů z členských států i mimo ně;
- shromažďování výsledků z činností dozoru nad odpadními vodami;
- zveřejňování a pravidelná aktualizace metod vzorkování a analýzy;
- vytvoření dobrovolného seznamu odborníků zapojených do dozoru nad odpadními vodami a prevence a kontroly nemocí přenášených odpadními vodami;
- organizování prostředí pro spolupráci, podpora interkalibrace přístupů a sdílení osvědčených postupů.
- v budoucnu se počítá s širším dohledem přesahujícím oblast veřejného zdraví, zejména s cílem informovat o výsledcích monitorování v odpadních vodách nově vznikajících znečišťujících látek, patogenů, farmak, mikroplastů, spotřeby antimikrobiálních látek, mikrobiální rezistence vůči antibiotikům, aj.

Na webových stránkách <https://wastewater-observatory.jrc.ec.europa.eu/#/dashboards/national> jsou soustředěny odkazy na webové stránky evropských zemí, kde je prováděn monitoring odpadních vod. V **tab. 1** je uveden výčet vybraných odkazů na webové stránky s informacemi o monitoringu SARS-CoV-2 v odpadních vodách.

Tab. 1 Webové stránky monitoringu SARS-CoV-2 v odpadních vodách.

Rakousko	https://abwassermonitoring.at/
Kypr	https://covid-pulse.cy/
Finsko	https://www.thl.fi/episeuranta/jatevesi/jatevesiseuranta_viikkoraportti.html
Maďarsko	https://www.nnk.gov.hu/index.php/koronavirus/szennyvizvizsgalatok
Irsko	https://www.hpsc.ie/a-z/respiratory/coronavirus/novelcoronavirus/surveillance/wastewatersurveillanceprogramme/
Nizozemsko	https://www.rivm.nl/rioolwateronderzoek/covid-19; https://coronadashboard.government.nl/
Skotsko	https://informatics.sepa.org.uk/RNAmonitoring/
Španělsko	https://miteco.maps.arcgis.com/apps/dashboards/a8c1f281dfc445169a78178b70774a62
Turecko	https://covid19.tarimorman.gov.tr/Home/Index
UK	https://www.gov.uk/government/collections/monthly-statistics-for-the-environmental-monitoring-for-health-protection-emhp-wastewater-program-england
Slovensko	https://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=273
Belgie	https://datastudio.google.com/embed/u/0/reporting/c14a5cfc-cab7-4812-848c-0369173148ab/page/p_ggbfgsqtmc
Lucembursko	https://www.list.lu/en/covid-19/coronastep/
Slovinsko	https://covid-19.sledilnik.org/en/stats
Lotyšsko	https://bior.lv/lv/par-mums/jaunumi/notekudenu-monitorings-covid-19-izplatibas-noteiksana
Itálie	https://www.epicentro.iss.it/en/coronavirus/sars-cov-2-dashboard
Norsko	https://www.fhi.no/hn/statistikk/overvaking-av-sars-cov-2-i-avlopsvann/resultater-fra-avlopsovervakingen/
Kanada	https://rsc-src.ca/en/covid-19-policy-briefing/wastewater-surveillance-for-sars-cov-2-rna-in-canada
ČR - VŠCHT	https://tvp.vscht.cz/veda-a-vyzkum/projekty/ARGTech/covid
ČR - VÚV	http://covmon.vuv.cz; https://www.vuv.cz/virus-covid19-v-odpadnich-vodach/otematu-23/

Společné evropské aktivity do roku 2021 jsou shrnuty ve zprávě Joint Research Center (Gawlik *et al*, 2021): <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC125065>.

Z provedených aktivit vyplynulo, že schopnost detekovat SARS-CoV-2 v odpadních vodách je možný způsob jak lépe porozumět jeho přibližné celkové přítomnosti v populaci, pokud je kombinována s monitorováním vhodných indikátorů. Zpráva popisuje rychlou spolupráci s účastníky ze sektoru akademické sféry, vodního hospodářství a veřejného zdraví. Údaje z testování odpadních vod nemohou nahradit stávající systémy sledování covid-19, ale doplnit je tím, že poskytují:

- sběrný vzorek celé komunity od jedinců se symptomatickou nebo asymptomatickou infekcí,
- informace o průběhu změn probíhající infekce v komunitě napojené na konkrétní kanalizaci,
- informace pro komunity, kde je včasné klinické testování nedostatečně využíváno nebo není k dispozici,
- včasné varování před návratem infekce v Evropě i mimo ni,

- informace pro včasnou detekci jiných onemocnění, jako je obrna,
- při správné frekvenci testování mohou být hlavním ukazatelem změn v zátěži covid-19 v komunitě.

Některé výzkumy ukazují, že je RNA viru v odpadních vodách detekovatelná dříve, než je prokázána klinickými testy. Tato možnost predikce se jeví jako spíše využitelná při sledování menších lokalit s pravidelným režimem a přesně definovanými obyvateli jako jsou školy, obytné rezidence, nemocnice, pracoviště, aj. (Islam, 2022).

Hrudey & Conant (2022) shrnuli 16 publikací, které tvrdily, že poskytují včasnou detekci RNA SARS-CoV-2 na ČOV ještě předtím, než byly hlášeny klinické případy, ale pouze publikace z Ottawy (D'Aoust *et al.* 2021a) uvedla dostatečnou frekvenci odběru vzorků k prokázání autentického včasného varovného signálu z odpadních vod (primárních kalů) téměř v reálném čase před potvrzenými klinickými případy.

Významným prvkem při analýzách odpadních vod je kvantifikace signálu ze vzorku odpadní vody. Vzhledem k charakteru této matrice a souvisejícímu množství ovlivňujících faktorů (jako jsou různé úrovně degradace virové RNA a přítomnosti inhibitorů reakce RT-qPCR, odlišnosti v době a míře vylučování SARS-CoV-2 stolicí), je tento krok velmi složitý. K získání údaje, který by mohl být použit k přepočtu signálu z odpadní vody na počet infikovaných osob, je třeba použít údaje z klinického testování v konkrétní hodnocené lokalitě. Tyto údaje jsou zatíženy velkou chybou, danou subjektivním přístupem k testování, a to jak občanů, tak orgánů zavádějících opatření. Ke kalibraci přepočtu je nutná dlouhá časová řada zahrnující různé fáze epidemie a sledování odpadních vod, včetně počáteční fáze s minimem pozitivních případů.

Kanadská studie (Connie, 2022) prováděná v provincii s nejvyšším počtem testů za prvních 14 měsíců epidemie posoudila citlivost detekce RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách v lokalitách s velikostí populace v rozmezí od 13 451 do 1 115 021 obyvatel. S využitím Probit analýzy zjistili, že k dosažení pozitivní detekce RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách ve městě Banff (13 451 obyvatel, nejmenší studovaná komunita) bylo zapotřebí pouze dvou nových případů. K dosažení stejné úrovně pozitivní detekce v Edmontonu a Calgary (největší komunity v provincii s přibližně 1 milionem obyvatel) bylo zapotřebí přibližně 67–77 nových případů. Celkově bylo pro RNA SARS-CoV-2 zapotřebí minimálně 4–17 (medián 8), 9–43 (medián 18) a 17–97 (medián 38) denně hlášených nových případů covid-19 na 100 000 obyvatel pro hladiny pravděpodobnosti 50 %, 80 % a 99 %.

V Kanadě byl v srpnu 2022 ve zprávě o politice Královské společnosti Kanady vydán expertní panel pro monitoring odpadních vod (Hrudey, 2022), jehož součástí byla tato zásadní doporučení:

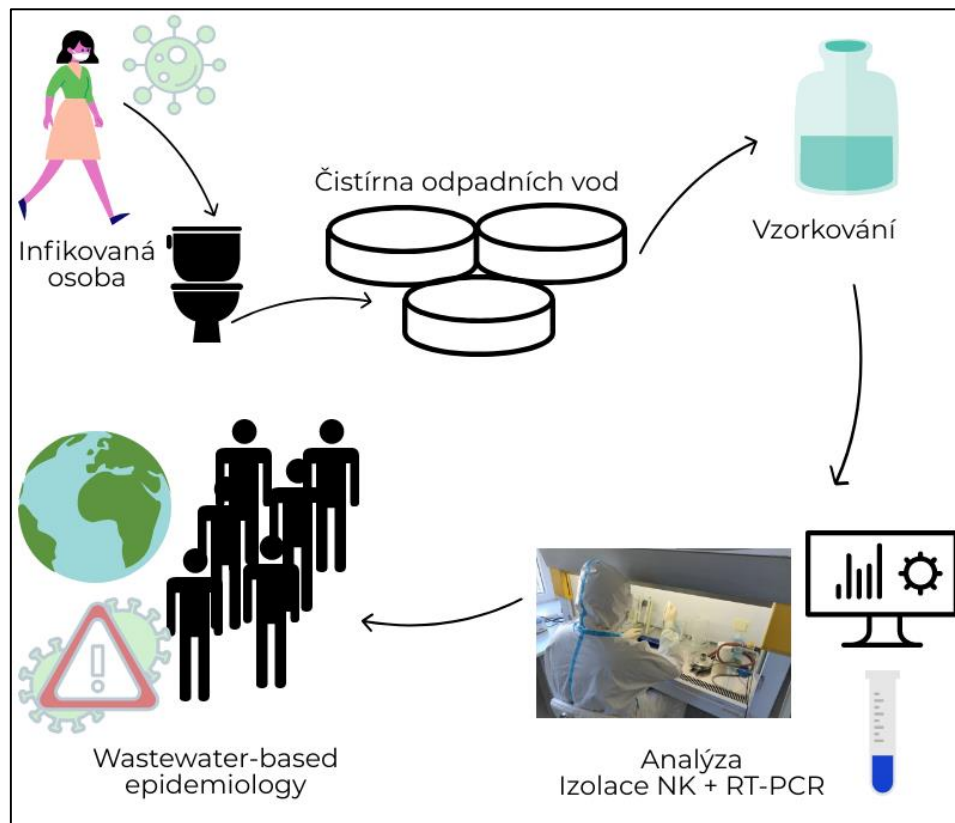
1. shromáždit užitečné poznatky z monitoringu odpadních vod na SARS-CoV-2;
2. vytvořit struktury a kapacity pro udržení schopností a vývoj rychlých reakcí na budoucí ohrožení veřejného zdraví;
3. vyvinout rámce pro návrh programu monitoringu;
4. vytvořit rámce pro interpretaci výsledků programu monitoringu;
5. udržovat a podporovat akademická partnerství a komunikační sítě, které pomohou identifikovat nové příležitosti a hrozby;
6. stavět na stávající infrastruktuře a programech.

Tato doporučení jsou zvláště důležitá pro plánování a rozvoj příslušné politiky veřejného zdraví. Poskytují také užitečné vodítko pro budoucí výzkum a provádění účinného a včasného dozoru nad odpadními vodami. Konečným cílem je chránit populaci před infekčními chorobami a dalšími faktory životního prostředí.

Ve Spojeném království podnítily důkazy, že jedinečné monitorování dynamiky viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě může být použito pro ochranu veřejného zdraví, rozvoj národních programů

monitoringu odpadních vod. Kromě covid-19 může poskytnout další informace o řadě biologických a chemických markerů lidského zdraví. Jsou diskutovány zdroje nejistoty ovlivňující kvalitu měření a interpretaci dat pro rozhodování v oblasti veřejného zdraví (Wade, 2022).

2.6 Epidemiologie založená na odpadních vodách



Obr. 2 Schéma epidemiologického přístupu k odpadním vodám.

WBE viz. **obr. 2** byla teoreticky popsána v roce 2001 a následně zavedena v roce 2005 za účelem sledování kokainu a dalších nedovolených látek (drog) a oseltamiviru (Tamiflu) během pandemie chřipky v roce 2009. Tento přístup vychází z předpokladu, že jakoukoli látku, která je vylučována lidmi a je stabilní v odpadní vodě, lze použít ke zpětnému výpočtu původní koncentrace vylučované obsluhovanou populací.

Stejný koncept lze převést na dohled nad viry; na rozdíl od jiných mikroorganismů, jako jsou bakterie, neboť viry nerostou mimo hostitelské buňky. Z tohoto důvodu mohou být detekovány lidské viry v odpadních vodách, vylučované příslušnou lidskou populací, které přetrvávají dostatečně dlouho (2-4 dny). Sledování časových změn v koncentracích a diverzitě virů ve vzorcích komunálních odpadních vod může být využito nejen k určení skutečného rozsahu infekce v populaci, ale také k výskytu nových virových kmenů a jejich výskyt v populaci může sloužit včasnému odhalení nových ohnisek virových nákaz. Užitečnost a potenciál systému monitoringu odpadních vod byl prokázán již dříve, např. během celosvětového programu eradikace dětské obrny kdy byl využíván jako nástroj pro hodnocení cirkulace obrny v populaci a hodnocení účinnosti imunizace proti jejímu původci (polioviru). Byl také použit při retrospektivní předpovědi propuknutí infekčních zánětů jater (hepatitidou) typu A či gastroenteritid (noroviry).

Metody WBE však dosud nebyly použity k hodnocení a předvídání ohnisek virových onemocnění systematickým způsobem. Předpoklad byl, že WBE by mohla vyřešit určitá omezení stávajících systémů dozoru, která byla zdůrazněna během pandemie covid-19, resp. předchozích, jako byla pandemie chřipky A v roce 2009. Konkrétně citlivost a specifická přístupů syndromové surveillance do značné míry závisí na hlášení a závažnosti klinických příznaků v souvislosti s existujícími onemocněními v populaci.

V případě SARS-CoV-2 významná část nemocných je buď asymptomatická, presymptomatická nebo má mírné, nespecifické příznaky, a proto není hlášena, což vede ke značnému podhodnocení rizika infekce. V řadě případů studií byla míra asymptomatické infekce odhadnuta na přibližně 20-45 %. Zatímco dohled založený na hospitalizacích je vzhledem k aktuální prevalenci onemocnění v populaci pravděpodobně specifitější, odhady infekce v populaci založené na hospitalizacích představují zpoždění v řádu dnů až týdnů mezi infekcí a přijetím. Kromě toho významná část pacientů přijatých do nemocnice zemře. Teoreticky představuje individuální odběr vzorků a testování nejpřesnější odhad aktivního přenosu a prevalence onemocnění, nicméně prostorový a časový rozsah testování, kterého je nutno dosáhnout pro získání detailních informací je omezeně praktický a ekonomicky náročný pro většinu zemí. Je nutné počítat s opakovaným testováním, aby se zajistila účinná kontrola výskytu onemocnění.

Biologické informace, které obsahují odpadní vody, mohou být použity jako objektivní systém dohledu a odraz komunitního zdraví. Lidské viry v odpadních vodách jsou ze své podstaty biologickými markery jejich vlastní cirkulace v populaci díky jejich DNA nebo RNA. Jejich detekce v přítocích z ČOV vod může indikovat lidské zdroje nálezů v populaci téměř v celém světě v reálném čase. WBE je škálovatelná a nákladově efektivní i v zemích s nízkými zdroji a poskytuje rychlé výsledky a může monitorovat širokou škálu zdrojů nově se objevujících a znovu se objevujících virových onemocnění a/nebo importovaných onemocnění.

Přechod na centralizované odpadní vody odváděné na ČOV ve většině městských center (kde se SARS-CoV-2 vyskytuje) znamená, že virovou zátěž od jednotek (v malých sídlech) až stovek (ve velkých městech) infikovaných osob lze zachytit v jediném vzorku, což usnadňuje analýzu tohoto množství.

Viry, které nejsou obecně spojeny s fekálně-orálním přenosem u člověka, jsou považovány za náchylnější k inaktivaci kvůli poškození labilního lipidového obalu, což vede ke ztrátě infekčnosti ve vodním prostředí. Ovšem ne všechny obalené viry rychle ztrácejí svou infekčnost. Některé obalené viry, jako je SARS-CoV, MERS-CoV a nyní SARS-CoV-2, které se obvykle považují za respirační viry, lze detekovat také ve vodách. WBE přístup tak může přispět i pro sledování možného šíření infekce vodním prostředím. Přítomnost virových nukleových kyselin ve stolici a odpadních vodách naznačuje, že koncept WBE může být použit na širokou škálu virů.

WBE nabízí změnu paradigmatu v oblasti dohledu nad infekčními nemocemi. Viabilita virů není pro provádění WBE kritická, je však zásadní pro vyhodnocení rizika, zda vzorek představuje reálné riziko pro lidské zdraví nebo pro potenciální zvířecí rezervoáry.

Mnoho faktorů může ovlivnit přítomnost virů ve stolici, včetně viremie, a to i v případě, že se viry vylučují z těla. Na rozdíl od fekálního vylučování, ke kterému dochází v cca 50 % klinicky diagnostikovaných infekcí, je popsáno, že rozšíření SARS-CoV-2 do močových cest je mnohem méně časté (<5 % potvrzených infekcí), (Peng *et al.*, 2020). Doba trvání a míra vylučování viru u asymptomatických případů však stále zůstává velmi nejistá. V případě pandemie budou koncentrace v odpadních vodách záviset na počtu nakažených osob v komunitě a rychlosti šíření infekce.

Vedle metod přímé detekce přítomnosti virů v odpadních vodách průkazem virové RNA, případně DNA podle původce příslušné virové infekce, je možné pro predikci nástupu zhoršující se epidemiologické situace využívat markerových molekul, které mohou signalizovat zvyšující se virovou nálož příslušné skupiny obyvatel v určité zájmové lokalitě.

Přítomnosti markerových molekul v tělních tekutinách (krev, moč a jiné) se s výhodou využívá pro sledování nástupu a průběhu různých infekčních onemocnění virového nebo bakteriálního původu. Pro identifikaci zvyšujícího se počtu případů vzrůstá význam přítomnosti i nepřímých markerů v odpadní vodě, prokazujících výskyt a rozsah infekce v populaci.

Jedním z možných a použitelných markerů vylučovaných močí u infekčních pacientů je neopterin. Jedná se o derivát pteridinu vyskytující se v lidském organismu po stimulaci imunitního systému přítomností virového nebo jiného infekčního agens. Je produkován makrofágy po stimulaci interferonem- γ ze skupiny cytokinů, které mají významnou úlohu při antivirové imunitní odpovědi organismu. Jedná se o stabilní látku s výskytem v tělních tekutinách (krev, moč, likvor, plodová voda aj.), která je močí vylučována z těla. Koncentrace neopterinu v organismu stoupá v raných stádiích onemocnění, což je významné pro účely sledování zátěže populace virovou infekcí a brzkého záchytu nástupu zhoršující se epidemiologické situace. Analytické stanovení neopterinu je možné zavedenými metodami HPLC po předchozí úpravě vzorku odpadní vody. Zvláště důležitá je analýza neopterinu v situaci, kdy nejsou k dispozici možnosti laboratorní detekce virové RNA (případně DNA) metodou PCR. Zvyšující se koncentrace neopterinu v odpadní vodě stejně jako údaje o výskytu RNA tak může být významným zdrojem včasné informace signalizující zhoršující se epidemiologickou situaci, případně nástup epidemické vlny a vhodným nástrojem WBE.

Stanovení korelací a komparací mezi naměřenými koncentracemi virů v odpadních vodách a hlášenými klinickými případy onemocnění nebo rozšířením v populaci je konečným cílem WBE. Tyto korelace mohou sloužit jako validace pro predikční model, který zohledňuje výše uvedené faktory, a poskytnout tak důkaz pro názor, že změny koncentrace virů v odpadních vodách budou indikovat změny ve výskytu onemocnění v lidské populaci.

Důležitým krokem při aplikaci WBE je odhad populace přispívající ke vzorkům odpadních vod. Lidská nukleová kyselina má velký potenciál působit jako populační biomarker díky své stabilitě a stálému vylučování z organismu. WBE neshromažďuje údaje o jednotlivcích, takže a priori není z etických hledisek problémová. Přesto by etické pokyny měly být vhodně přizpůsobeny různým sociálním, ekonomickým a epidemiologickým okolnostem. V tomto smyslu je třeba věnovat pozornost při hlášení nemocí a omezit nesprávnou interpretaci publikačních zjištění v médiích.

2.7 Významná opatření v průběhu epidemie covid-19 v ČR

Průběh epidemie covid-19 v České republice od 1. března 2020 (první případ) do konce roku 2021 je popsán ve sděleních Tuček, M., 2021 a Tuček, M a Vaněček, V. 2022. V průběhu epidemie v ČR byla v reakci na nepříznivou epidemiologickou situaci vládou průběžně vyhlášována v souladu s ústavním zákonem řada opatření, cílená na snížení rizika přenosu nemoci covid-19 a nepříznivých důsledků rozvoje epidemie. Mezi tato opatření patřilo mj. vyhlášení nouzového stavu s různým režimem, omezení pohybu, uzavření škol a restaurací, regulace cestování a vstupu osob na území ČR ze zahraničí, možné odložení pracovně-lékařských preventivních prohlídek, povinnosti nosit roušku, přidělování nemocničních lůžek, povinnost testování, povinnost očkování a dalších. Vládní opatření byla často velmi nedůsledná, prostoupená četnými výjimkami (průmysl versus služby) a častými nelogickými změnami, což výrazně přispělo k odmítání omezení v době komunitního šíření nákazy.

Zhoršení epidemiologické situace od podzimních měsíců roku 2020 vedlo k nárůstu počtu případů až do března 2021. V jarních a letních měsících roku 2021 následoval pokles počtu případů s opětovným nárůstem od října 2021. Průběh epidemie byl modifikován řadou vlivů, včetně biologické variability agens, doporučení a omezení na různých úrovních rozhodování, očkování a individuálního chování.

Pravděpodobnost přenosu infekčního agens je modifikována jeho dávkou, klimatickými podmínkami, pobytem v interiéru, větráním, zavedením nebo uvolněním omezení, přítomností na pracovišti nebo venku, používáním dopravního prostředku a dalšími faktory, které je obtížné předvídat. K šíření infekce

mezi osobami dochází respirační cestou kapénky, které vznikají při kašli, kýchní nebo mluvení infikované osoby, a virus se může přenášet jako aerosol na značnou vzdálenost prouděním vzduchu.

V době pandemie covid-19 hraje poskytování přístupu k údajům (řádně optimalizovaným z hlediska ochrany osobních údajů) zásadní roli při poskytování informací široké veřejnosti a médiím. V České republice byly první tři případy nákazy novým koronavirem potvrzeny 1. 3. 2020. Společným úsilím státních orgánů a výzkumníků vznikl unikátní tým, který kombinuje metodické znalosti reálných procesů s know-how potřebným pro efektivní zpracování, analýzu a online vizualizaci dat. V rámci projektu byla vytvořena databáze COVID-COVID, která je určena pro všechny uživatele, kteří se nacházejí na území ČR. Webový přehled aktuálního rozšíření covid-19 v ČR byl vytvořen jako online platforma poskytující soubor výstupů v podobě tabulek, grafů a map určených široké veřejnosti.

Online interaktivní přehled o aktuálním šíření covid-19 v České republice byl spuštěn 11. 3. 2020 a okamžitě se stal hlavním komunikačním kanálem využívaným zdravotnickým sektorem k prezentaci aktuální situace týkající se epidemie covid-19. Hlavním cílem webového portálu bylo zveřejnit přehlednou vizualizaci a jasné vysvětlení základních informací, které se skládají z celkových počtů provedených testů, potvrzených případů covid-19, úmrtí v souvislosti s covid-19, denních a kumulativních přehledů osob s pozitivním případem covid-19, místa a země nákazy osob s pozitivním případem covid-19, hospitalizací pacientů s covid-19 a distribuce osobních ochranných prostředků. Toto komplexní zpravodajství o epidemii covid-19 v ČR ukazovalo efektivní způsob propojení znalostí různých odborníků, např. regionální a národní metodici (kteří denně hlásí pozitivní případy onemocnění), se znalostmi, kterými disponují tvůrci centrálních registrů, analytici, vývojáři webových aplikací a vedoucí pracovníci ve zdravotnictví.

Uvádíme stručný výčet událostí, doprovázejících epidemii covidu-19 v ČR, které by mohly mít vliv na výskyt koronavirové RNA v odpadních vodách. Nejvýznamnějším vlivem pro WBE přístup byly změny v provádění testů (PCR/antigenních), jejichž výsledky byly vkládány do systému ISIN (Integrovaný systém infekčních nemocí), ze kterého byla čerpána data pro vyhodnocení souvislostí a korelací množství RNA SARS-CoV-2 v OV s počty pozitivních testů.

Lock down I

Březen – květen 2020: uzavření škol (11. 3. 2020), vyhlášení nouzového stavu (12. 3. 2020), s nímž souvisela řada mimořádných opatření, zejména omezení volného pohybu. 14. 3. 2020 zakázán provoz restaurací a obchodů, 16. 3. 2020 uzavřeny státní hranice. 19. 3. 2020 vyhlášena povinnost si mimo bytliště zakrývat ústa a nos. V průběhu května byla opatření postupně rušena.

Lock down II

Říjen – listopad 2020: další omezení s podzimní vlnou zvyšujícího se počtu pozitivně testovaných osob. Od 10. 9. 2020 - povinnost nosit roušky ve vnitřních prostorách. Od konce září byla postupně omezována výuka na všech typech škol. Od 5. 10. 2020 - nouzový stav na dobu 30 dnů; postupné omezování otvírací doby provozoven stravovacích služeb, společenských a kulturních akcí. Na konci října bylo doplněno omezením volného pohybu. Od 18. 11. 2020 bylo možné nakupovat v omezeném počtu lidí. Do škol se postupně začali vracet žáci a studenti. Nouzový stav prodloužen do 23. prosince, otevřeny jen potraviny, lékárny a drogerie. Od 16. 12. 2020 měli účastníci veřejného zdravotního pojištění možnost nechat se na vybraných místech a ordinacích zdarma otestovat antigenními testy na nákazu virem SARS-CoV-2. 30. 12. 2020 - rekordní podíl pozitivních případů na počet testů = 52 %. K 15. 1. 2021 bylo v ČR oficiálně evidováno 874 605 nakažených a 14 029 úmrtí. Celkový počet nakažených však nezahrnoval pacienty, kteří se nepodrobili testování a kumulativní incidence onemocnění byla podle různých odhadů 1,5 až 3 milionů. 15. 1. 2021 byl spuštěn registrační a rezervační web pro očkování. Prodloužení nouzového stavu do 28. 2. 2021. 25. 2. 2021 - na veřejnosti a v uzavřených prostorech povinnost nosit respirátor třídy FFP2.

Lock down III

Únor – květen 2021: 26. 2. 2021 vyhlášen tvrdý lockdown - omezení pohybu v rámci okresu trvalého bydliště, uzavření všech škol (1. 3. 2021), uzavření dosud otevřených maloobchodů, povinné testování ve firmách s více než 50 zaměstnanci. 15. 3. 2021 - povinné testování ve firmách s více než deseti zaměstnanci. Od 12. 4. 2021 - rozvolnění části opatření (postupně školy, obchody), skončil nouzový stav, otevřít mohla kadeřnictví, masáže a další kosmetické služby – povinnost potvrzení o negativním testu. Od 17. 5. 2021 - postupné otevírání restaurací, mnoho aktivit omezeno nutností negativního testu nebo potvrzení o očkování. 31. 5. 2021 - otevřeny vnitřní prostory restaurací a dalších provozoven, jejich návštěva byla podmíněna negativním testem, potvrzením o očkování či proděláním nemoci.

Březen 2021 - bylo zavedeno plošné testování české populace pomocí antigenních testů. Od 1. 7. 2021 skončila povinnost mít zakrytá ústa a nos venku. Zároveň také plošně skončila povinnost testování ve firmách a na školách. 9. 7. 2021 přestala stačit jedna dávka vakcíny k prokázání bezinfekčnosti. Od stejného data také začala platit povinnost testování při návratu do České republiky ze všech zemí. Od 1. 9. 2021 - žáci se musí ve dnech prvního, šestého a devátého září testovat. Od 30. 9. 2021 se žáci jedné třídy nemusí prokazovat negativním testem. Od 25. 10. 2021 - povinnost nosit respirátory na hromadných akcích a na pracovištích a zkrácení karantény po kontaktu s nakaženou osobou na sedm dní v případě, že bude mít negativní PCR test. 27. 10. 2021 skončila povinnost samoizolace po návratu ze zahraničí. Dne 1. 11. 2021 přestaly zdravotní pojišťovny proplácet preventivní testy. Výjimka pro lidi do 18 let a zdravotní rizika, zároveň se zkrátila platnost testů – PCR test platí tři dny, antigenní test 24 hodin. Kontrola bezinfekčnosti hostů. Od 22. 11. 2021 přestaly platit jako potvrzení o bezinfekčnosti antigenní i PCR testy, při návštěvě restaurací či hromadných akcí se musí lidé prokázat očkovaním či prodělanou nemocí. Také se začalo znovu plošně testovat ve firmách a ve školách. 27. 11. 2021 - vyhlášení nouzového stavu na 30 dní. Omezení provozu restaurací, kulturních a sportovních akcí – prokázání se certifikátem o očkování či proděláním covidu-19.

Dne 27. 11. 2021 - první případ nákazy mutací omikron v Česku. 10. 1. 2022 se zkrátila doba pro karanténu na pět dní.

Od 17. 1. 2022 – povinné testování ve firmách dvakrát týdně testovat, žáci a učitelé ve školách pouze jednou týdně, nově se to týká i očkovaných a lidí, kteří covid prodělali. 10. 2. 2022 zrušena povinnost prokazovat se certifikátem o ukončeném očkování nebo proděláním covidu-19 v posledních 180 dnech v restauracích, službách či na hromadných akcích. Dne 19. 2. 2022 - prodloužena doba izolace z pěti na sedm dní, ale člověk po kontaktu s pozitivně testovaným není poslán do karantény. Dne 1. 3. 2022 - přestalo platit omezení stanovující maximální počet účastníků hromadných akcí. Od stejného data mají všichni občané nárok na jeden hrazený PCR test měsíčně. 14. 3. 2022 - přestala platit povinnost nošení respirátoru ve většině vnitřních prostorů.

Uvedené informace ukazují, že v průběhu epidemie se velmi často a nekvantifikovatelně měnily možnosti a povinnosti testování, které významně ovlivňovaly epidemiologické údaje o počtech pozitivně testovaných osob. Tato fakta se promítla do datových sad počtů pozitivně testovaných osob, která byla použita pro vyhodnocení a ovlivnila korelace těchto počtů s výsledky z OV.

2.8 Interpretace výsledků WBE přístupu

Detekce RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách, která slouží, jako potenciál včasného varování, byla zpočátku postavena na binárním hodnocení (pozitivní/negativní). V dalším období rozvoje epidemie vyvstala potřeba vyššího rozlišení signálu, aby bylo možné v průběhu času při dostatečné vzorkovací frekvenci sledovat nárůsty a poklesy, nezbytné ke sledování trendů.

Kvalita výsledků je závislá na skupině faktorů, které ovlivňují výsledek stanovení:

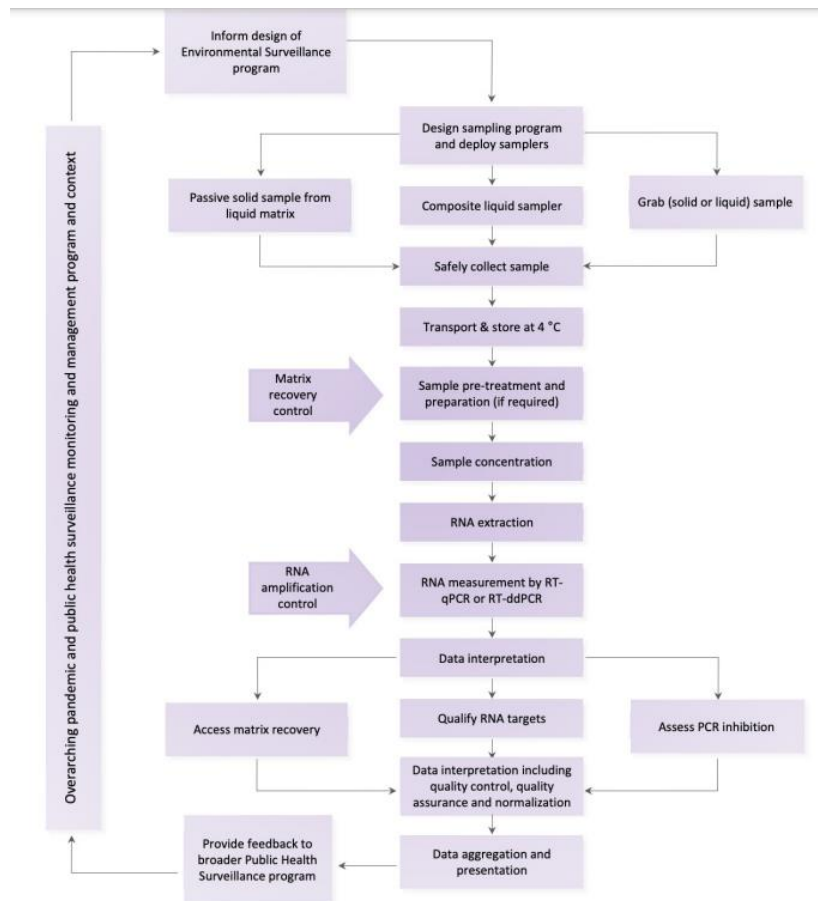
- 1) aktuální množství odpadní vody přitékající na ČOV – naředění virové RNA ve vzorku vodou bez SARS-CoV-2 naruší možnost sledovat kvantitativní trendy ve vylučování SARS-CoV-2. Normalizace výsledků je možná pomocí robustních fekálních indikátorů, např. *Escherichia coli*, *Bacteriodes HF183* (fekální bakterie u všech lidí), crAssphage (virový fág infikující *Bacteriodes* a nalezený v 50 % velké sady vzorků lidské stolice), virus mírné skvrnitosti pepře (PMMoV, jeden z nejhojnějších RNA virů přítomných v lidské stolici), kofein, aj.
- 2) aktuální složení odváděných odpadních vod na ČOV (podíl srážkových vod, průmyslových odpadních vod a komunálních odpadních vod) – faktor naředění a změna charakteru/chemického složení vzorku. Dřívější studie o dopadech srážkové vody na patogeny v kanalizaci ukázaly, jak významně mohou být ovlivněny (Tolouei *et al.* 2019a,b).
- 3) reprezentativnost, homogenita a dostatečný objem odebraného vzorku,
- 4) časový režim odběru vzorků (rozdíly v rámci pracovních dnů/víkendu),
- 5) četnost odběru vzorků (min. 1krát/2x týdně).
- 6) délka a větvení kanalizační sítě - degradace RNA před přítokem na ČOV, včetně vlivu teploty vody v kanalizaci,
- 7) variabilita mezi metodami a laboratořemi - dozorová činnost pro monitorování trendů v daném místě by měla být prováděna jednou laboratoří za použití jedné metody (Chik *et al.* 2021; Griffiths *et al.* 2021; Pecson *et al.* kol. 2021). Vhodné sdílení metod a postupů pro identifikaci neobvyklých výsledků.
- 8) podmínky uchovávání vzorků - skladování by mělo být konzistentní a měly by být zjištěny jakékoli účinky skladování,

Vliv na interpretaci výsledků má další skupina faktorů:

- 1) robustnost epidemiologických dat - vliv na korelaci obou skupin údajů
 - a) aktuální epidemický režim - určuje množství osob, které jsou testovány, tj. četnost a způsob testování,
 - b) mobilita osob vylučování do kanalizace na jiném místě, než je hlášen výsledek PCR
 - c) správnost výsledků testů,
 - d) přesné přiřazení klinických případů pro stejnou populaci, jakou obsluhuje monitorovaná ČOV (Medema a kol., 2020a)
- 2) nedostatečně prozkoumaný údaj o podílu osob vylučujících viry trávicím nebo vylučovacím systémem a příspěvku od bezpříznakových jedinců.
- 3) vhodné statistické metody – např. jednoduché techniky vyhlazování dat, jako je výpočet klouzavých průměrů ke složitějším vyhlazovacím algoritmům (Arabzadeh *et al.*, 2021; Ai *et al.*, 2021), s normalizací i bez normalizace pro úpravu variability nebo určení, zda je či není pozorovaný trend v daném segmentu statisticky významný (Pileggi, 2022).

Novější přehledy toho, čeho lze a nelze dosáhnout sledováním RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách jsou uvedeny v těchto publikacích: Buonerba *et al.* 2021, Hruđey & Conant 2022 a Shah *et al.* 2022.

V současné době převládá názor, že není k dispozici žádné zdůvodnění ani silné empirické důkazy, které by sloužily jako základ pro převod koncentrace genetických ekvivalentů v odpadních vodách na počet nakažených osob ve sledované populaci. Signál v odpadních vodách je však velmi cennou informací pro sledování trendů množství aktivních případů ve sledované populaci, viz. **obr. 2**.



Obr. 3 Typical Workflow for Wastewater Surveillance, after WHO (2022).

2.9 Mutace a varianty SARS-CoV-2

Při replikaci viru SARS-CoV-2 v hostitelských buňkách dochází ke vzniku mutací, při kterých mohou vzniknout nové varianty viru. Varianty jsou klasifikovány na základě jejich potenciálního nebo známého rizika pro veřejné zdraví. Nové vlastnosti viru mohou ovlivnit průběh epidemie, např. schopností snadnějšího přenosu v komunitách, zvýšenou patogenitou nebo schopností ubránit se imunitě. Včasné objevení a popis nových variant může umožnit snížení rizik pro veřejné zdraví. Sledování variant lze úspěšně provádět v odpadních vodách. Nové mutace mohou také snížit citlivost současných detekčních metod.

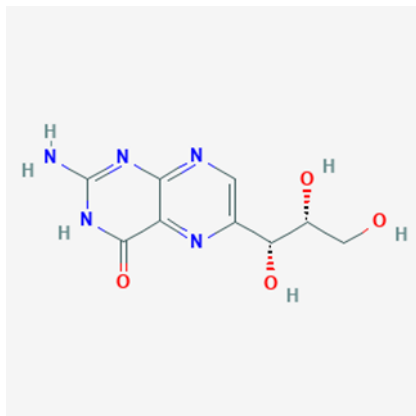
Sledování výskytu variant v populaci je možné provádět jak z klinických vzorků, tak prostřednictvím odpadních vod. V obou případech se používá RT-qPCR a genomové sekvenování. Sekvenování může zkoumat nezávisle přítomnost více mutací. Mutace lze sledovat i z archivovaných vzorků. V mnoha zemích je sledování variant v odpadních vodách součástí monitorovacích programů odpadních vod.

2.10 Charakteristika neopterinu jako epidemiologického biomarkeru

Pteriny jsou cyklické organické sloučeniny, které se v relativně vysokých koncentracích nacházejí pouze jako pigmenty u hmyzu, obojživelníků, plazů a ryb. Podílejí na celé řadě chemických reakcí v živých organismech včetně člověka, a to především na biologických oxidacích. U člověka byly pteriny nejdříve nalezeny v moči díky snadné dostupnosti výchozího materiálu a poměrně vysoké koncentraci, stejně

jako u pigmentů, a tím k relativně snadnějšímu stanovení. Jedná se zejména o xanthopterin, biopterin a neopterin (Tomandl 1999).

Neopterin, viz. **obr. 4** byl poprvé objeven ve včelích larvách, ve včelách dělnicích a v mateřích kašičce. Tento název měl naznačit možný začátek nové epochy ve výzkumu pteridinů (Hamerlink 1999).



Obr. 4 Neopterin (zdroj [PubChem](#)).

Zatím není zcela objasněno, zda vyšší koncentrace neopterinu v lidských buňkách a tělních tekutinách plní nějakou vlastní funkci nebo pouze indukuje částečnou degeneraci biosyntetické cesty. Nicméně, neopterin a jeho redukováná forma se podílejí u člověka na modulaci cytotoxicity reaktivních forem kyslíku a chloru a nezávisle na kyslíkových radikálech vyvolávají apoptózu buněk. Lidské monocyty/makrofágy produkují zvýšené množství neopterinu po stimulaci cytokinem interferonem- γ . Proto měření koncentrací neopterinu v tělesných tekutinách, jako je sérum, mozkomíšní mok nebo moč, poskytuje informace o buněčné imunitní aktivaci odvozené od T-lymfocytů (Murr 2002).

Zvýšená koncentrace neopterinu v tělních tekutinách se objevuje u pacientů s virovou infekcí, např. HIV (Fuchs 1988, Wirleitner 2004), některými typy bakteriálních infekcí (*M. tuberculosis*, Fuchs 1984), parazitálních infekcí (*Plasmodium*, Picot 1993), s autoimunitním onemocněním (revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus) nebo u pacientů se zhoubným nádorovým onemocněním (Fuchs 2008). Koncentrace obvykle koreluje s rozsahem a aktivitou nemoci. Neopterin v mozkomíšním moku představuje biomarker neurozánětlivých onemocnění (Molero-Luis 2020).

Detekce hladiny neopterinu může sloužit také k monitorování průběhu léčby. Koncentrace neopterinu patří k nejlepším prediktorům budoucího průběhu onemocnění. Monitorování koncentrace neopterinu rovněž umožňuje včasné odhalení reakce štěpu proti hostiteli u transplantovaných pacientů (Mueller 2002).

Covid-19 patří mezi zánětlivá onemocnění, a tudíž bylo možné předpokládat, že i při této nové chorobě dojde ke zvyšování hladiny neopterinu v tělních tekutinách včetně moči. Uvedená hypotéza se potvrdila, jak ukazuje celá řada publikací s touto tematikou, která byla prezentována v letech 2020 – 2022.

Za slibný marker pro včasnou predikci závažnosti průběhu nemoci covid-19 pokládá neopterin Hailemichael (2021), stejně jako Rasmi (2022). Identickou hypotézu vyslovili i Ozger (2020), Bellman-Weiler (2020), Chauvin (2021) a Karacaer (2022). Klinickými hodnotami neopterinu u pacientů s covid-19 se zabývá Fuchs (2021). Za nezávislý prognostický faktor závažnosti průběhu nemoci covid-19 pokládá neopterin také Al-kuraishy (2021), který rovněž zmiňuje, že zvýšená hladina neopterinu se začíná objevovat třetí den po infikování pacienta virem SARS-Cov2. Porovnáním hladin neopterinu a dalších zánětlivých markerů u pacientů infikovaných a neinfikovaných virem SARS-Cov2 s zabývá Hara (2022).

Protože epidemiologie odpadních vod vychází z premisy, že ke komunální odpadní vodě můžeme přistupovat jako k velmi zředěnému vzorku moči, rozhodli jsme se ověřit možnost analýzy neopterinu v odpadní vodě a zjistit, zda se jeho množství mění v závislosti na počtu infikovaných osob či výskytu SARS-CoV-2 v komunální odpadní vodě. V kladném případě by bylo tento biomarker možno použít např. také jako pomocný indikátor včasného varování před nástupem nové vlny nemoci přesto, že se jedná o nespecifický indikátor, který je organismem vylučován i při dalších zánětlivých onemocněních.

Při zpracování rešerše k dané problematice nebyla nalezena žádná publikace, která by se zabývala stanovením neopterinu v odpadních vodách. Proto byl vývoj metody založen na metodách analýzy neopterinu v tělních tekutinách, zejména v moči a plazmě.

Ve studii *Determination of six pterins in urine by LC-MS/MS* (Allegri 2012) byla analýza prováděna metodou HPLC s hmotnostní detekcí na kapalinovém chromatografu SCIEX 5500 Q-trap s trojitým kvadrupólem. Měření probíhalo v negativním módu. Jako interní standard zde byl použit 6,7-dimethylpterin a jako mobilní fáze 0,1% vodný a methanolový roztok kyseliny mravenčí.

Ve druhé studii *Determination of neopterin and biopterin by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in rat and human plasma, cell extracts and tissue homogenates* (Schmidt 2006) byla analýza provedena metodou LC-MS/MS za použití kapalinového chromatografu Applied Biosystems 4000 Q-trap s trojitým kvadrupólem, stejně jako v předchozím případě v negativním módu. Jako interní standard byl použit rhamnopterin a jako mobilní fáze 0,002% vodný a methanolový roztok kyseliny mravenčí.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Vývoj a využití metodiky PCR pro detekci RNA SARS-CoV-2 a dalších virů v odpadních vodách

3.1.1 Optimalizace metody RT-qPCR pro stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách

V rámci analýz vzorků odpadních vod, které předcházely řešení projektu, byl použit postup zavedený a plně akreditovaný v laboratořích výzkumné skupiny Virologie potravin a prostředí ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. Brno. K přímé flokulaci bylo použito 500±50 ml odpadní vody. V tomto objemu vzorku bylo upraveno pH na hodnotu, při které dochází k maximální flokulaci hovězího extraktu, tj. v rozmezí hodnot pH 3,5-3±0,1 přidávkem 1N HCl. Následně bylo ke vzorku přidáno 10 ml hovězího extraktu (pH 3,5-3±0,1), vzorek byl umístěn do nádoby s ledem na horizontální kruhovou třepačku a třepán po dobu cca 12 hod. Druhý den byly vzorky odstředěny při 7000×g/30 min/4 °C. K získanému supernatantu bylo přidáno 8 ml fosfátového pufru (±0,2 ml) a supernatant byl v tomto roztoku resuspendován. Izolace RNA ze vzorků byla prováděna soupravou NucliSens Magnetic Extraction Reagents s použitím lyzačního pufru NucliSens easyMAG Lysis Buffer (BioMérieux) dle návodu výrobce. Ke stanovení možné přítomnosti genomu SARS-CoV-2 byla použita komerčně dostupná souprava EliGene COVID19 Basic A RT (Elizabeth Pharmacon).

Jak je z výše popsaného patrné, jedná se o metodicky náročný postup, u kterého hrozí, obzvláště při zpracování většího množství vzorků, ke křížovým kontaminacím již při úvodní úpravě, pokud není náležitě dodržena dekontaminace pH metru. Mimo jiné k validní extrakci RNA bylo nutno použít speciální stojánek s magnety doporučený výrobcem izolační soupravy (fa BioMérieux) a komerční souprava EliGene COVID19 Basic A RT (Elizabeth Pharmacon) neumožňující kvantifikaci prokázaného viru (resp. jeho genomových ekvivalentů). Proto byl v rámci řešení projektu kladen důraz na vývoj, zavedení a validaci postupově i přístrojově méně náročné metodiky, která by zároveň umožnila kvantifikaci prokázaných virů (resp. jejich genomových ekvivalentů). Z tohoto důvodu byly primárně provedeny experimenty, jejichž cílem byl výběr vhodnější metodiky. Na základě dat dostupných ze současné literatury byly porovnány různé postupy sloužící k analýze odpadních vod. K tomuto účelu

byly použity vzorky odpadních vod, které byly uměle kontaminovány virovou suspenzí o definované koncentraci:

- virus transmisivní gastroenteritidy prasat (TGEV), který je společně se SARS-CoV-2 klasifikován do čeledi *Caliciviridae*, existuje zde předpoklad jejich podobných strukturálních vlastností a pro člověka je nepatogenní,
- *in vitro* připravené částice bakteriofága MS2 (aRNA), do jejichž genomu byla vložena zcela unikátní sekvence ve volné přírodě se nevyskytující a které mají podobné strukturální vlastnosti jako neobalené viry, jejichž genom je tvořen jen RNA (např. virus hepatitidy A, noroviry),
- bovinní herpes virus 1 (BHV-1), u kterého existuje předpoklad podobných vlastností, jako u virů jejichž genom je tvořen DNA a jsou pro člověka patogenní (např. adenoviry).
- S přihlédnutím na metodickou, časovou i finanční náročnost byl následně vybrán nejvhodnější metodický postup (precipitace polyethylenglykolem; PEG) a navržen systém detekce SARS-CoV-2, který byl validován dle doporučení uvedených v Raymaekers *et al.*, 2009. V rámci výběru byla také zohledněna možnost použití vybraného postupu ke sledování výskytu dalších virů významných z pohledu zdraví lidí (např. virus hepatitidy A, humánní adenoviry, noroviry).

Tab. 2 Výsledky experimentů, zaměřených na výběr vhodné metodiky analýzy vzorků odpadních vod.

metoda	účinnost postupu TGEV	účinnost postupu aRNA	účinnost postupu BHV-1
Přímá flokulace (hovězí extrakt)	42,64%	5,81%	11,40%
Precipitace polyethylen glykolem (PEG)	43,94%	26,94%	41,11%
Přímá flokulace (sloučeniny hliníku)	17,55%	0,83%	0,56%
Centrifugace	38,15%	5,41%	15,85%

Vybraný postup, viz. **tab. 2** zahrnuje počáteční úpravu 500 ml vzorku spočívající pouze v přidavku 40 g polyethylenglykolu a 8,8 g NaCl s následující inkubací v chladničce bez nutnosti třepání. Vzorky jsou po 12 – 16 hod inkubace odstředěny při 10 000×g/30 min/4 °C a vzniklá peleta je resuspendována ve 2 ml fosfátového pufru. Izolace nukleových kyselin je prováděna komerčně dostupnou soupravou QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), která nevyžaduje žádné speciální vybavení laboratoře.

Vzhledem ke genetické variabilitě virů, jejichž genom je tvořen RNA (SARS-CoV-2 nevyjímaje), jsou detekční cíle k průkazu SARS-CoV-2 zaměřeny na několik specifických oblastí genomu tohoto viru. K průkazu specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 metodou RT-qPCR je nově použita kombinace tří

sad specifických oligonukleotidů (primery a sonda). Podklad dvou sad těchto oligonukleotidů vychází z již publikovaných systémů (Bustin, 2020), při návrhu jejich modifikací (degenerací) byly zohledněny známé mutace tohoto viru. Další sada oligonukleotidů byla, s přihlédnutím na její vhodnost k použití k analýze vzorků prostředí, navržena *de novo*. Dvě sady specifických oligonukleotidů jsou cíleny na gen N, pozice v genomu 28 939 - 29 029 nt a 28 351 - 28 463 nt (GenBank reference NC_045512.2). Třetí sada je zaměřena na oblast kódující nestrukturální protein nsp12, pozice v genomu 14 975 - 15 071 nt (GenBank reference NC_004718.3).

K zajištění validních výsledků by měl být každý krok analýzy přísně kontrolován. Ačkoli je kontrola analytického postupu u klinických vzorků pouze doporučena, v případě sledování významných zástupců virů způsobujících alimentární onemocnění (noroviry a virus hepatitidy A) je v potravinových matricích a prostředí přesně stanovena metodami ISO 15216-1:2017 a ISO 15216-2:2019. Proto vypracovaný metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 obsahuje kontrolní body celé analýzy, které umožňují získat řádné a validní výsledky. Tyto body zahrnují:

- 1) kontrolu odběru vzorků odpadních vod, včetně jejich transportu při vhodných podmínkách (teplota a čas) do analytických laboratoří (kontrola odběru vzorku využitím stanovení indikátorů fekálního znečištění, humánních adenovirů),
- 2) kontrolu úpravy odpadních vod, tzn. zakoncentrování virových částic z definovaného objemu vzorku a následující izolaci nukleových kyselin. Tato externí kontrola analýzy umožňuje také určit účinnost celého postupu, čímž je zaručena přesnější kvantifikace SARS-CoV-2 (resp. jeho genomových ekvivalentů) ve sledovaných vzorcích (zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin s využitím umělé kontaminace vzorku, TGEV),
- 3) kontrolu vlastního průběhu detekčního a kvantifikačního kroku SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) ve sledovaných vzorcích s použitím RT-qPCR (interní amplifikační kontrola a pozitivní kontrola, RNA gradient sloužící zároveň ke kvantifikaci SARS-CoV-2 genomových ekvivalentů v definovaném objemu vzorku).

V rámci validace celého metodického postupu, viz. **tab. 3** byly stanoveny analytické meze podle Bustin *et al.*, 2009. Limit detekce (LOD) byl určen jako nejnižší koncentrace analytu, kterou lze pomocí dané metodiky detekovat s 95% mírou pravděpodobnosti. Takto byl LOD celého metodického postupu určen na 1 250 virových částic (resp. genomových ekvivalentů) v celkovém objemu 500 ml odpadní vody, tzn. 2,5 virových částic (resp. genomových ekvivalentů) v 1 ml odpadní vody. Účinnost metodického postupu byla stanovena při umělé kontaminaci vzorku odpadní vody 5 000 000 virovými částicemi (kvantifikace dle RT-qPCR) na 59,43 %.

Tab. 3 Citlivost/limit detekce (LOD), opakovatelnost a účinnost metodického postupu.

ředění	teoretické množství kopií ^a	získané množství kopií ^b		počet pozitivních vzorků /celkový počet analyzovaných vzorků	účinnost (%)
		Průměr	SD ^c		
1	5 000 000	3 555 500	2 029,66	12/12	59,43
2	500 000	307 403	2 544,28	12/12	42,64
3	50 000	29 715	304,42	12/12	35,41
4	5 000	974	21,29	12/12	19,48
5	2 500	914	62,38	12/12	36,56
6	1 250	80	47,07	12/12	6,40
7	500	-	-	4/12	-

^a Množství kopií viru, které bylo stanoveno použitím RT-qPCR.

^b Skutečné množství kopií bylo získáno podle příslušné kalibrační křivky zařazené v každém experimentu, následně byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

^c Směrodatná odchylka.

3.1.2 Mezilaboratorní porovnání metody RT-qPCR pro stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách

Metodický postup byl ověřen mezilaboratorními testy, kterých se zúčastnila laboratoř Virologie potravin a prostředí (VÚVeL) a Zkušební laboratoř Ústavu biochemie a mikrobiologie (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; VŠCHT). Vzorky určené k mezilaboratornímu porovnání byly připraveny třetí, nezávislou stranou, Laboratoří hygieny půdy a odpadů, Státní zdravotní ústav Praha, jejíž pracovníci následně provedli hodnocení výsledků kruhového testu.

Vzorky odpadních vod byly uměle kontaminovány definovaným množstvím SARS-CoV-2 a v chlazeném stavu týž den transportovány do zúčastněných laboratoří. V laboratoři VÚVeL byly uměle kontaminované vzorky analyzovány dle postupu zavedeného a validovaného v rámci řešení tohoto projektu. Ve Zkušební laboratoři Ústavu biochemie a mikrobiologie (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; VŠCHT) byly použity k analýzám vzorků jejich vlastní standardní operační postupy (SOP; Zdenkova *et al.*, 2022).

Z hodnocení kruhového testu je patrné, že výsledky analýz, které byly provedeny výše uvedenou metodikou, dosahují vyhovujícího z-skóre: $|z| \leq 2$ a poskytují podobné výsledky se SOP VŠČHT (viz Příloha P5, Zpráva k MPZ detekce SARS-CoV-2 v odpadních vodách).

V rámci projektu byly na VÚVeL vytvořeny a odzkoušeny standardní operační postupy pro další hygienicky významné viry, které se mohou vyskytovat v odpadních vodách. Postup je založen na reverzní transkripci RNA a následné detekci a případně kvantifikaci prokázaných specifických oblastí genomu virů metodou real time PCR (tzv. RT-qPCR). SOPy zahrnují interní amplifikační kontrolu (IAC) jako jednu z kontrol řádného průběhu RT-qPCR a k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice reakce.

3.1.3 Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR

Chřipka (influenza) je vysoce infekční onemocnění postihující primárně dýchací cesty. Původcem jsou viry čeledi Orthomyxoviridae, jejichž genom je tvořen osmi (typ A a B) či sedmi (typ C) segmenty RNA s negativní polaritou. Tyto segmenty jsou uloženy v kapsidě, která je obalena lipidovou membránou. Virus má dva povrchové (druhově a subtypově specifické) antigeny (glykoproteiny): hemaglutinin (H) a neuraminidázu (N); hlavní zdroje patogenity viru. Dosud bylo identifikováno 18 subtypů hemaglutininu (H1 až H18) a 11 subtypů neuraminidázy (N1 až N11). Vzájemnou skladbou těchto antigenů (nebo jejich variant) vznikají různé (i nové) genetické mutace, jež mohou vyvolat epidemii v populaci vnímavých jedinců. Rovněž také určují nebezpečnost onemocnění (nakažlivost a průběh).

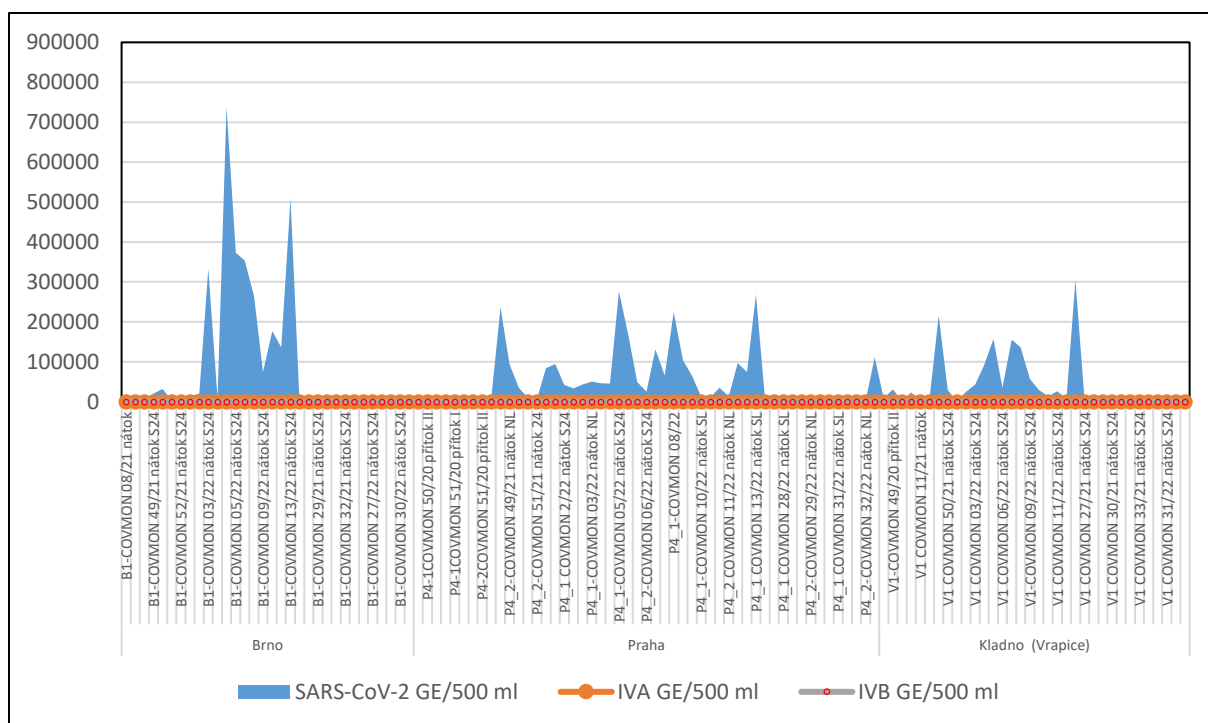
Virus chřipky A vyvolává onemocnění člověka a několika dalších živočišných druhů. Rezervoárem nových antigenních typů chřipky A jsou zejména ptáci a prasata. Viry typu A vyvolaly všechny velké epidemie a pandemie. Současné subtypy, které běžně cirkulují mezi lidmi, zahrnují: typ A (H1N1) a typ A (H3N2).

Virus chřipky typu B vyvolává onemocnění pouze u lidí, které není spojováno s pandemickým výskytem a které může probíhat i s převahou postižení gastrointestinálního traktu jako tzv. střevní chřipka.

Virus chřipky typu C vyvolává pouze sporadická onemocnění. Je patogenní jak pro člověka, tak pro zvířata, nicméně pro zvířata jen ojediněle a u člověka jsou citlivou skupinou malé děti. Průběh onemocnění je mírný, nezpůsobuje ani epidemie, ani pandemie. Nejčastěji probíhá jako tzv. nemoc z nachlazení.

Metodický postup detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR je uveden v Příloze P7.

V roce 2022 byly provedeny analýzy zamražených vzorků odpadních vod z let 2020 až 2022. Vzhledem k nedostupnosti informací o počtech hlášených případů chřipky A a B v daném období, byly pro analýzy vybrány vzorky z dlouhodobě sledovaných ČOV Brno, Praha a Kladno (Vrapice), v nichž byly provedeny analýzy na přítomnost RNA SARS-CoV-2. Bylo analyzováno 118 vzorků, v 88 % byla prokázána přítomnost RNA SARS-CoV-2, v žádném vzorku nebyly detekovány specifické oblasti genomu virů chřipky A a B, viz. **obr. 5**. Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulce T1.6 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně_all).



Obr. 5 Výskyt specifických oblastí genomu virů chřipky A a B a SARS-CoV-2 v odpadních vodách (2020-2022).

Aktivita chřipky byla v období koronavirové epidemie zcela potlačena, byl zaznamenán celoevropský pokles sentinelových detekcí o 99,8 %. V České republice v rámci sítě laboratoří spolupracujících s NRL pro chřipku a nechřipkové respirační viry nebyl v sezoně 2020-2021 zaznamenán jediný pozitivní záchyt viru chřipky. V klinických vzorcích byly velmi často zachyceny viry SARS-CoV-2, relativně často lidské rhinoviry a ojediněle RSV, enteroviry, adenoviry, a s nástupem jara i běžné koronaviry.

Virus sezónní chřipky (influenza typ A, B nebo C virus) byl do projektu zařazen jako alternativní biomarker a současně původce, pro část populace velmi nebezpečného onemocnění. Jeho detekce v odpadních vodách měla být pro tento účel odzkoušena v případě vymizení koronaviru SARS-CoV-2, neboť virová RNA původců sezónní chřipky se rovněž vyskytuje ve stolici nemocných (až 47 %) (Chan *et al.*, 2011; Longo, 2012).

Monitoring chřipky typu A v odpadní vodě, prováděný v roce 2022 v Ottawě (Mercier, E. – zdroj Twitter) ukazuje velmi dobrý záchyt genomových kopií s maximy v jarních a podzimních měsících. Monitoring spolehlivě zachycuje také lidský respirační syncytiální virus (RSV, angl. Human respiratory syncytial virus), který způsobuje u lidí závažná respirační onemocnění. Patří mezi RNA obalené viry do čeledi Paramyxoviridae, podčeledě Pneumovirinae, rod Pneumovirus. Infekce se vyskytuje celosvětově a postihuje zejména kojence a malé děti.

Systematické sledování výskytu specifických oblastí genomu virů chřipky A a B, příp. RSV v odpadních vodách by mohla být velmi dobrým nástrojem pro epidemiologický dohled výskytu a šíření nemoci.

3.1.4 Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR

Virus hepatitidy A (HAV) je původcem celosvětově rozšířeného onemocnění, infekčního zánětu jater - hepatitidy A. Výskyt infekce vyvolané HAV se mezi zeměmi značně liší, přičemž zvýšená incidence onemocnění je zaznamenána v rozvojových zemích zejména v souvislosti s nedostatečnými hygienickými podmínkami. Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) je tento virus řazen mezi patogeny způsobující alimentární infekce. Jedná se o neobalený virus, jehož genom je tvořen

jedním řetězcem RNA o pozitivní polaritě. Hlavní způsob přenosu HAV je fekálně-orální přenos. Ačkoli k nejčastějšímu šíření infekčních virových částic dochází přímým kontaktem infikovaných osob (klinicky nemocných či asymptomatických přenašečů), kontaminované povrchy různých zařízení (např. kliky, splachovadla toalet, povrchy potravinářských zařízení a nástrojů), potraviny a voda hrají velmi významnou roli v přenosu HAV. Zdrojem kontaminací/infekcí jsou lidé již v inkubační době onemocnění (15 – 50 dní). HAV je přítomen ve stolici už dva týdny před prvními klinickými příznaky a ve stolici může být vylučován více jak týden po ukončení onemocnění. Virus byl také prokázán ve slinách, sekretu z nosohltanu a krvi infikovaných osob, což z těchto tělních tekutin činí také možný zdroj kontaminací (Newell *et al.*, 2010).

Standardní operační postup je cílen na kvalitativní detekci RNA (resp. genomových ekvivalentů) viru hepatitidy A (HAV). Postup je založen na reverzní transkripci RNA a následné detekci a případně kvantifikaci prokázaných dvou specifických oblastí genomu virů metodou real time PCR (tzv. RT-qPCR), čímž je zvýšena pravděpodobnost záchytu viru. Specifické oligonukleotidy (primery a sondy) cílené na první konzervativní oblast genomu HAV jsou použity dle ISO 15216-1:2017. Druhou cílovou oblastí genomu HAV je konzervativní oblast v rozmezí 346 až 481 nt; primery a sonda byly navrženy dle publikace Jothikumar *et al.* 2005 s drobnými modifikacemi. SOP zahrnuje interní amplifikační kontrolu (IAC) jako jednu z kontrol řádného průběhu RT-qPCR a k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice reakce.

V roce 2022 byly provedeny analýzy zamražených vzorků odpadních vod z let 2020 až 2022, které byly vybrány na základě informací o počtech všech hlášených případů akutní hepatitidy A (kód MKN B15) z registru ISIN za období 1. 1. 2020 – 14. 7. 2022.

Je známo, že virus je z těla nakaženého vylučován již zhruba 14 dní před datem prvního příznaku a vylučování přetrvává 2 až 4 týdny po začátku příznaků. V souboru je uvedeno datum prvního příznaku, které by mělo být rozhodující pro analýzu. Ze vzorků, odebraných na 66 lokalitách ČOV byla vybrána místa s pozitivním záchytem hlášených případů v obcích napojených na sledované ČOV v datu prvního příznaku a v intervalu cca 1-2 týdny před a po. V ČR bylo ve sledované době hlášeno celkově pouze 443 případů onemocnění. V období od 5. 10. 2020 do 1. 3. 2022 probíhala epidemie většího rozsahu na území Jihočeského kraje, nejvyšší počet byl hlášen z okresu České Budějovice. Na ČOV České Budějovice byly odebrány pouze 2 vzorky ve 48. týdnu 2020, kdy bylo hlášeno cca 8 případů, které byly hospitalizovány. Do souboru byly zařazeny vzorky z Brna a Prahy, kde se rovněž ve větší míře vyskytovaly osoby s nákazou virem hepatitidy A.

Na **obr. 6** je znázorněn výskyt virů HAV, NoV GI a NoV GII ve vzorcích vybraných dle informací o výskytu VHA v populaci ČR ve sledovaném období. Ve 121 vzorcích nebyla prokázána přítomnost RNA HAV. Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulce T1.7 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně_all).

HAV byl do projektu zařazen jako alternativní biomarker a současně původce velmi nebezpečného onemocnění. Jeho detekce v odpadních vodách měla být pro tento účel odzkoušena v případě vymizení koronaviru SARS-CoV-2, neboť je velmi odolný k zevnímu prostředí a šíří se fekálně-orální cestou.

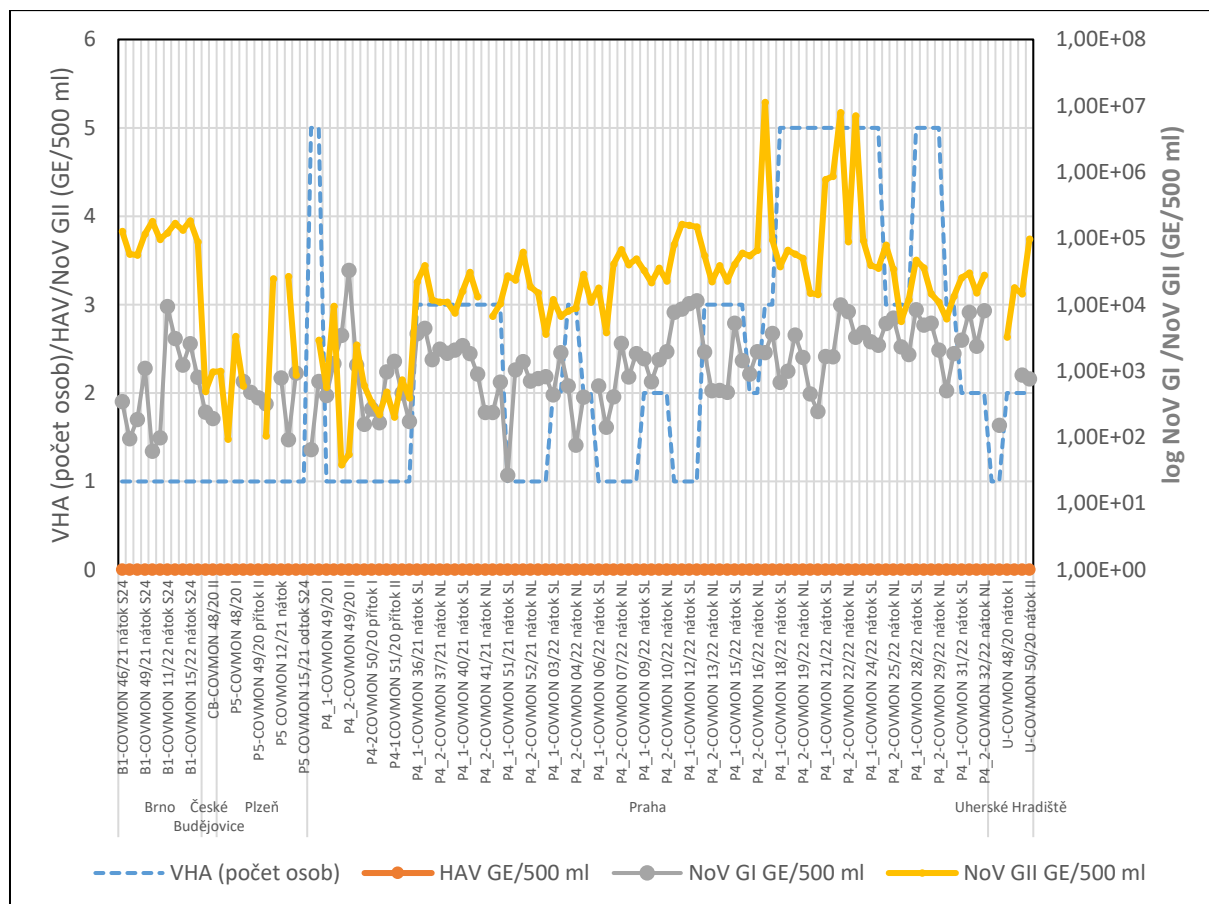
Z předchozích studií autorů jsou známy případy epidemiologických souvislostí šíření HAV v Libereckém a Moravskoslezském kraji.

Systematické sledování výskytu specifických oblastí genomu viru HAV v odpadních vodách by mohla být velmi dobrým nástrojem pro epidemiologický dohled výskytu a šíření nemoci.

3.1.5 Detekce specifických oblastí genomu norovirů NoV GI a NoV GII

Do odpadních vod se dále může dostávat široké spektrum původců dalších onemocnění, nejčastěji se jedná o viry z rodu *Norovirus* (NoV), méně časté jsou adenoviry (AdV, čeleď *Adenoviridae*), další zástupci z čeledí *Picornaviridae*, *Reoviridae* (rotaviry, RV) a *Astroviridae* (AstV), (Miagostovich *et al.* 2008).

Ve vzorcích vybraných pro detekci viru hepatitidy A byla rovněž stanovena přítomnost norovirů NoV GI a NoV GII. Tyto viry jsou méně stabilní než HAV. NoV GII se šíří hlavně přímým kontaktem, NoV GI se více zapojují do epidemií spojených s kontaminovanými potravinami, mají vyšší stabilitu ve vodním prostředí a v populaci jsou daleko méně rozšířeny než NoV GII.



Obr. 6 Výskyt specifických oblastí genomu virů HAV, NoV GI a NoV GII v odpadních vodách (2020-2022).

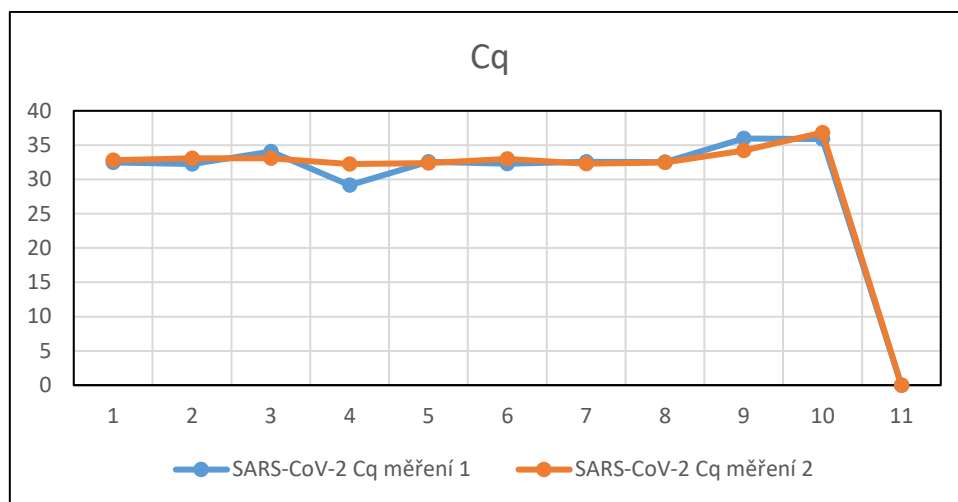
Přítomnost RNA HAV nebyla prokázána v žádném ze 121 analyzovaných vzorků, zatímco výskyt NoV GI a NoV GII byl poměrně značný. Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulce T1.7 v Příloze 2T1 (Výsledky_tabelárně).

3.1.6 Vyhodnocení duplicitních vzorků a definice nejistoty stanovení RNA SARS-CoV-2

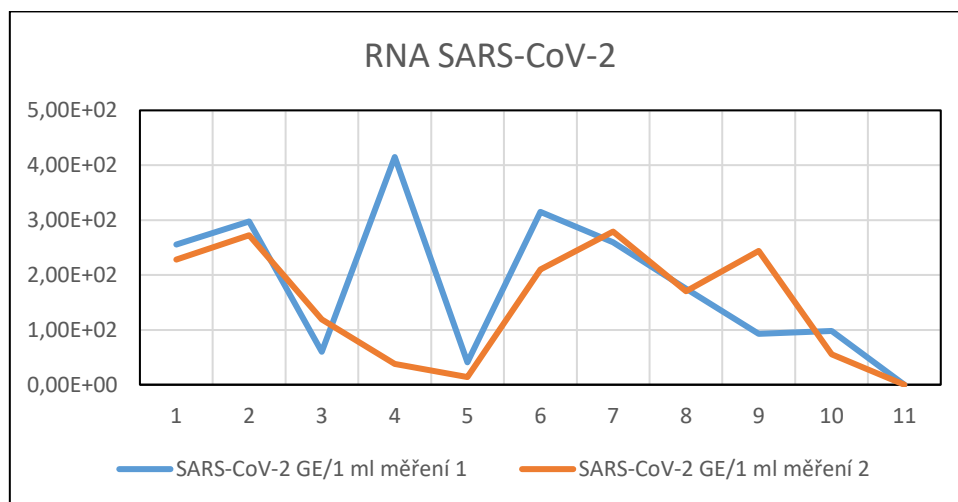
V průběhu řešení projektu byly prováděny aktivity směřující ke zvýšení přesnosti a validity prováděných stanovení. Vzhledem k situaci probíhající epidemie, bylo nutné zavádět a optimalizovat metody, včetně jejich dílčích kroků od odběru po konečný výsledek, v průběhu epidemie. Do stanovení byly zapojeny 3 laboratoře (1. VÚVeL, Virologie potravin a prostředí, Brno=VÚVeL; 2. Oddělení laboratoří VÚV TGM, v. v. i., pobočka Brno=VÚV Brno; 3. Zkušební laboratoř technologií a složek životního prostředí VÚV TGM, v. v. i., Praha=VÚV Praha). Laboratoř VÚVeL měla zavedené metody stanovení virů v potravinách a vodách. Na začátku epidemie rozšířila stanovení o RNA viru SARS-CoV-2, metodu akreditovala a pomohla s jejím zavedením v laboratořích VÚV Brno a Praha. Laboratoř VÚV Brno začala se samostatnými analýzami v prosinci 2021, laboratoř VÚV Praha pak v září 2022. Pro možnost využití výsledků ze všech tří laboratoří do společného hodnocení byly prováděny kontrolní

duplicitní vzorky. Duplicitní vzorky byly v rámci zavádění a ověření postupu na stanovení SARS-CoV-2 v odpadních vodách prováděny i v jednotlivých laboratořích. Laboratoře aktuálně používaly stejný postup, vyvinutý ve VÚVeL – viz 3.1.

V rámci vývoje a ověření postupu na stanovení SARS-CoV-2 v odpadních vodách byly v laboratořích VÚV Brno analyzovány sady duplicitních vzorků. Do hodnocení nebyly zahrnuty výsledky v blízkosti meze detekce a výsledky vzorků s různým typem uchování. Kompletní výsledky, včetně statistických ukazatelů (směrodatná odchylka=SD, relativní směrodatná odchylka=RSD a VS=variační koeficient) jsou uvedeny v tabulce T1.1 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně). Porovnání duplicitních vzorků pro hodnotu Cq a RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml jsou znázorněny na **obr. 7 a obr. 8**.



Obr. 7 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno.

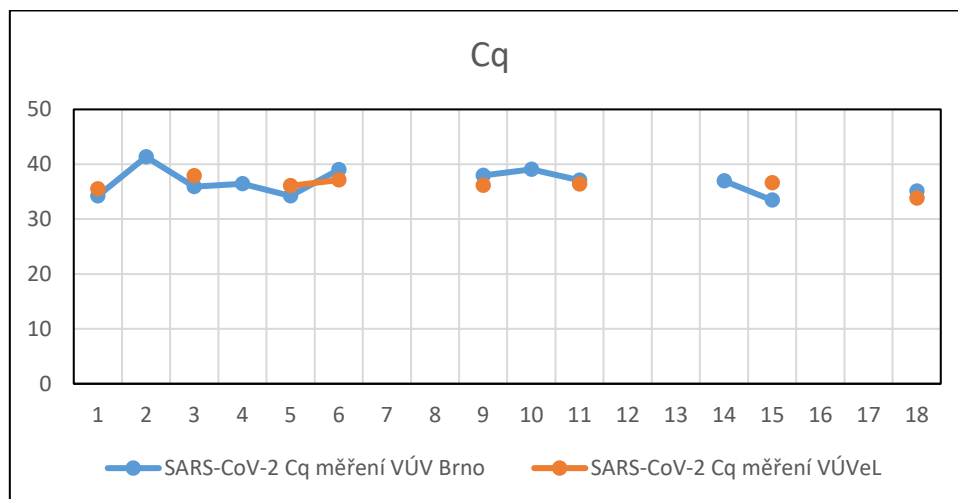


Obr. 8 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno.

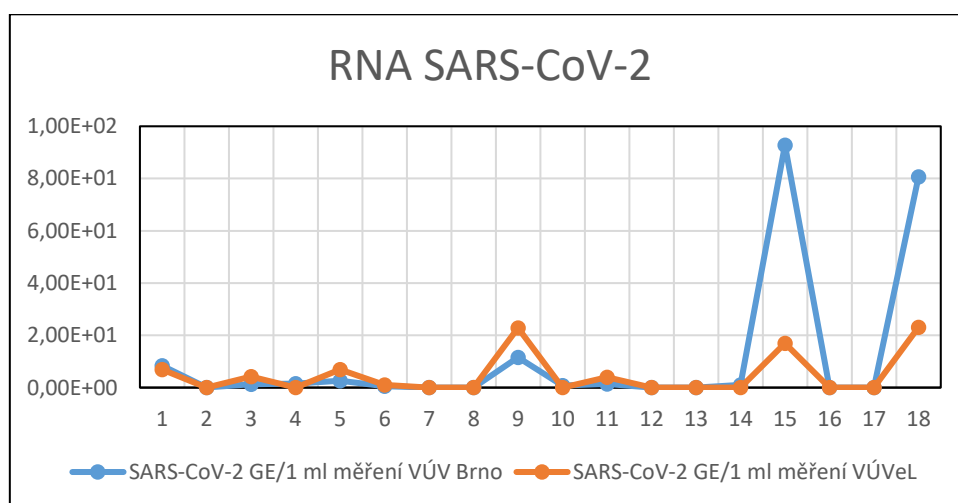
Porovnání duplicitních vzorků ukázalo dobrou shodu, průměrný variační koeficient dosáhl 24,8 %, s výjimkou duplicitních výsledků blízkých limitu detekce, kde byl zjištěn rozdíl přesahující 100 %.

V rámci vývoje a ověření postupu na stanovení SARS-CoV-2 v odpadních vodách v různých laboratořích byly průběžně zpracovávány duplicitní vzorky v laboratořích VÚVeL, VÚV Brno a VÚV Praha. Porovnání

mezi VÚVeL a VÚV Brno proběhlo na 18 vzorcích, VÚVeL a VÚV Praha na 12 vzorcích a VÚV Praha a VÚV Brno na 5 vzorcích. Kompletní výsledky, včetně statistických ukazatelů (průměr a směrodatná odchylka) jsou uvedeny v tabulce T1.2 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně). Porovnání duplicitních vzorků pro hodnotu Cq a RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml jsou znázorněny na **obr. 9** a **obr. 10**.

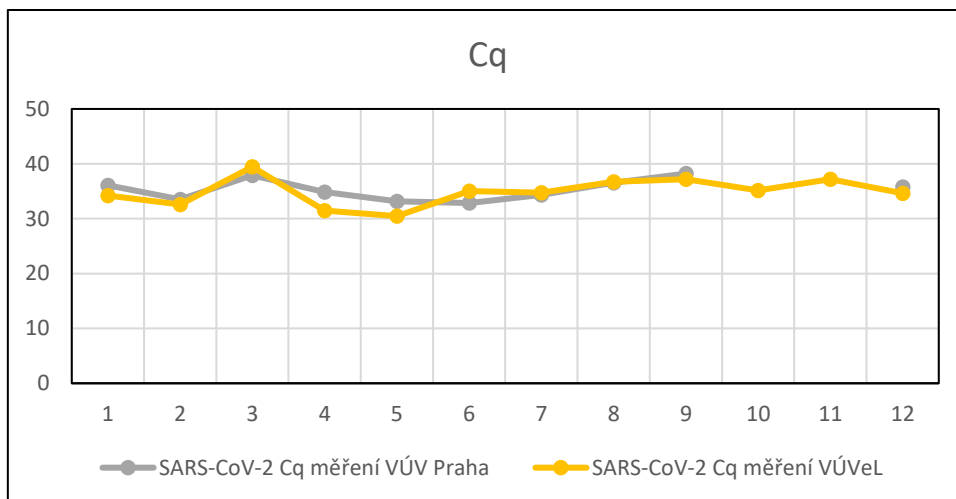


Obr. 9 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Brno.

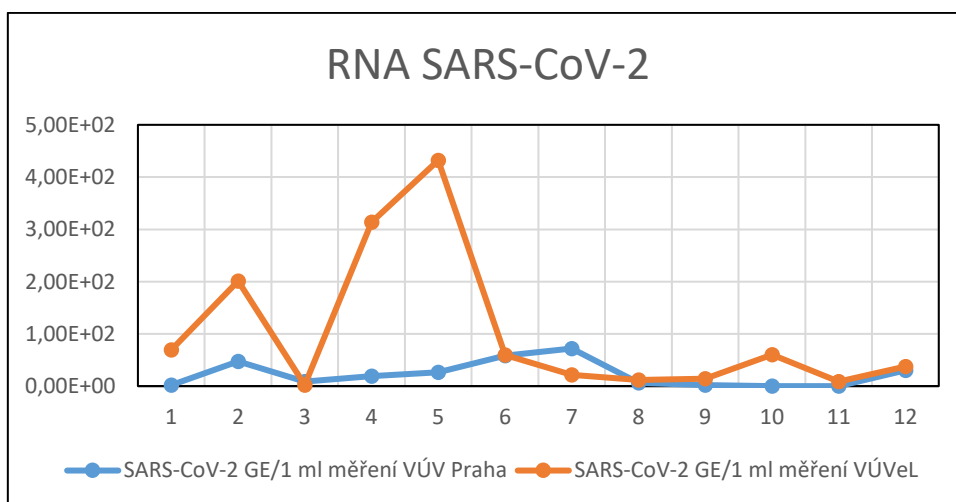


Obr. 10 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Brno.

Ze získaných dat byla vypočtena mezilaboratorní reprodukovatelnost. Do výpočtů nebyly zahrnuty vzorky s výsledkem 0 GE/ml. Mezilaboratorní reprodukovatelnost dosáhla 66 %. Výsledná hodnota byla značně ovlivněna výsledky v blízkosti limitu detekce.



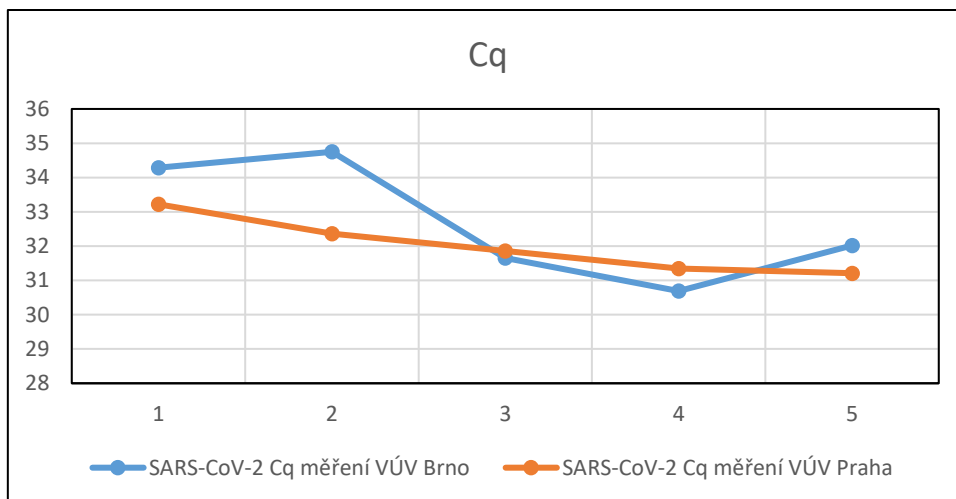
Obr. 11 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Praha.



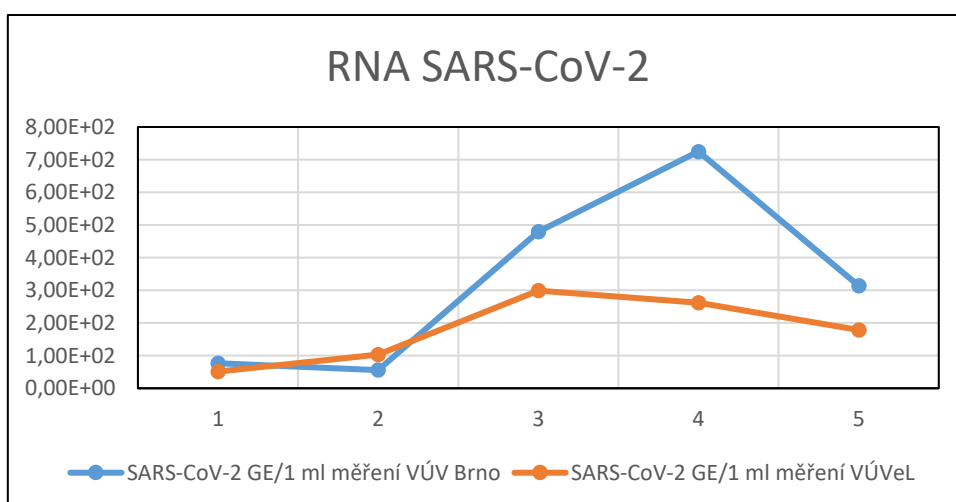
Obr. 12 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚVeL a VÚV Praha.

Kompletní výsledky, včetně statistických ukazatelů (průměr a směrodatná odchylka) jsou uvedeny v tabulce T1.3 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně). Porovnání duplicitních vzorků pro hodnotu Cq a RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml jsou znázorněny na **obr. 11** a **obr. 12**.

Ze získaných dat byla vypočtena mezilaboratorní reprodukovatelnost. Do výpočtů nebyly zahrnuty vzorky s výsledkem 0 GE/ml a vzorky s různým typem uchování. Mezilaboratorní reprodukovatelnost dosáhla 61 %. Výsledná hodnota byla značně ovlivněna výsledky v blízkosti limitu detekce.



Obr. 13 Porovnání hodnot Cq duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno a VÚV Praha.



Obr. 14 Porovnání hodnot RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml duplicitních vzorků – laboratoř VÚV Brno a VÚV Praha.

Kompletní výsledky, včetně statistických ukazatelů jsou uvedeny v tabulce T1.4 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně). Porovnání duplicitních vzorků pro hodnotu Cq a RNA SARS-CoV-1 GE/1 ml jsou znázorněny na **obr. 15** a **obr. 14**.

Ze získaných dat byla vypočtena mezilaboratorní reprodukovatelnost. Mezilaboratorní reprodukovatelnost dosáhla 44 %.

Na základě kvalifikovaného odhadu podporovaného výsledky stanovení duplicitních vzorků bylo za odpovídající rozšířenou nejistotu (pro k=2) stanoveno 40 %.

3.2 Vzorkování odpadních vod

3.2.1 Optimalizace způsobu odběru vzorků pro monitorování odpadních vod

Výzkum v oblasti WBE přístupu ve vztahu k epidemii covid-19 stále probíhá, vyvíjí se analytické metody i postupy pro odběry vzorků, které jsou nezbytnou podmínkou pro získání spolehlivých epidemiologických dat. Pro odběry vzorků jsou využívány různé postupy. Kompozitní vzorkování používá automatické vzorkovače instalované na vstupu na ČOV (převážně za česlemi), přičemž tento typ vzorku je pro analýzu výhodnější vzhledem k tomu, že poskytuje reprezentativní vzorek, který zachycuje vylučování viru obyvateli během celého období sběru (KWR WATER RESEARCH INSTITUTE, 2020). U prostého (bodového) vzorkování se jedná o odběr vzorku po dobu nepřesahující 15 minut, přičemž tento typ vzorků je relevantní pouze pro přesný čas sběru a může do analýzy vnést nezanedbatelnou nejistotu. Nejistoty u prostého nebo kompozitního vzorkování byly dobře studovány pro stanovení obsahu vybraných léčiv a produktů osobní péče v odpadní vodě. K vyšší nejistotě (průměrně kolem 30 %) přispěl prostý vzorek, zatímco metoda kompozitního vzorkování vykazala nejistotu <10 % (Ort, 2010). Protože defekace je u převážné části obyvatel nejčastější v časných ranních hodinách ve srovnání s jinými časy (Heaton, 1992), je odebírání prostých vzorků preferováno v dobách, kdy je fekální zatížení nejvyšší, přičemž před vzorkováním je třeba tyto časy určit (Ahmed, 2020). V případě, že není možné pro analýzu zajistit 24 h kompozitní vzorky a je nutno přistoupit k odběru prostého vzorku, je tedy vhodné zjistit, kdy je fekální znečištění a s tím spojená virová nálož v odpadní vodě nejvyšší.

Často je velmi obtížné odhadnout virovou nálož v surových odpadních vodách kvůli nedostatku informací o hodinových a dokonce sezónních změnách obsahu virových agens v odpadních vodách. Korelační analýzy naznačují, že BSK, CHSK, stejně jako fekální koliformní bakterie mohou být dobrým indikátorem virové nálože SARS-CoV-2 v komunálních odpadních vodách (Navarro, 2021).

V rámci řešení projektu bylo pomocí sledování běžných mikrobiálních a fyzikálně chemických parametrů optimalizováno vzorkování odpadních vod na ČOV o různých velikostech v České republice.

V rámci optimalizace postupů odběru byly provedeny tyto testy:

- 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
- rozdíl v uchování vzorků před zpracováním (zamražení na -70 °C/-20 °C a chlazení na 6 °C)

V průběhu projektu byly odebírány všechny typy vzorků odpadních vod. Typ odběru byl dán aktuálními možnostmi vzorkařů a provozovatelů ČOV. Preferovány byly slévané vzorky typu B nebo C. Vzorky byly odebírány na nátoku na ČOV, za prvním mechanickým předčištěním (česlemi). Vzorkování prováděly z velké části vodohospodářské společnosti (provozovatelé ČOV) nebo interní vzorkaři VÚV.

Převážně byly získávány 24hodinové slévané vzorky (S24). Po provedení experimentů, zaměřených na zjištění vyšší koncentrace fekálií ve vzorcích, byly odebírány 18hodinové slévané vzorky odebírané od 5 do 23 h (S18). U 24hodinových kompozitních vzorků se jednalo o vzorky, získané sléváním 12 objemově stejných dílčích vzorků odebíraných po 2 h. U časových experimentů se jednalo o sérii 24 slévaných hodinových vzorků (slité 4 objemově stejné vzorky vzorkované po 15 min) odebraných během 24 h.

Vzorky odebírané interními vzorkaři VÚV byly odebírány automatickými vzorkovači (Hach) na nátoku na ČOV. Vzorky byly do laboratoře přepraveny v chladicích boxech. Ve vzorcích byly doplňkově stanovovány fyzikálně-chemické, chemické a mikrobiologické ukazatele dle akreditovaných postupů

laboratoří VÚV Brno a VÚV Praha. Byly stanovovány: fosforečnany (o-PO43-), nerozpuštěné látky (NL105), amoniakální dusík (N-NH4), chemická spotřeba kyslíku (CHSK), termotolerantní fekální koliformní bakterie, Escherichia coli a enterokoky.

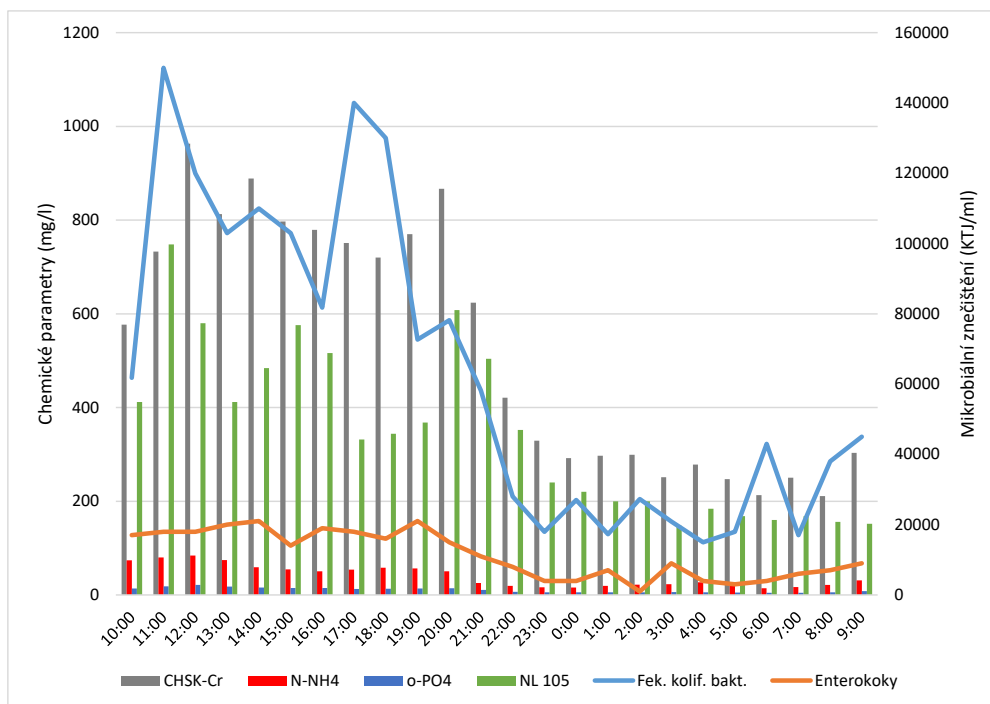
3.2.2 Testování rozdílů ve složení odpadních vod v průběhu 24hodinového cyklu

Zahraniční zdroje uvádí, že v surové odpadní vodě se nachází nejvyšší fekální znečištění stejně jako i koncentrace virů mezi 10. a 14. hodinou, což odpovídá předpokládanému chování obyvatelstva. Charakter přitékající odpadní vody je ovlivněn také délkou kanalizační sítě, dobou dotoku na ČOV, srážkami nebo nárazovým vypouštěním průmyslových odpadních vod. Je proto potřebné při monitoringu viru SARS-CoV-2 brát v potaz i denní průtoky na nátoku na ČOV, čím by bylo možné zohledňovat výkyvy v systému (Melvin, 2021; Rolland, 1983). Další významnou proměnnou je teplota, která ovlivňuje perzistenci virů v životním prostředí, přičemž vyšší rychlosti rozpadu jsou obvykle pozorovány při teplotách nad 20 °C, ve srovnání s teplotami pod 15 °C (Korajkic, 2019; Muirhead, 2020). Kvantifikace rychlosti rozpadu virových částic a s tím spojená degradace RNA SARS-CoV-2 mezi vylučováním stolicí a dobou odběru vzorku je pro WBE důležitá, protože může vést k systematickému zkreslení výsledků, což následně může mít dopad na jejich interpretaci. Z literatury (Ahmed, 2020a) bylo zjištěno, že pro částice SARS-CoV-2 v surové odpadní vodě byly průměrné konstanty rychlosti rozpadu prvního řádu (k) 0,084/den při 4 °C; 0,114/ den při 15 °C a 0,286/den při 37 °C. Problém se zvýšenou teplotou 24hodinového kompozitního vzorku v letních měsících je nutné řešit využitím chlazených automatických vzorkovačů.

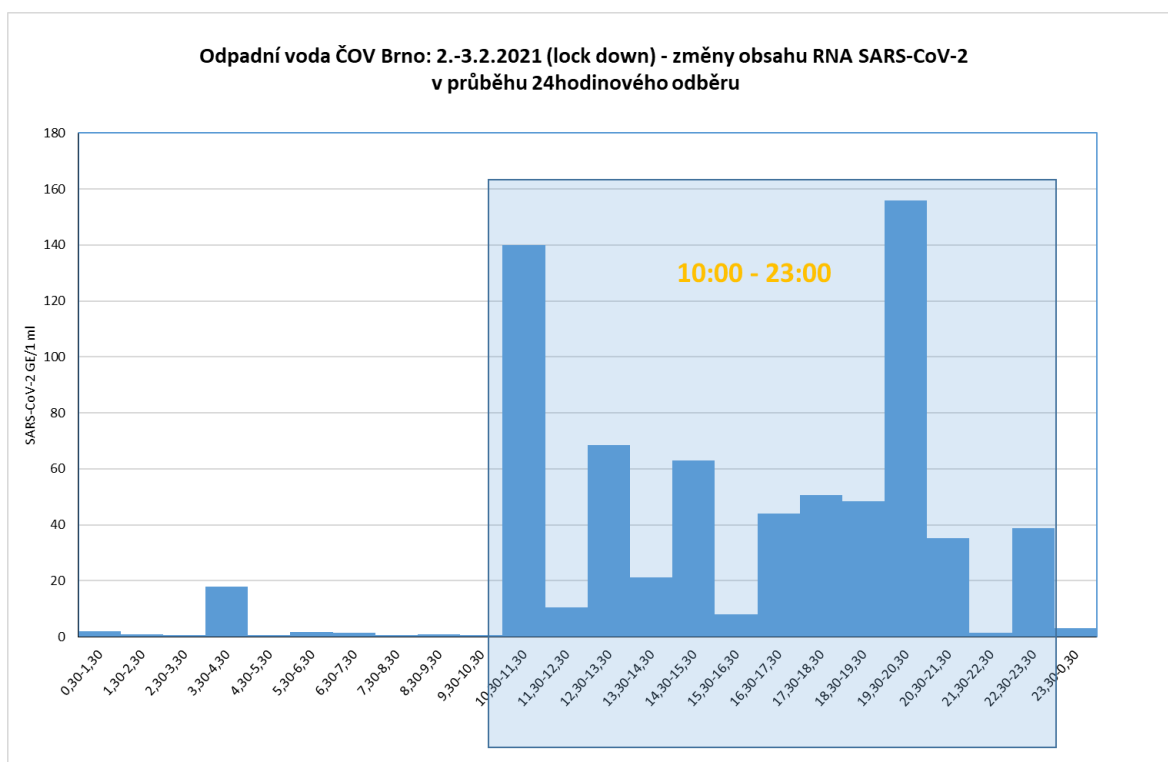
Pro získání přehledu o denním zatížení ČOV a návrhu optimálního způsobu vzorkování během lockdownu a za běžného režimu byly února a října 2021 provedeny pomocí automatického vzorkovače odběry odpadní vody na nátoku na ČOV Brno a Břeclav. Celkem bylo v každém termínu na každé ČOV odebráno 24 vzorků, každý vzorek byl tvořen 4 dílčími vzorky, odebranými po 15 min. V každém z 24 vzorků byly stanoveny základní chemické parametry (pH, elektrická konduktivita, amonné ionty, celkový fosfor, fosforečnany, CHSK-Cr, nerozpuštěné látky), mikrobiologické fekální indikátory (enterokoky, termotolerantní koliformní bakterie) a SARS-CoV-2.

U obou ČOV, na kterých probíhaly časové experimenty, byl podíl průmyslových vod na nátoku podobný (kolem 30 %), ovšem ČOV se lišily velikostí (ČOV Brno >100 000 napojených obyvatel, ČOV Břeclav 10 000-100 000 napojených obyvatel). U ČOV Brno byla zjištěna silná korelace mezi indikátory fekálního znečištění a chemickými ukazateli znečištění, přičemž korelační koeficienty se pohybovaly mezi 0,76-0,91, viz. **obr. 15**. U ČOV Břeclav nebyla pozorována korelace mezi fekálními koliformními bakteriemi a chemickými parametry, ale množství enterokoků v odpadní vodě odpovídalo chemickému znečištění (korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí 0,68-0,80), viz. **obr. 17**.

ČOV Brno únor 2021 – lockdown: největší zatížení ČOV Brno bylo pozorováno mezi 10 a 23 hodinou, došlo k nárůstu koncentrace všech sledovaných chemických i mikrobiologických ukazatelů, kromě pH. Mezi 23 a 10 hodinou bylo zatížení ČOV poměrně konstantní. Nárůstu zatížení odpovídala i vyšší koncentrace SARS-CoV-2 během uvedené doby, hodnoty dosahovaly až téměř 160 GE/ml. Koncentrace SARS-CoV-2 v odpadní vodě kolísala, nekorelovala s počty termotolerantních koliformních bakterií ani enterokoků, viz. **obr. 16**.



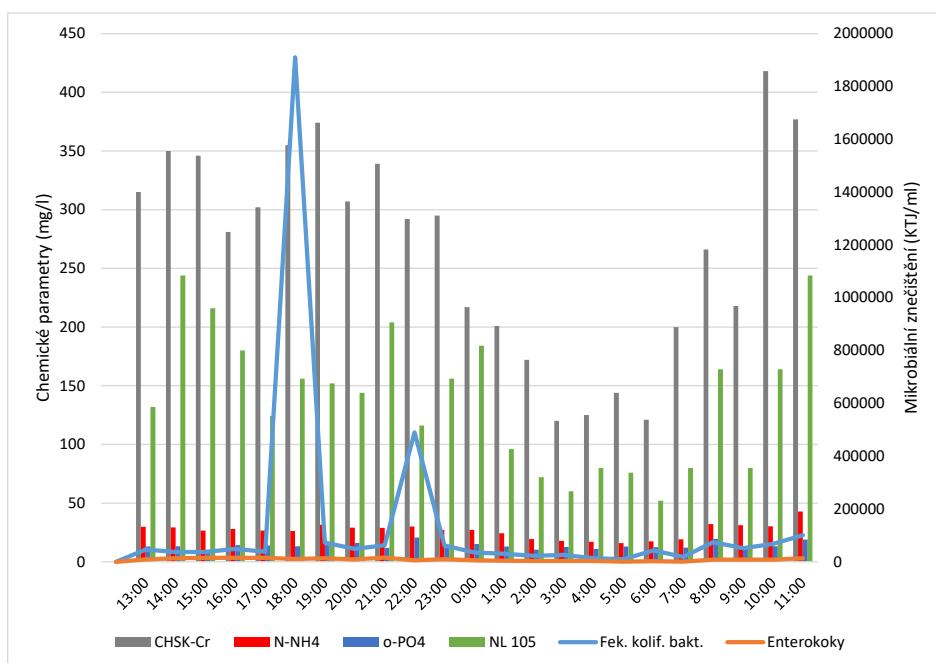
Obr. 15 Časové změny mikrobiálních a fyzikálně-chemických parametrů v hodinových vzorcích odebraných 2. 2. 2021 na nátku ČOV Brno.



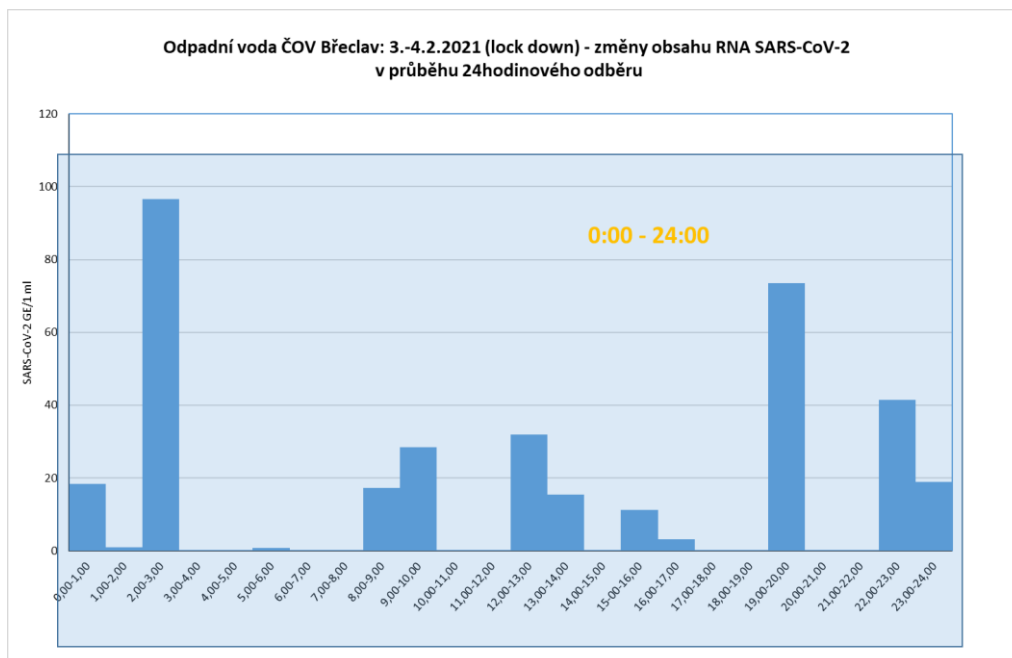
Obr. 16 Odpadní voda ČOV Brno: 2. – 3. 2. 2021 (lockdown) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru.

ČOV Břeclav únor 2021 – lockdown: k největšímu zatížení ČOV došlo mezi 10 a 23 hodinou, došlo k nárůstu koncentrace všech sledovaných chemických i mikrobiologických ukazatelů, kromě pH. Mezi 23 a 10 hodinou bylo zatížení ČOV nižší. Přítomnost SARS-Cov-2 byla pozorována nepravidelně v průběhu celého dne. Maximální koncentrace SARS-CoV-2 dosáhla téměř 100 GE/ml OV. Množství

SARS-CoV-2 v odpadní vodě nekorelovalo s počty termotolerantních koliformních bakterií ani enterokoků, viz. **obr. 18**.



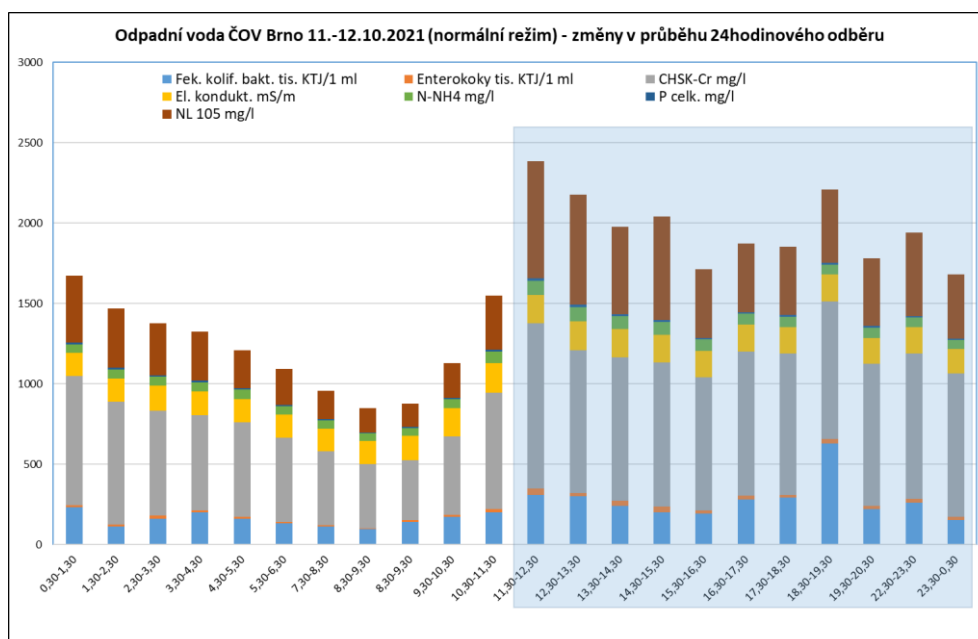
Obr. 17 Časové změny mikrobiálních a fyzikálně-chemických parametrů v hodinových vzorcích odebraných 3. 2. 2021 na nátku ČOV Břeclav.



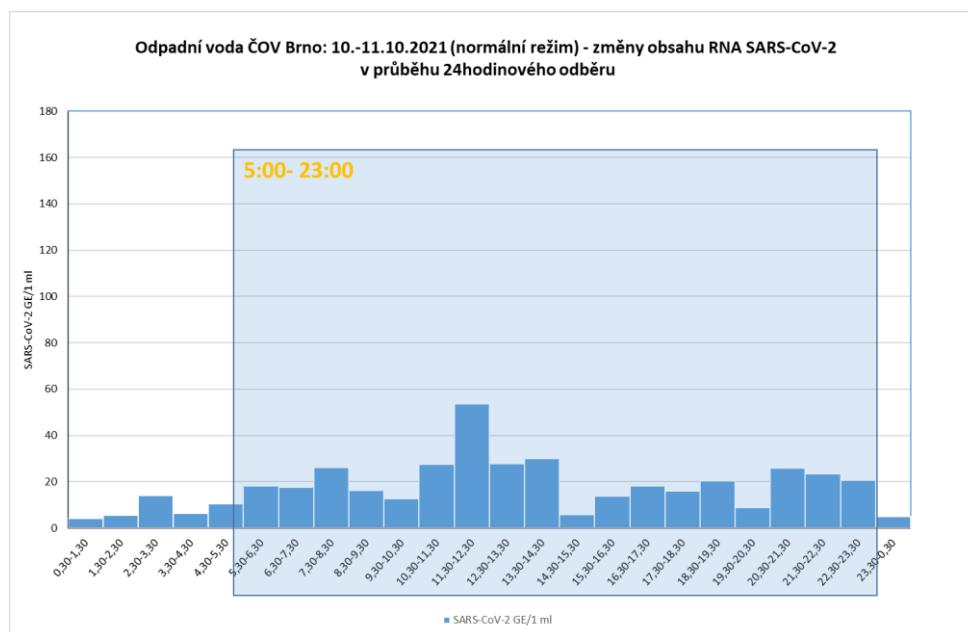
Obr. 18 Odpadní voda ČOV Břeclav: 3. – 4. 2. 2021 (lockdown) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru.

Podobné výsledky ukázal experiment, provedený na ČOV Brno a Břeclav za normálního režimu v říjnu 2021, viz. **obr. 19, 20, 21, 22** a **obr. 23**. Největší podíl fekálního znečištění přitékal na ČOV v době mezi 11 a 24 hodinou. Tomu odpovídala i koncentrace RNA SARS-CoV-2 v odpadní vodě.

ČOV Brno říjen 2021 – normální režim: největší zatížení ČOV bylo mezi 11.00 a 24.00, došlo k nárůstu koncentrace všech sledovaných chemických i mikrobiologických ukazatelů, kromě pH. Nižší zatížení ČOV bylo zjištěno mezi půlnocí a 11.00. Stanovené koncentrace u všech ukazatelů během celého dne dosahovaly vyšších hodnot než během lockdownu. Vyšší koncentrace SARS-CoV-2 byly pozorovány mezi 5 a 23 hodinou, pozitivní nález byl ale zjištěn u všech vzorků. Převážná většina vzorků obsahovala SARS-CoV-2 v koncentraci do 30 GE/ml. Maximální koncentrace byla zjištěna mezi 11 a 12 hodinou. Koncentrace SARS-CoV-2 v odpadní vodě nekorelovala s počty termotolerantních koliformních bakterií ani enterokoků.

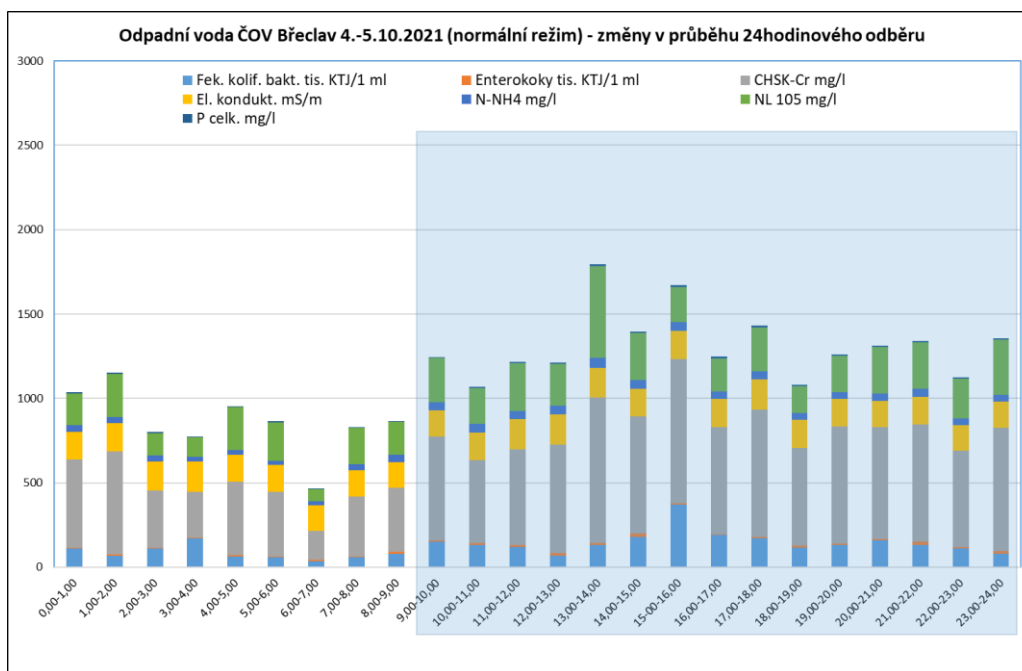


Obr. 19 Odpadní voda ČOV Brno 11. - 12. 10. 2021 (normální režim) - změny v průběhu 24hodinového odběru.

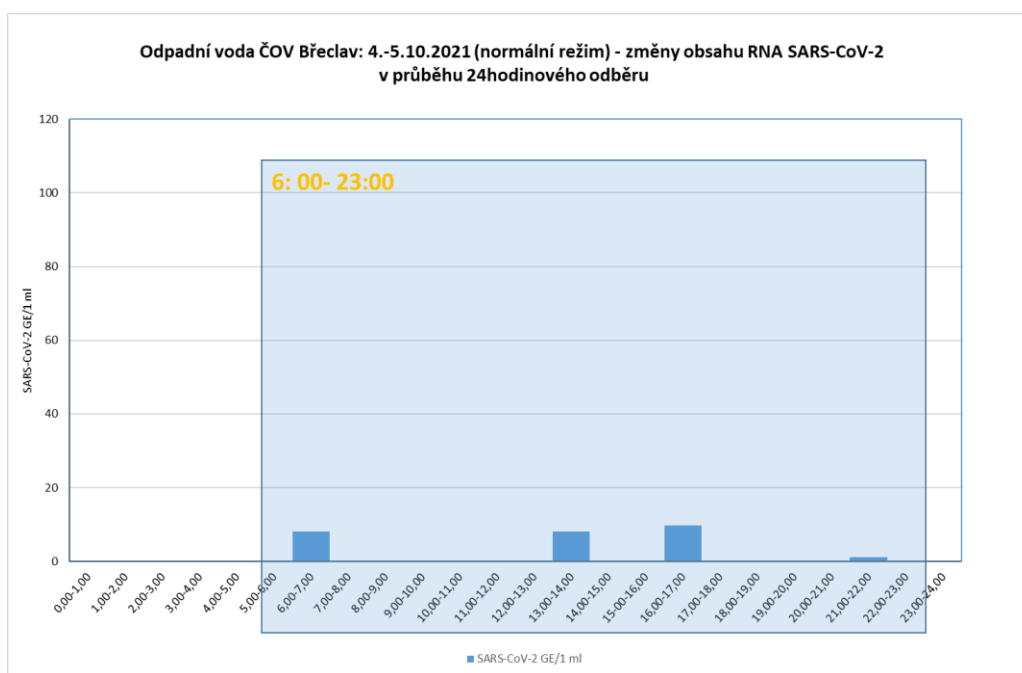


Obr. 20 Odpadní voda ČOV Brno: 10. – 11. 10. 2021 (normální režim) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru

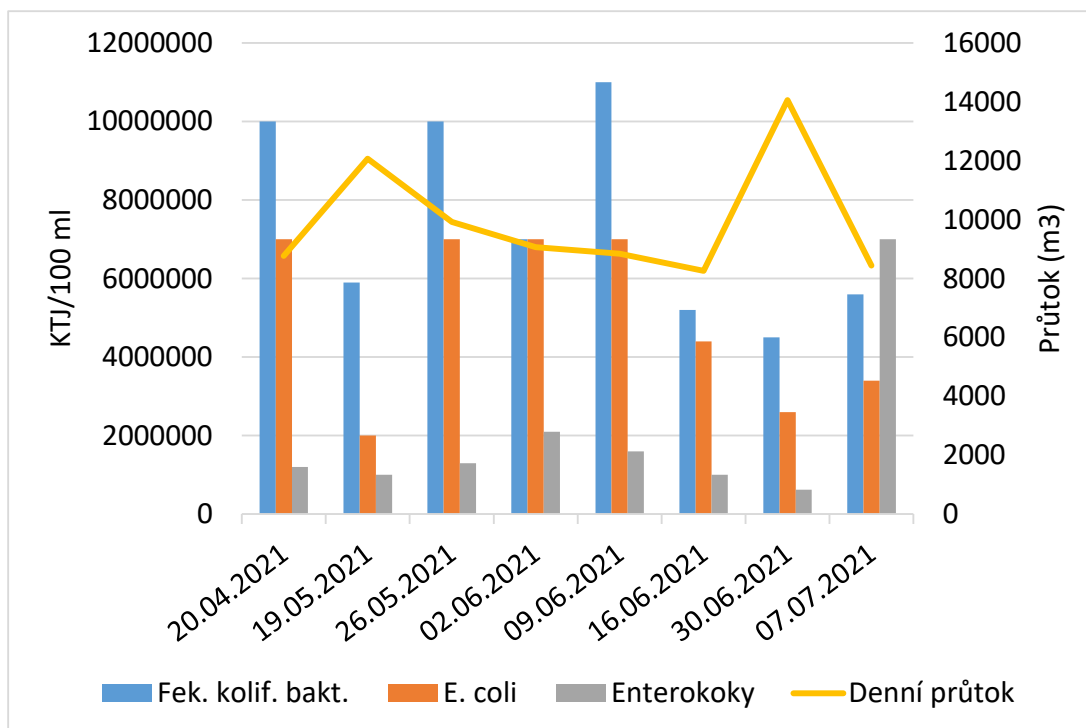
ČOV Břeclav říjen 2021 – normální režim: největší zatížení ČOV bylo zaznamenáno mezi 9 a 24 hodinou, došlo k nárůstu koncentrace všech sledovaných chemických i mikrobiologických ukazatelů, kromě pH. Mezi 24 a 9 hodinou bylo zatížení ČOV nižší. Přítomnost SARS-Cov-2 byla pozorována nepravidelně mezi 6 a 23 hodinou. Stanovení bylo ovlivněno nízkou virovou náloží v odpadní vodě, výsledné koncentrace SARS-CoV-2 se pohybovaly v blízkosti meze limitu. Koncentrace SARS-CoV-2 v odpadní vodě nekorelovala s počty termotolerantních kolidiformních bakterií ani enterokoků.



Obr. 21 Odpadní voda ČOV Břeclav 4. – 5. 10. 2021 (normální režim) - změny v průběhu 24hodinového odběru.



Obr. 22 Odpadní voda ČOV Břeclav: 4. – 5. 10. 2021 (normální režim) - změny obsahu RNA SARS-CoV-2 v průběhu 24hodinového odběru



Obr. 23 Mikrobiální znečištění 24hodinových kompozitních vzorků surové odpadní vody z ČOV Břeclav.

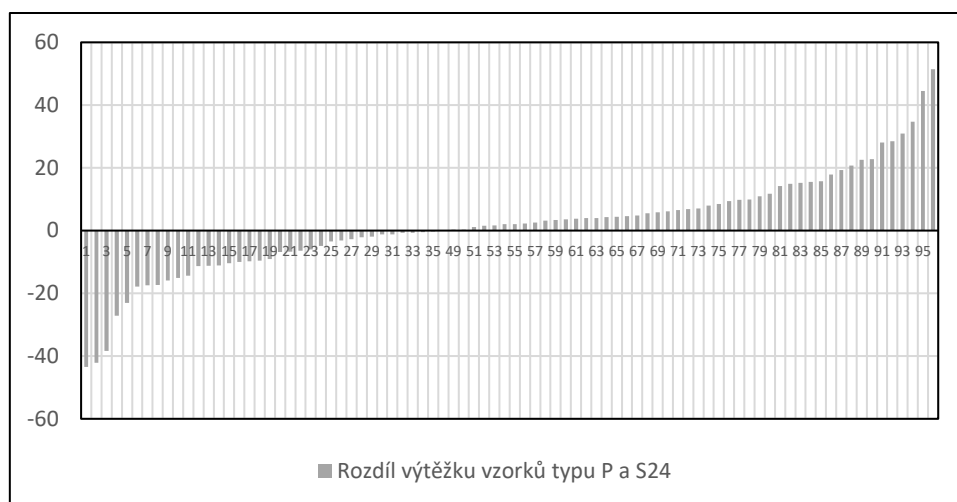
Kompletní výsledky všech časových pokusů jsou uvedeny v tabulce T1.10 a T1.11 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně).

Během monitoringu na těchto dvou ČOV byly zjištěny rozdíly v mikrobiálním znečištění odpadní vody v průběhu dne, přičemž přibližně 70 % denního znečištění vstoupilo do ČOV mezi 10. a 23. hodinou. V této době byly zjištěny i nejvyšší koncentrace RNA SARS-CoV-2.

3.2.3 Porovnání rozdílů mezi prostými a slévanými vzorky

V první fázi byly porovnány prosté vzorky, odebírané v době provozu ČOV, obvykle v dopoledních hodinách se slévanými 24hodinovými vzorky, většinou typu B (tj. 2hodinové odběry po dobu 24 hodin, nezávisle na průtoku).

Sada 84 vzorků ukázala v 58 % vyšší výtěžnost SARS-CoV-2 GE/ml pro směsné vzorky S24, viz. **obr. 24**. Porovnání ukázalo, že pro daný ukazatel je možné použít i prosté vzorky, které měly vyšší výtěžnost, tj. 42 %. Kompletní výsledky, včetně statistických ukazatelů jsou uvedeny v tabulce T1.5 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně).



Obr. 24 Rozdíl výtěžků SARS-CoV-2 GE/ml u vzorků typu P a S24.

3.2.4 Porovnání rozdílů mezi slévanými 24hodinovými a 18hodinovými vzorky

Po vyhodnocení výsledků z časového monitoringu byl pro monitoring RNA SARS-CoV-2 vybrán zkrácený režim vzorkování (od 5-23 h=S18). Výsledky pro tyto vzorky byly porovnány s výsledky z 24hodinových slévaných vzorků typu B nebo C (S24). Do porovnání bylo zařazeno celkem 16 vzorků z ČOV různých kategorií. Z výsledků, uvedených v tabulce **tabulce T1.8** v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně) jsou patrné významné rozdíly mezi kategoriemi. V celkové sadě ČOV nebyl rozdíl mezi oběma typy vzorků patrný. Pro kategorii ČOV nad 100 000 EO byly vyšší hodnoty SARS-CoV-2 GE/ml zjištěny u 24hodinových vzorků (83 %). Lokality s menšími počty (2-10 tis. a 10-100 tis.) obyvatel měly naopak vyšší výtěžky z 18hodinových vzorků (67-86 %).

Tab. 4 Porovnání výtěžků SARS-CoV-2 GE/ml u vzorků typu S18 a S24.

kategorie ČOV (počet EO)	počet vzorků	vyšší S24	vyšší S18	S18>S24
Vše	16	7	9	56%
nad 100 tis.	6	5	1	-67%
10-100 tis.	7	1	6	86%
2-10 tis.	3	1	2	67%
do 100 tis.	10	2	8	80%

Vzhledem ke zjištěným výsledkům a z praktických důvodů budou pro standardní odběry odpadních vod pro epidemiologické účely navrženy 24hodinové směsné vzorky. Zkrácení doby vzorkování může být vhodné např. pro potřeby sekvenace vzorků, v případech, kdy je prevalence nakažených v oblasti nízká.

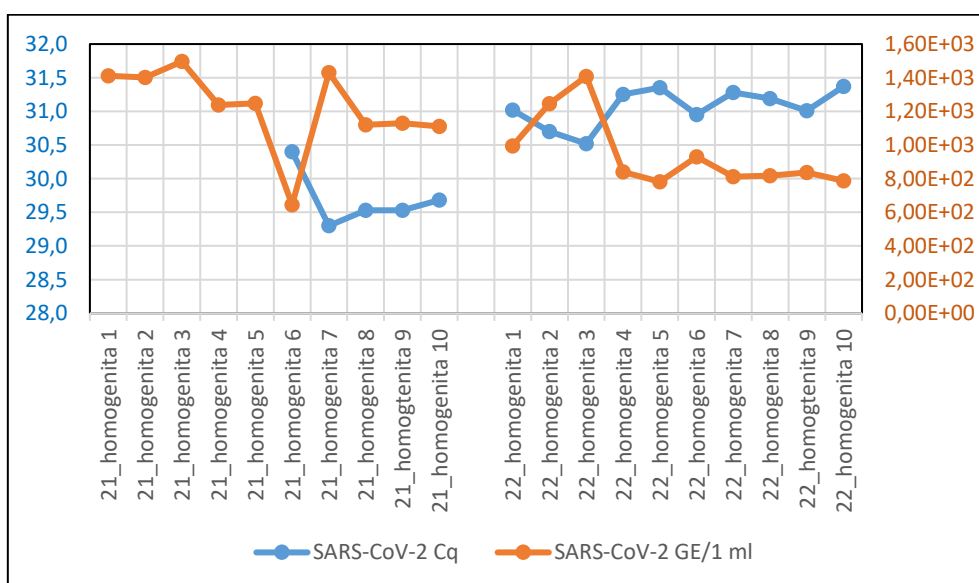
3.2.5 Porovnání homogenity vzorků

Vzorky nečištěných odpadních vod představují směs velkého množství rozpuštěných a nerozpuštěných látek všech typů, které přichází kanalizačními stokami na ČOV. Před vlastním odběrem vzorku

automatickým vzorkovačem nebo ručním vzorkovačem jsou v prvním stupni mechanického předčištění, na česlích, zbaveny hrubých nečistot. Odebraný vzorek je nehomogenní konzistence. Proto je jedním z nejvýznamnějších kroků odběru odpadních vod důkladná homogenizace vzorku. Tento krok může být příčinou odlišných koncentrací nerozpuštěných látek ve zpracovávaných podílech vzorku a díky velké afinitě hydrofobních organických mikropolutantů k nerozpuštěným látkám, může být příčinou závažné chyby následné analýzy.

Pro zjištění vlivu nehomogenity vzorku na stanovení RNA viru SARS-CoV-2 byly ve dvou termínech (10/2021 a 4/2022) provedeny experimenty, kdy byl odebrán prostý vzorek odpadní vody z nátoku na ČOV. Vzorek byl homogenizován a rozdělen na 10 stejných dílů, které byly po 5 analyzovány v laboratoři VÚVeL a VÚV Brno. Kompletní výsledky, včetně statistických ukazatelů jsou uvedeny v **tabulce T1.9** v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně).

Porovnání výsledků z obou pokusů je uvedeno na **obr. 25**.



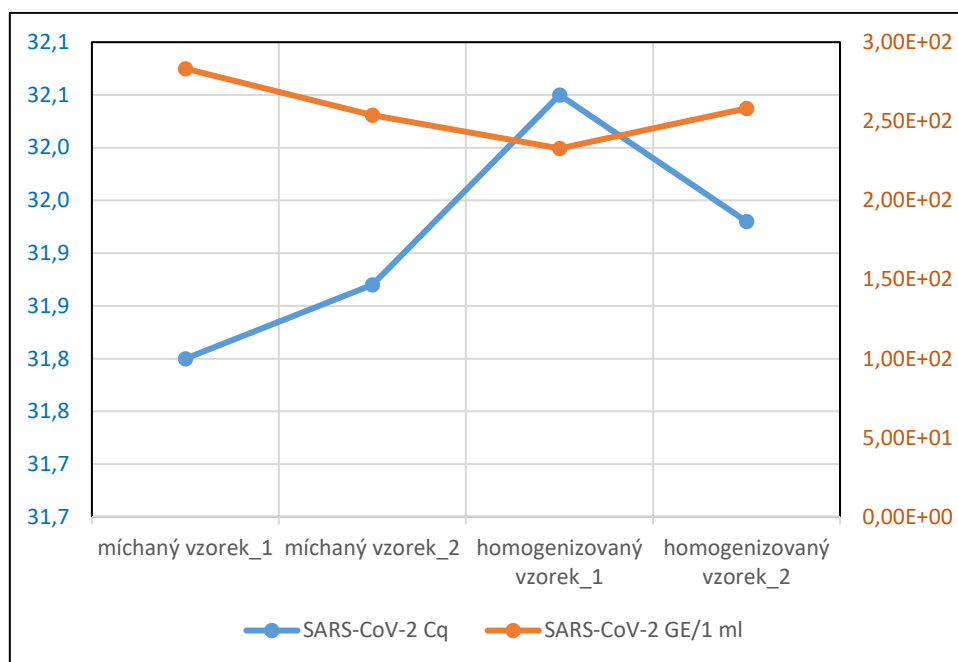
Obr. 25 Porovnání výsledků stanovení RNA SARS-CoV-2 GE v 10 podílech vzorků odpadní vody.

Z naměřených hodnot byla vypočtena opakovatelnost obou laboratoří. V prvním pokusu 10/2021 dosáhla opakovatelnost u laboratoře VÚV Brno 8 %, u laboratoře VÚVeL 26 %. Ve druhém pokusu 4/2022 dosáhla opakovatelnost u laboratoře VÚV Brno 25 %, u laboratoře VÚVeL dosáhla 7 %, tj. opakovatelnost v obou laboratořích nepřekročila 26 %.

Provedené pokusy ukázaly, že homogenita vzorku je významnou částí postupu při analýze odpadní vody a 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 dílčích podílech vzorku.

V dalším experimentu byl prověřen způsob homogenizace vzorku odpadní vody. Jeden vzorek byl homogenizován ručním mícháním a poté rozdělen na dva dílčí vzorky, druhý vzorek byl homogenizován s využitím elektrického homogenizátoru a poté rozdělen na 2 dílčí vzorky. Kompletní výsledky pokusu, včetně statistických ukazatelů, jsou uvedeny v tabulce T1.9 v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně). Graficky jsou znázorněny na **obr. 26**.

Výsledky ukázaly, že rozdíly mezi ručně míchaným vzorkem a vzorkem homogenizovaným homogenizátorem nejsou významné.



Obr. 26 Porovnání výsledků stanovení SARS-CoV-2 GE v podílech vzorků odpadní vody s různým typem homogenizace.

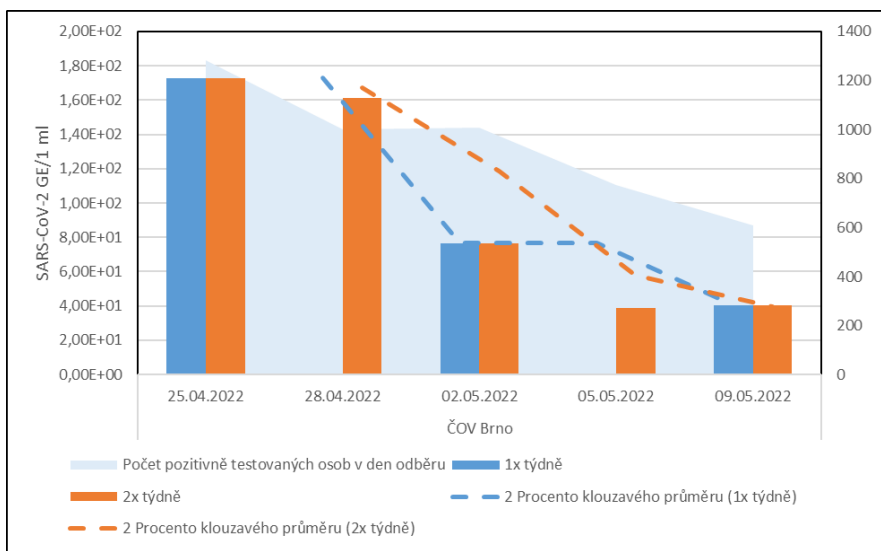
3.2.6 Porovnání uchování vzorků při $-70/-20/5\pm 3$ °C

Byly provedeny pokusy optimalizace skladování vzorků. Výsledky ukázaly, že po rozmrazení a zamražení vzorku na -70 °C dostaneme oproti původní koncentraci pouze 22,23 %, koeficient pro násobení = 4,5. Při skladování vzorků v lednici po dobu jednoho týdne získáme z původního množství 41,27 %. Při stabilizaci vzorku přidáním polyetylenglykolu (PEG) a skladování týden v lednici (5 ± 3 °C) získáme 76,60 %. Skladování po delší dobu v -70 °C významně dále neovlivňuje detekovatelné množství RNA SARS-CoV-2 ve vzorcích. Oproti tomu při skladování vzorků při -20 °C dochází k významným poklesům koncentrací sledovaných virů (resp. jejich RNA) v průběhu času; tzn. po 1 měsíci došlo k poklesu koncentrace o 90,25 %, po 3 měsících o 95,31 % a po 6 měsících až o 96,63 %.

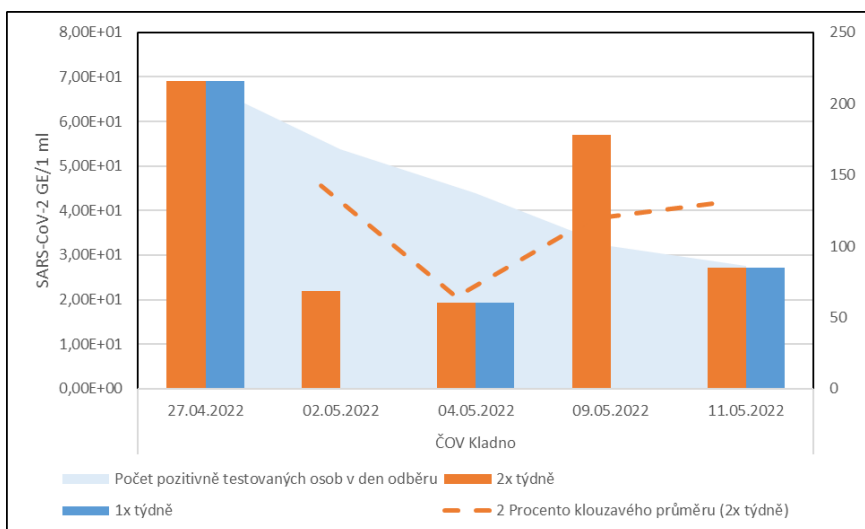
Tj. optimální postup je okamžité zpracování vzorku do 24 hodin po odběru, PEG je vhodné přidat co nejdříve, tj. po příjmu vzorku v laboratoři. V případě nutnosti je možné vzorek skladovat v lednici po přidání PEG po dobu jednoho týdne. Při nutnosti delšího uchování vzorku je nutné rychlé zamražení na -70 °C.

3.2.7 Testování vlivu zvýšené četnosti odběru vzorků – 2x týdně

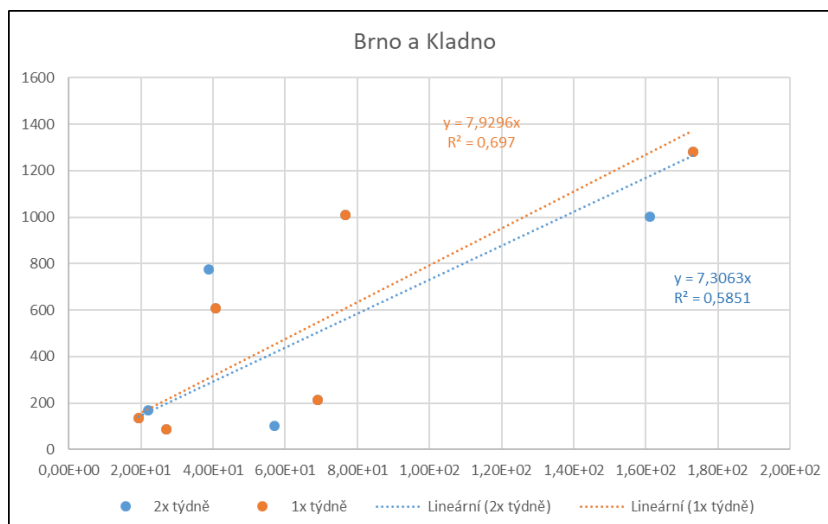
V 17. až 19. týdnu 2022 bylo na ČOV Brno a ČOV Kladno provedeno posouzení vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně. V daném období se počty nahlášených pozitivně testovaných osob pohybovaly cca mezi 80 až 1200, tj. v dobře stanovitelných hodnotách GE SARS-CoV-2. Přestože doba trvání pokusu byla na zobecnění výsledků krátká, byly mezi oběma sadami vzorků prokázány rozdíly. Na **obr. 27, 28 a 29** jsou znázorněny výsledky testu. Kompletní výsledky jsou uvedeny v **tabulce T1.12** v Příloze T1 (Výsledky_tabelárně).



Obr. 27 Posouzení vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně na ČOV Brno.



Obr. 28 Posouzení vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně na ČOV Kladno (Vrapice).



Obr. 29 Srovnání vlivu zvýšené četnosti vzorkování (2x týdně) ve srovnání s běžně prováděnou četností 1x týdně).

Výsledky ukázaly, že při četnosti 2 odběrů týdně lze získat přesnější představu o vývoji epidemické situace, které je vhodné pro aktivní sledování trendu probíhající epidemie a zpřesnění a potvrzení nastalé významnější změny a eliminaci výkyvů v obsahu virové RNA. Vhodné je vzorkování provádět s odstupem 3 dnů bez zahrnutí víkendů, z důvodu odlišného životního režimu obyvatel. Pro dlouhodobé preventivní sledování je dostačující četnost odběrů 1x týdně.

3.3 Výběr ČOV

Do souboru sledovaných ČOV byly vybrány čistírny různých kategorií, s různými charakteristikami, aby bylo možné udělat porovnání a vybrat ČOV nejvhodnější pro účely epidemiologického monitoringu. Pro výběr ČOV a pro získání podrobných informací o nich byla použita data z majetkové a provozní evidence vodovodů a kanalizací, data z vodní bilance, kterou spravuje oddělení HEIS VÚV TGM a z kanalizačních řádů. Pro účely projektu bylo zpracováno 66 ČOV, na kterých bylo prováděno od dubna 2020 do 2022 vzorkování odpadních vod. Vzorkování odpadních vod probíhalo na území celé České republiky a kromě Libereckého kraje byly zastoupeny ČOV ze všech krajů, přičemž nejvíce jich bylo vybráno v Jihomoravském kraji – konkrétně 13. Přehled vybraných ČOV je uveden v **tab. 5**. Mezi vzorkovanými městy bylo 8 z 10 největších měst v ČR (v tabulce jsou zvýrazněny tučně). Mezi největšími městy chybí pouze Liberec a Hradec Králové. Výčet všech sledovaných ČOV, včetně napojených obcí a jejich důležité vodohospodářské charakteristiky jsou uvedeny v Příloze T2.

Tab. 5 Rozložení sledovaných ČOV v krajích ČR.

Kraj	Obce (ČOV)	počet
Hl. město Praha	Praha (stávající a nová vodní linka)	2
Středočeský	Beroun, Černošice, Dobřichovice, Hostivice, Mělník, Roztoky, Vrapice (Kladno)	7
Jihočeský	České Budějovice , Husinec, Jindřichův Hradec, Písek, Tábor, Tábor-Klokoty	6
Plzeňský	Domažlice, Holýšov, Horšovský Týn, Plzeň , Staňkov	5
Karlovarský	Cheb, Karlovy Vary, Mariánské Lázně	3
Ústecký	Litoměřice, Petrovice, Ústí nad Labem , Nižebohy	4
Královehradecký	Broumov, Kramolna, Meziměstí, Náchod, Nové Město nad Metují, Studnice, Teplice nad Metují, Teplice nad Metují - Podhradí	8
Pardubický	Pardubice	1
Vysočina	Havlíčkův Brod, Pelhřimov, Ždírec nad Doubravou	3
Jihomoravský	Blansko, Brno , Břeclav, Bučovice, Bzenec, Ivančice, Slavkov u Brna, Strážnice, Tetčice, Tišnov, Uhřetice, Vyškov, Znojmo, Židlochovice	13
Olomoucký	Konice, Olomouc , Prostějov, Přerov, Uničov	5
Moravskoslezský	Frýdek-Místek, Karviná, Opava, Ostrava	4
Zlínský	Buchlovice, Uherské Hradiště, Uherský Brod, Velehrad	4

V **tab. 6** je uvedeno rozdělení sledovaných ČOV podle kategorií dle EO a k nim počet obyvatel, kteří jsou na danou ČOV připojeni. Nejvíce vybraných ČOV bylo z kategorie mezi 10 – 100 tisíci ekvivalentními obyvateli. Většina sledovaných ČOV obsluhuje větší spádové oblasti a je na ni napojeno množství menších obcí.

Tab. 6 Rozdělení sledovaných ČOV podle kategorií.

kategorie podle EO	počet vybraných ČOV	počet napojených obyvatel
Nad 100 tis.	9	2 420 884
10-100 tis.	36	953 174
2-10 tis.	13	71 116
Do 2 tis.	8	6 269
celkem	66	3 451 443

Na území 38 vzorkovaných obcí se vyskytují nemocniční zařízení, kde je předpoklad vyššího výskytu pozitivních pacientů s covid-19. Většina obcí má jednotnou kanalizaci, která na ČOV odvádí jak splaškovou, tak i případnou srážkovou vodu a průmyslovou odpadní vodu. V **tab. 7** je uveden přehled množství čištěných odpadních vod na sledovaných ČOV za rok (seřazeno od největšího k nejmenšímu) a průměrný denní průtok.

Tab. 7 Přehled množství čištěných odpadních vod na sledovaných ČOV za rok a průměrný denní průtok.

obec (ČOV)	množství čištěných OV (tis. m ³ /rok)	Q průměrný denní (m ³ /den)	obec (ČOV)	množství čištěných OV (tis. m ³ /rok)	Q průměrný denní (m ³ /den)
Praha	102 529	354 239	Tábor-Klokoty	1 198	4 226
Brno	36783	137 000	Tišnov	1 155	2 726
Ostrava	29 902	95 367	Broumov	1 124	7 233
Plzeň	16 261	65 000	Ivančice	1 121	2 999
České Budějovice	16 109	34 122	Mělník	1 071	7 200
Pardubice	14 354	42 466	Bzenec	1 018	3 730
Olomouc	13 404	42 466	Tetčice	882	2 246
Ústí nad Labem	9 047	51 840	Roztoky	873	4 280
Frýdek-Místek	7 343	40 456	Nové Město nad Metují	817	4 500
Karlovy Vary	7 176	24 806	Slavkov u Brna	787	1 503
Prostějov	6 658	43 200	Hostivice	631	1 595
Opava	5 795	21 252	Bučovice	598	1 477
Karviná	5 397	31 000	Strážnice	563	1 735

Přerov	4 507	30 700	Horšovský Týn	518	2 053
Vrapice (Kladno)	3 883	18 251	Černošice	481	1 751
Náchod	3 767	10 100	Konice	396	379
Jindřichův Hradec	3 345	15 000	Holýšov	392	1 458
Uherské Hradiště	3 047	11 000	Dobřichovice	364	1 100
Cheb	2 989	13 824	Teplice nad Metují	240	997
Havlíčkův Brod	2 812	11 500	Židlochovice	228	1 584
Vyškov	2 809	9 000	Staňkov	215	815
Beroun	2 757	12 078	Ždírec nad Doubravou	195	300
Břeclav	2 754	7 659	Buchlovice	184	444
Znojmo	2 753	19 000	Velehrad	166	314
Mariánské Lázně	2 601	9 047	Husinec	143	660
Písek	2 569	7 283	Meziměstí	135	780
Uherský Brod	2 397	14 085	Kramolna	63	252
Pelhřimov	2 368	10 000	Uhřice	59	134
Litoměřice	2 262	6 798	Petrovice	38	150
Blansko	1 530	4 881	Studnice	27	180
Uničov	1 426	4 338	Tábor	15	56
Domažlice	1 249	4 027	Teplice nad Metují - Podhradí	8	65

3.4 Stanovení neopterinu v odpadních vodách

3.4.1 Vývoj metody stanovení neopterinu v odpadních vodách

Vývoj metody: Surová komunální odpadní voda představuje z analytického hlediska značně komplikovanou matici, která s největší pravděpodobností může vykazovat významné matriční efekty, s nimiž je nutno při vývoji metody počítat.

Pro stanovení neopterinu v odpadní vodě se zdá jako nejvhodnější použít metodu izotopového ředění. Deuteriovaný standard neopterinu bohužel není na trhu k dispozici. Proto byl jako interní standard nejdříve vybrán rhamnopterin (6-(L-1,2,3-trihydroxybutyl)-pterin; Toronto Research Chemicals) používaný při stanovení neopterinu v moči (Schmidt 2006). Použití tohoto interního standardu pro stanovení neopterinu v odpadní vodě se však ukázalo jako nevhodné z důvodu jeho reakcí s maticí vzorků. Proto byla následně testována metoda ředění vzorků s přidavkem i bez přidavku interního standardu. Avšak ani ředění vzorku reakcím rhamnopterinu s maticí nezabránilo, proto se dále

pokračovalo ve vývoji metody pouze s 10x zředěnými vzorky, bez přidavku interního standardu. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přidavku.

Stanovení neopterinu bylo založeno na chromatografické separaci látek ze vzorku kapalinovou chromatografií, jejich ionizací elektrosprejem v negativním módu a detekci hmotnostním detektorem na principu trojitého kvadrupólu (MS přechody uvedeny v **tab. 8**. Identifikace a kvantifikace byla provedena pomocí softwaru Sciex OS. Vzorek surové odpadní vody byl před vlastním stanovením vytemperován na laboratorní teplotu a poté přefiltrován přes filtr z regenerované celulózy o porozitě 0,22 um (Whatman).

Tab. 8 MS přechody.

Název látky	Přechody		EP (vstupní potenciál)	CE (kolizní energie)	CXP (výstupní potenciál na kolizní cele)
	Q1 (prekurzor)	Q3 (produktový ion)	(V)	(V)	(V)
Neopterin	252	192	-10	-20	-9
	252	147	-10	-34	-18
Rhamnopterin	266,1	192	-10	-21	-9

Pro chromatografickou separaci byla použita nejdříve kolona Synergi Fusion-RP 80 A. Na této koloně se neopterin nezadržoval a byl eluován hned na začátku analýzy. Jako další možnost byla použita kolona Atlantis T3 s předkolonou Atlantis. S touto kolonou a gradientem uvedeným v **tab. 9** byl neopterin eluován v 4,7 minutě.

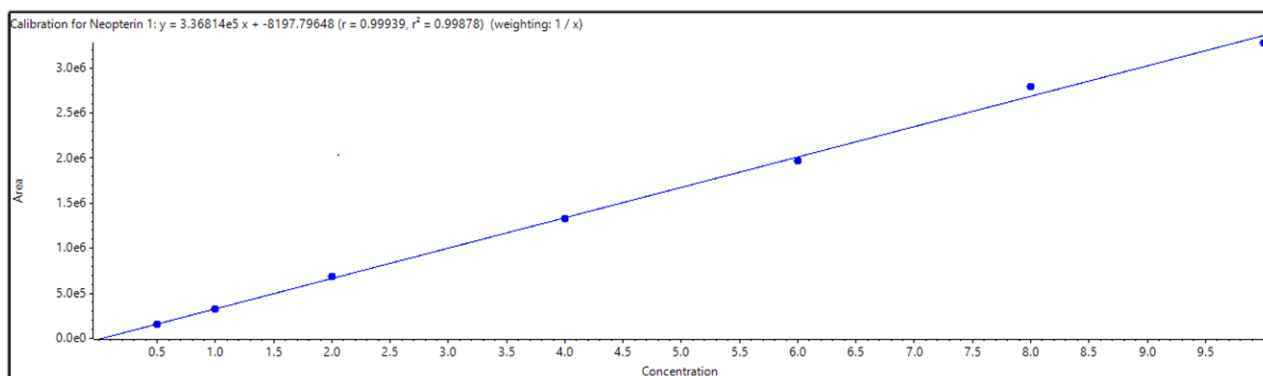
Chromatografické podmínky:

Kapalinový chromatograf:	Excision LC
Hmotnostní detektor:	Sciex Triple Quad 7500 QTRAP ready
Předkolona:	Atlantis T3, 3 um, 2,1x5 mm (Waters)
Kolona:	Atlantis T3 3 um, 3,0x100 mm (Waters)
Teplota kolony:	30 °C
Mobilní fáze A:	0,002% vodný roztok kyseliny mravenčí
Mobilní fáze B:	0,002% methanolvý roztok kyseliny mravenčí.
Průtok:	0,3 ml/min
Objem nástřiku:	20 ul
Způsob nástřiku:	přímý

Tab. 9 Gradient mobilní fáze.

Čas	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0,0	98	2
2,0	98	2
4,0	80	20
6,0	0	100
9,0	0	100
9,1	98	2
13,9	98	2

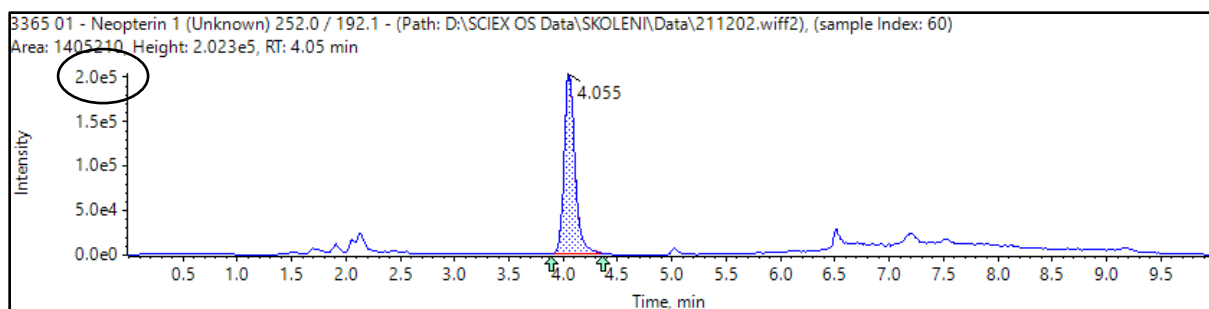
Na přípravu kalibrační řady byl použit analytický standard D-neopterin CAS Number: 2009-64-5 (Toronto Research Chemicals). Lineární rozsah kalibrační křivky byl v rozmezí 0,05 – 10 ug/l, viz. **obr. 30**. V tomto rozmezí se pohybovaly i koncentrace neopterinu v měřených vzorcích.



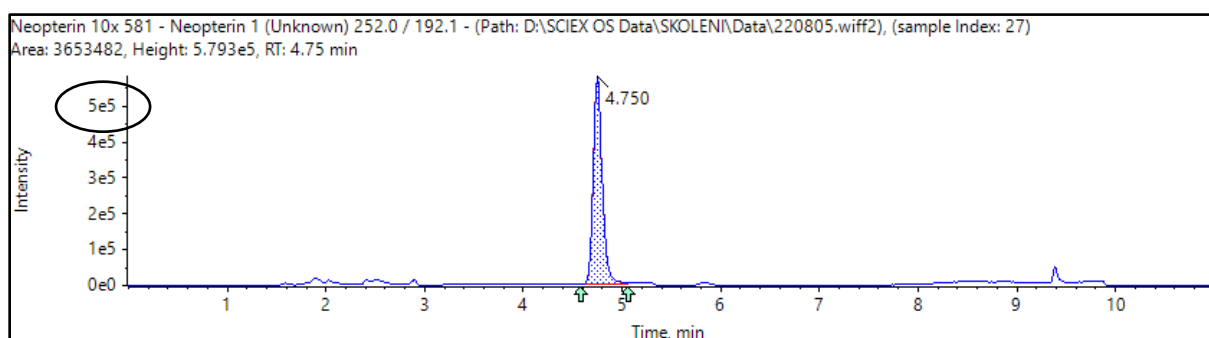
Obr. 30 kalibrační graf stanovení neopterinu 0,05-10 ug/l.

Postup metody po optimalizaci: v použité analytické metodě vyvinuté v rámci projektu je neopterin identifikován porovnáním retenčního času s retenčním časem standardu a shodností intenzit dvou sledovaných přechodů neopterinu ve vzorku a v kalibračním roztoku. Kvantifikace je prováděna na základě hodnot vypočtených pomocí kalibrační křivky metodou kalibrace na vnější standard.

Jako nezbytné se při stanovení neopterinu v odpadních vodách jeví ředění vzorků vzhledem k významnému matričnímu efektu. Matrice silně snižuje ionizaci analytu v hmotnostním detektoru. Ukázka ovlivnění signálu maticí je uvedena na obrázcích, viz. **obr. 31 a 32**. Z porovnání je zřejmé, že u neředěného vzorku je intenzita signálu méně než poloviční oproti vzorku, který byl 10x naředěn.



Obr. 31 Nízká intenzita signálu v neředěném vzorku.



Obr. 32 Zvýšená intenzita signálu v ředěném vzorku.

Při vývoji metody byly měřeny vzorky se standardním přídatkem. Průměrná výtěžnost standardního přídatku při četnosti opakování 10 je 97 % a RSD 12,5. Průměrná výtěžnost kalibračního bodu 0,5 ug/l při četnosti opakování 10 je 101,1 % a RSD 6,2. Mez stanovitelnosti 0,05 ug/l byla stanovena na základě poměru signál:šum 10:1.

Byla vyvinuta a validována analytická metoda stanovení neopterinu v odpadních vodách na principu kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Tato metoda splňuje nároky projektu. Vyvinutou metodou bylo zpracováno přibližně 120 reálných vzorků odebraných převážně v Praze, Brně a Kladně, dále v Pardubicích, Hostivících, Plzni a Rostokách.

Odběry a předúprava vzorků: pro stanovení neopterinu byly odebírány ve většině případů 24hodinové kompozitní vzorky komunální odpadní vody na přítoku na ČOV po hrubém předčištění (za česly). Vzorky byly bezprostředně po odběru dopraveny do laboratoře. Pokud nebylo možné vzorky okamžitě analyzovat, byly zmrazeny při -20 °C. Při této teplotě byly uchovávány až do vlastního stanovení. K odběru a zamražení byly použity polypropylenové nebo polyethylenové vzorkovnice o objemu 500 ml. Vzorek surové odpadní vody skladovaný při teplotě -20°C byl před vlastním stanovením po rozmrazení vytemperován na laboratorní teplotu. Všechny vzorky byly před stanovením přefiltrovány přes filtr z regenerované celulózy o porozitě 0,22 um (Whatman).

Vzorky nebyly konzervovány. Nebylo prokázáno, že by při skladování vzorků při teplotě -20 °C docházelo ke ztrátám monitorovaného analytu.

Celkem bylo odebráno a analyzováno 116 vzorků z 9 odběrných míst. Ve všech analyzovaných vzorcích byl neopterin identifikován a kvantifikován. Minimální stanovená koncentrace byla 0,10 ug/l, maximální koncentrace byla 11,2 ug/l.

3.4.2 Vyhodnocení výsledků stanovení neopterinu

Výsledky stanovení neopterinu ve vybraných vzorcích jsou uvedeny v T4 v Příloze.

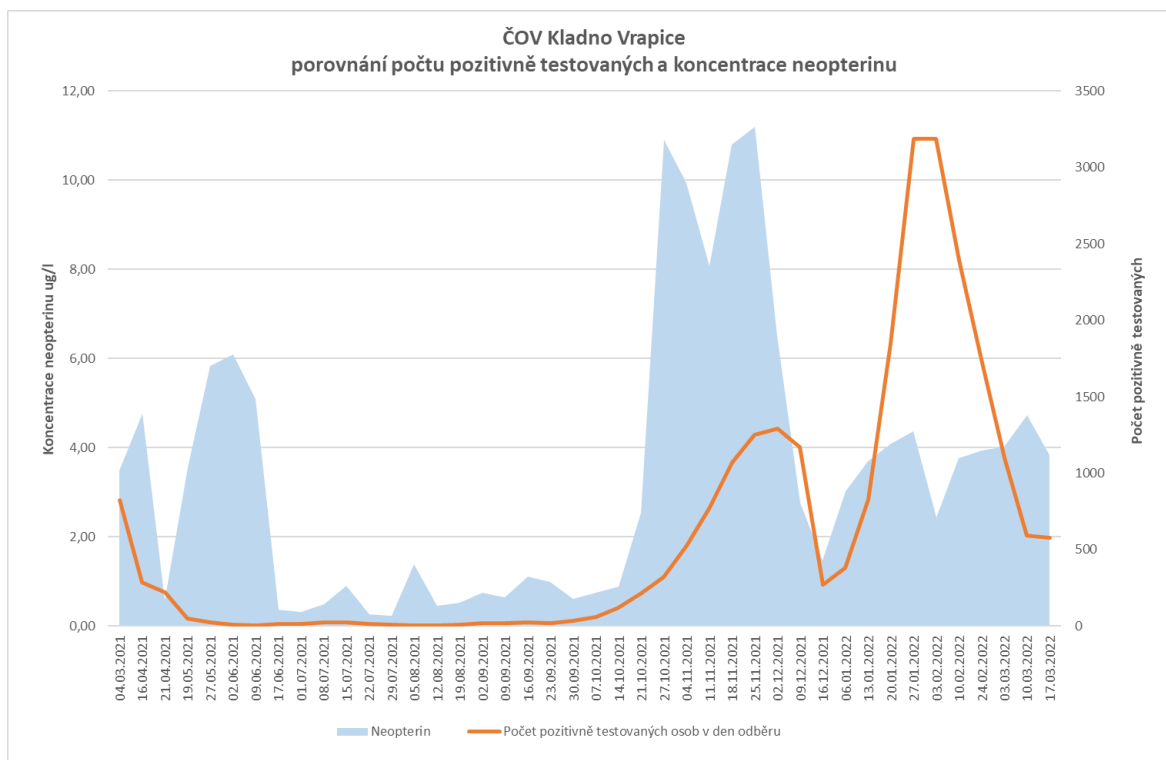
Výběr odběrných míst vycházel z možností ovlivněných aktuální situací ovlivněnou vlastní pandemií – možnosti odběrů na jednotlivých ČOV, dopravy do VÚV, atd. V lokalitách Pardubice, Plzeň, Hostivice a Roztoky proběhlo vždy pouze několik odběrů. V těchto lokalitách byly vzorky pro stanovení neopterinu odebrány čtyřikrát nebo pětkrát (Roztoky u Prahy, Pardubice) s přibližně měsíční frekvencí. V Roztokách bylo stanovení neopterinu v jednom případě realizováno ve vzorcích odebraných jak na přítoku, tak na odtoku z ČOV.

Z tohoto malého počtu stanovení v jednotlivých lokalitách nebylo možné vyvozovat hodnověrné závěry. Při porovnání koncentrace neopterinu na přítoku na ČOV Roztoky a na odtoku v téže ČOV lze konstatovat, neopterin byl v průběhu úpravy odpadní vody téměř odstraněn, z hodnoty 3,3 ug/l poklesl na 0,1 ug/l při mezi stanovitelnosti 0,05 ug/l. Toto konstatování je však spíše zajímavostí, eventuálně by mohlo být využito v případném projektu zaměřeném na sledování neopterinu v čistírenském procesu.

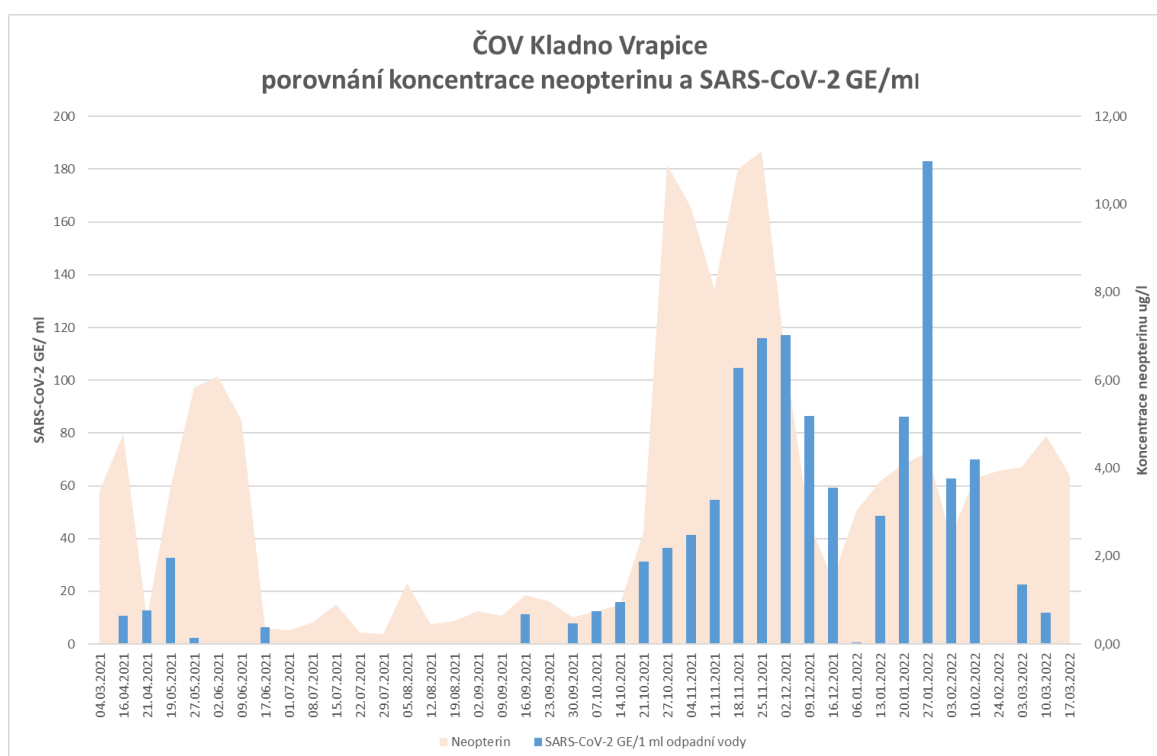
ČOV Kladno (Vrapice)

Na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice) bylo pro stanovení neopterinu odebráno a analyzováno celkem 43 vzorků komunální odpadní vody, do hodnocení byly zahrnuty vzorky odebírané jako 24-hodinové slévané vzorky (S24), pouze vzorky odebrané ve dnech 4. 3. a 16. 4. 2021 byly odebrány jiným způsobem (18-hodinové slévané vzorky; S18). Vzorky byly odebírány od poloviny května 2021 do poloviny března 2022 s týdenní frekvencí. V březnu a dubnu 2021 byly intervaly mezi jednotlivými odběry vzorků vody pro stanovení neopterinu delší. Na této ČOV byly vzorky pro stanovení neopterinu odebírány nejdelší dobu a s nejvyšší frekvencí odběrů.

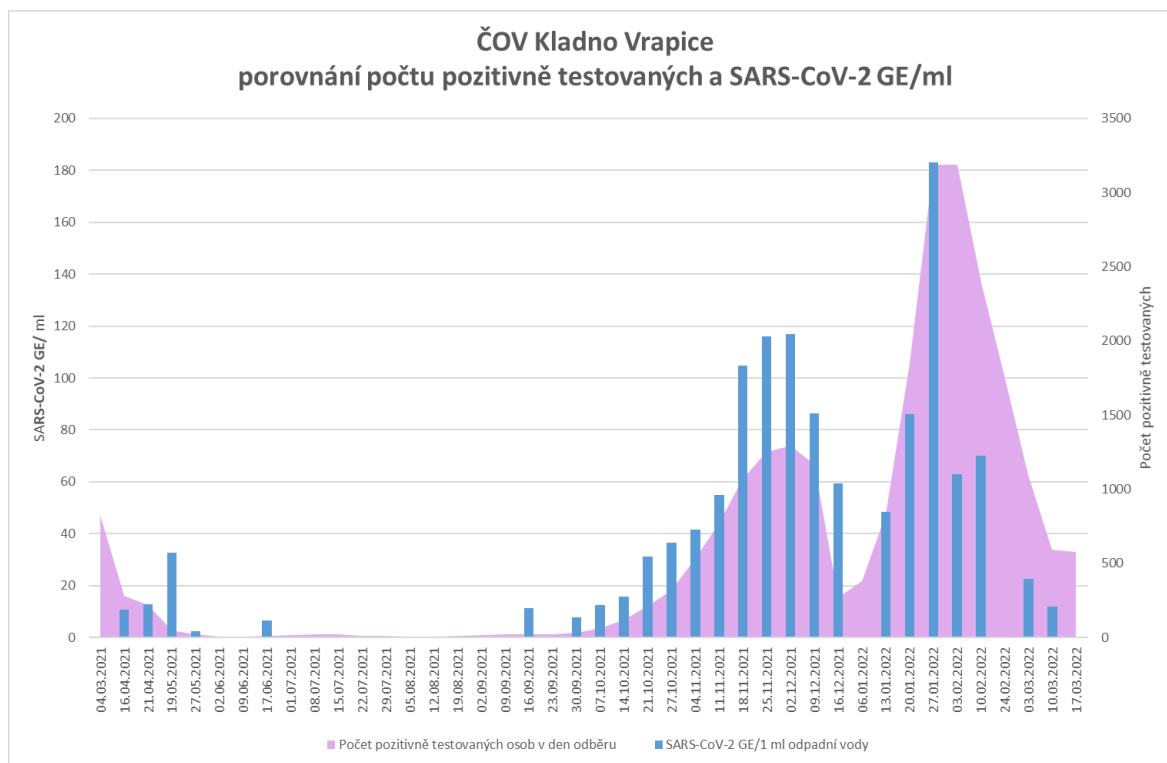
Z **obr. 33** a **34** je zřejmé, že v období jednotlivých vln epidemie covid-19 došlo k významnému zvýšení koncentrací neopterinu v komunální odpadní vodě. Ke zvýšení koncentrace neopterinu docházelo jak v předstihu před údaji o zvyšujícím se počtu pozitivně testovaných osob, tak před zvyšováním hodnot stanovovaných metodou PCR.



Obr. 33 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice).



Obr. 34 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice).



Obr. 35 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Kladno (Vrapice).

Obr. 35 je uveden pro srovnání - vlny zvýšeného počtu pozitivně testovaných osob a množství SARS-CoV-2 GE/1ml odpadní vody jsou těsnější ve srovnání s **obr. 33**, tedy s vlnou zvýšené koncentrace neopterinu a počtu pozitivně testovaných osob.

ÚČOV Praha

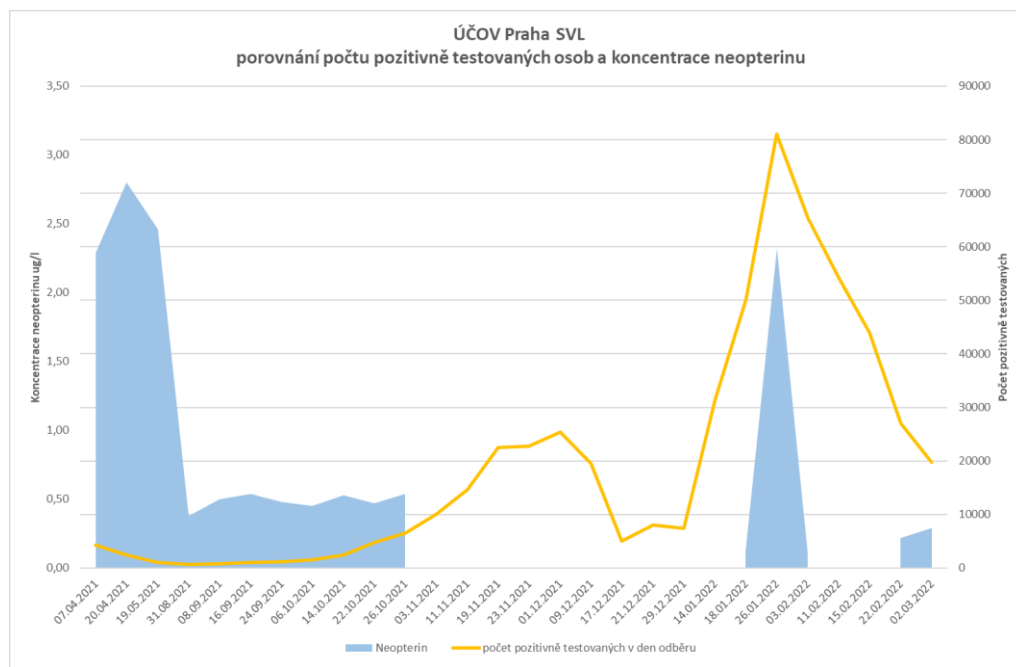
Další monitorovanou aglomerací byla Praha. Odpadní voda z kanalizační sítě je v současnosti rozdělena mezi dvě vodní linky – stávající a novou. Na stávající vodní linku jsou odváděny vody ze stok B, D, E a F, na novou vodní linku stoky ACK. Objem vod zpracovávaných na obou vodních linkách je přibližně stejný. Odebírány byly 24hodinové slévané vzorky (S24), pouze 7. 4. a 20. 4. 2021 byly odebrány 18hodinové slévané vzorky (SA18), a to na obou vodních linkách.

Nebyly dostupné počty nakažených osob podle jednotlivých částí Prahy spadajících k odpovídajícím kanalizačním stokám, proto jsou k porovnání použita u obou stok stejná čísla, tj. počty nakažených v celé Praze.

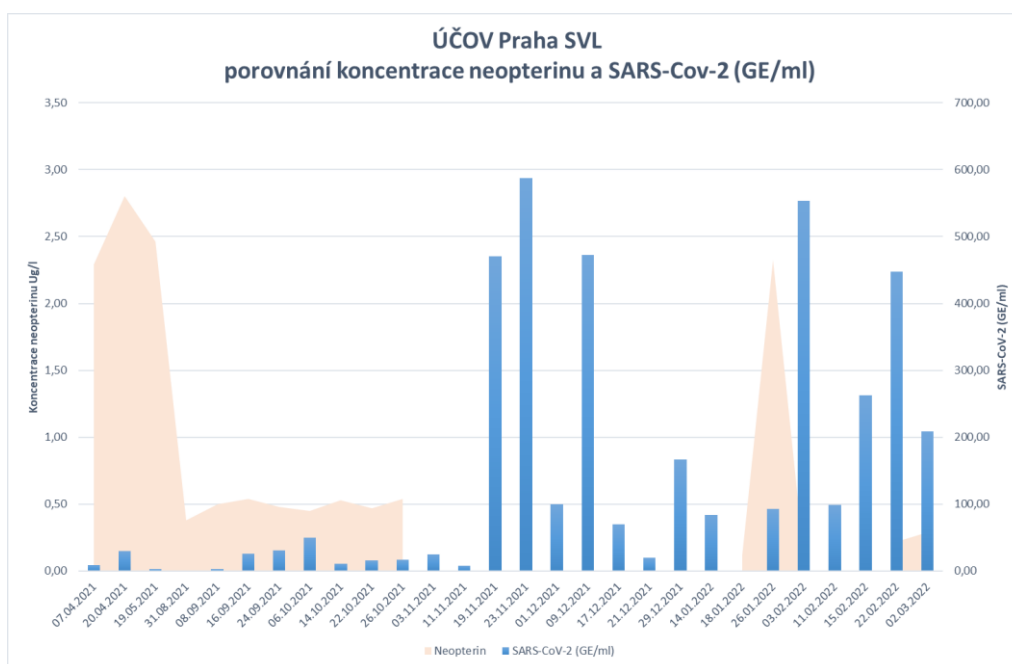
Stávající vodní linka (SVL)

Na stávající vodní linku jsou odváděny komunální odpadní vody spíše ze severní části města. Neopterin nebyl stanovován ve všech vzorcích odebraných na SVL, na **obr. 36** je graficky znázorněno porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v ug/l. I přes to, že analýzy nebyly kontinuální, je i zde zřejmé, že v případě nárůstu počtu pozitivně testovaných osob dochází ke zvyšování koncentrace neopterinu. Ke zvyšování koncentrace neopterinu dochází s předstihem před nárůstem počtu pozitivně testovaných osob. Stejný trend potvrzuje i graf na **obr. 37**, při porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě

na přítoku na ÚČOV Praha – SVL lze opět konstatovat, že ke zvyšování dochází dříve než ke zvyšování hodnot SARS-CoV-2 GE. Celkem bylo na stávající vodní lince analyzováno pro stanovení neopterinu 16 vzorků. Jedná se o relativně malý počet vzorků, také kontinuita odběrů není zcela vhodná, proto je uvedené závěry považovat za orientační.



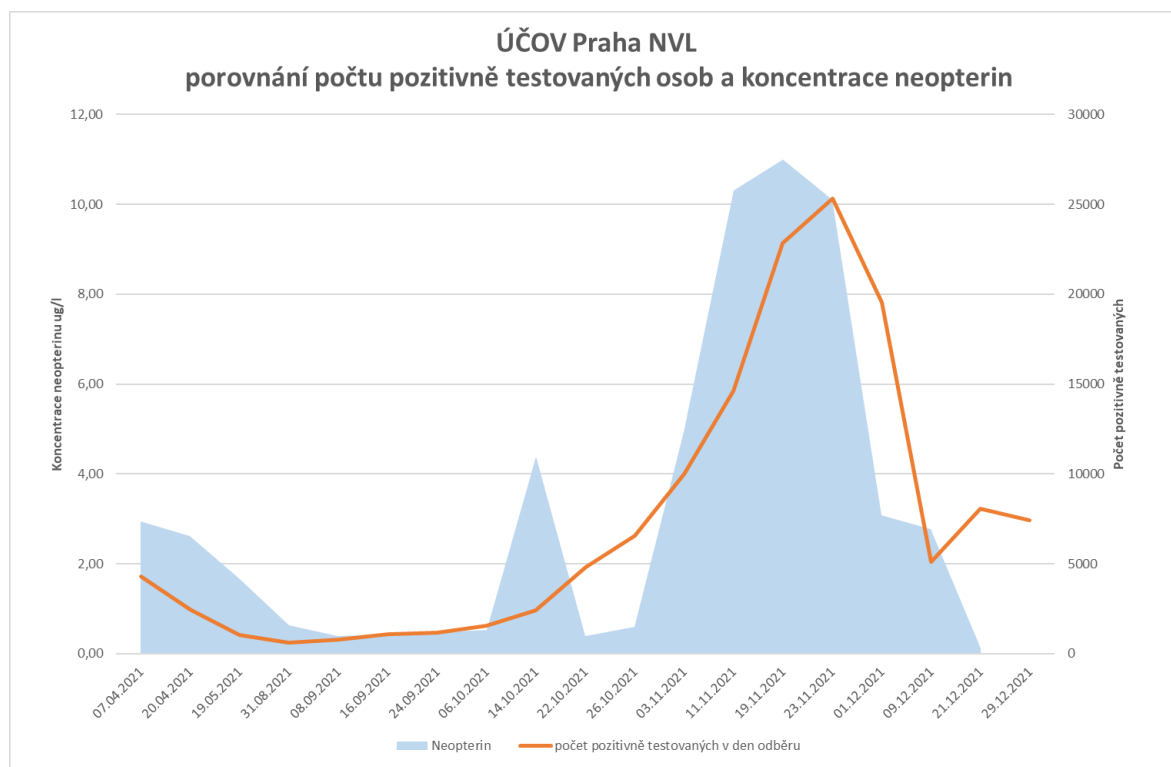
Obr. 36 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – SVL.



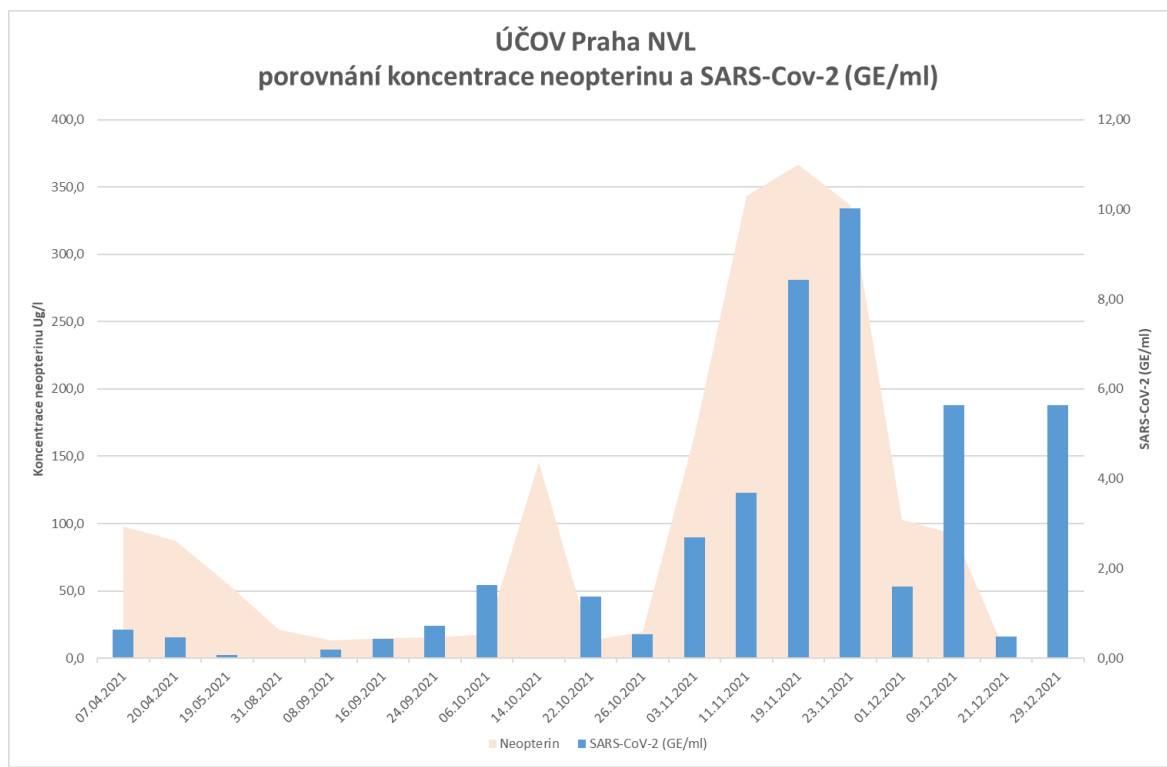
Obr. 37 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – SVL.

Nová vodní linka (NVL)

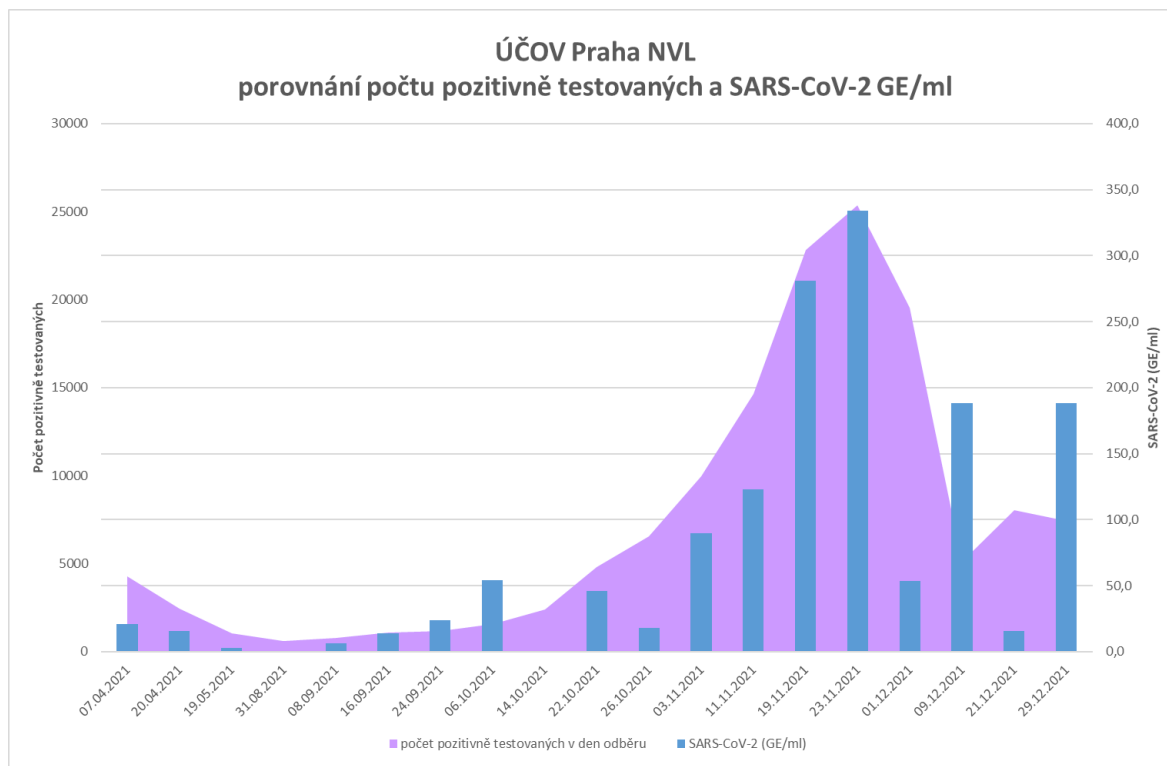
Analýza vzorků odebraných na přítoku na novou vodní linku byla prováděna kontinuálně v roce 2021, a to od počátku dubna do konce prosince s pauzou v letních měsících (červen, červenec). Celkem bylo pro stanovení neopterinu odebráno a analyzováno 18 vzorků. Na **obr. 38, 39 a 40** jsou obdobné grafy jako pro ČOV Kladno (Vrapice) a SVL. Vše, co bylo uvedeno pro dvě předchozí odběrová místa, platí i v tomto případě. Na rozdíl od SVL byly intervaly odběrů v podzimních a zimních měsících příznivější. Opět lze tedy konstatovat, že nejdříve dochází ke zvyšování koncentrace neopterinu, následuje zvyšování koncentrace RNA SARS-CoV-2 a nárůst obou hodnot je potvrzen zvyšováním počtu pozitivně testovaných osob.



Obr. 38 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – NVL



Obr. 39 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – NVL.

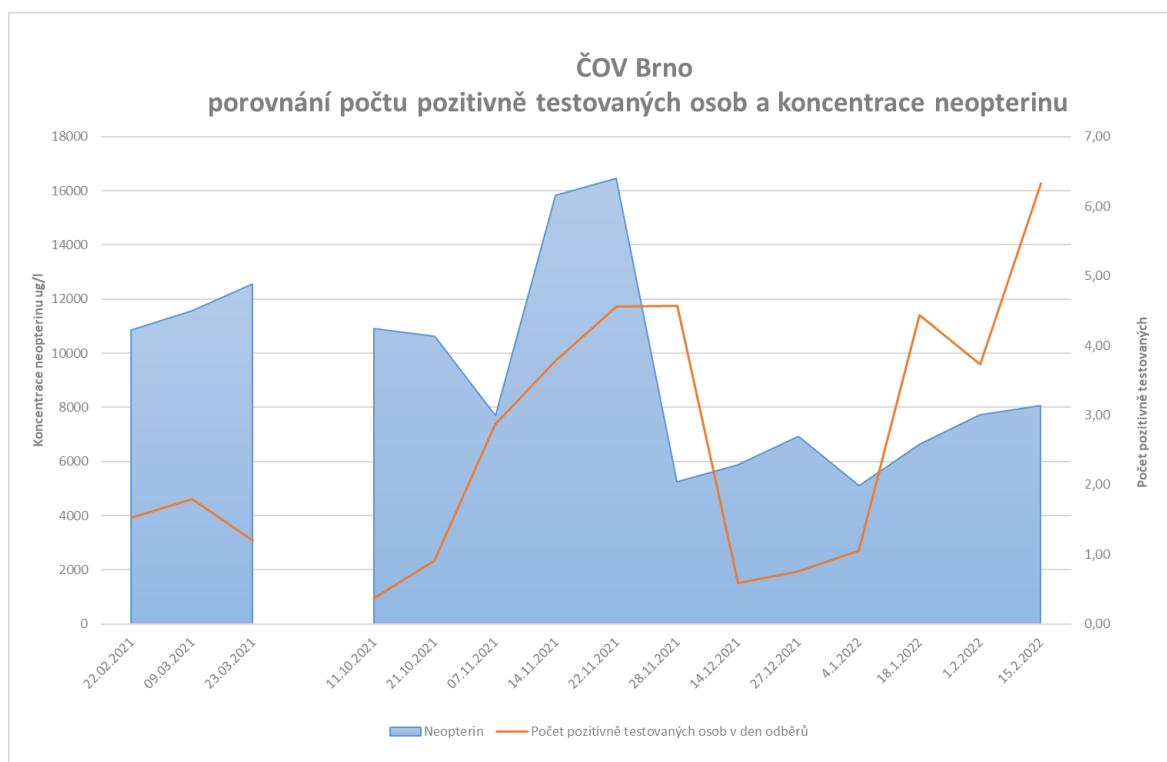


Obr. 40 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběr a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ÚČOV Praha – NVL.

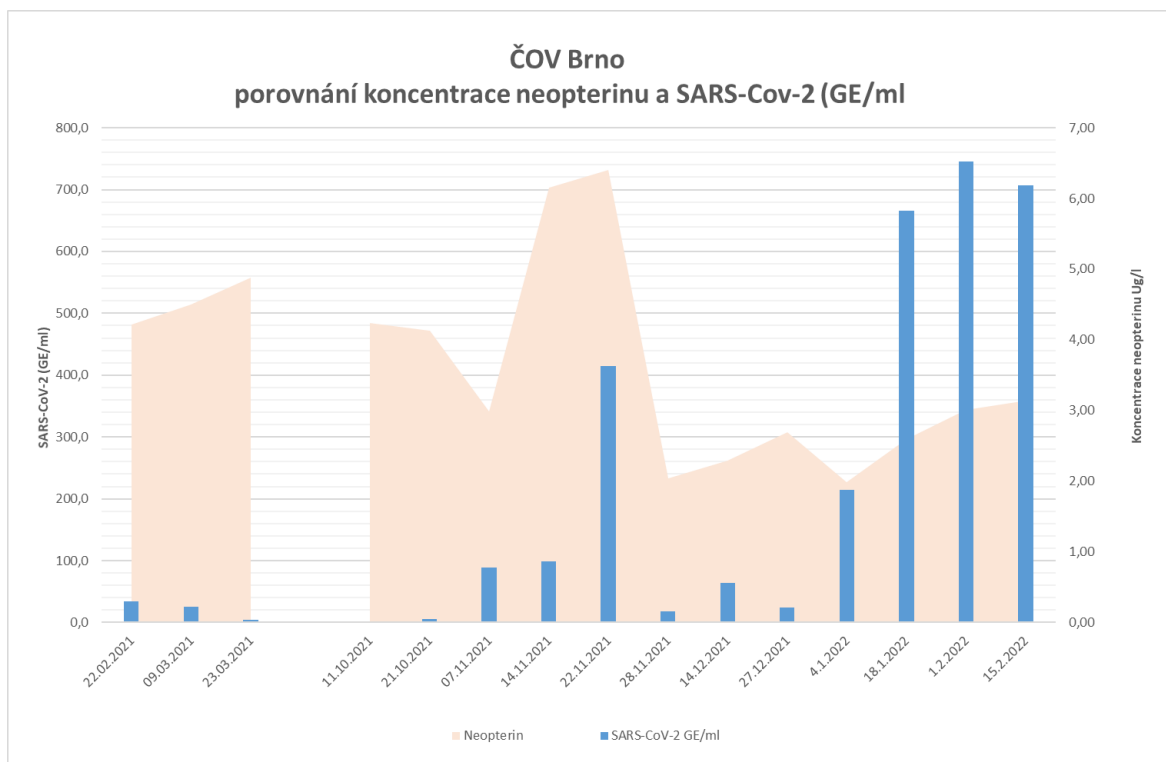
ČOV Brno

Ani na ČOV Brno nebyl ve všech vzorcích odebraných pro stanovení SARS-Cov-2 stanovován neopterin. V březnu 2021 byly analýzy přerušeny a opět zahájeny byly v říjnu 2021 při nástupu další vlny nemoci covid-19. Ukončeny byly v polovině února 2022. Vesměs se jednalo o 24hodinové slévané vzorky (S24), v případě vzorků odebraných dne 9. 3. a 23. 3.2021 se jednalo o 18hodinové slévané vzorky (S18). Celkem bylo pro stanovení neopterinu zpracováno 15 vzorků.

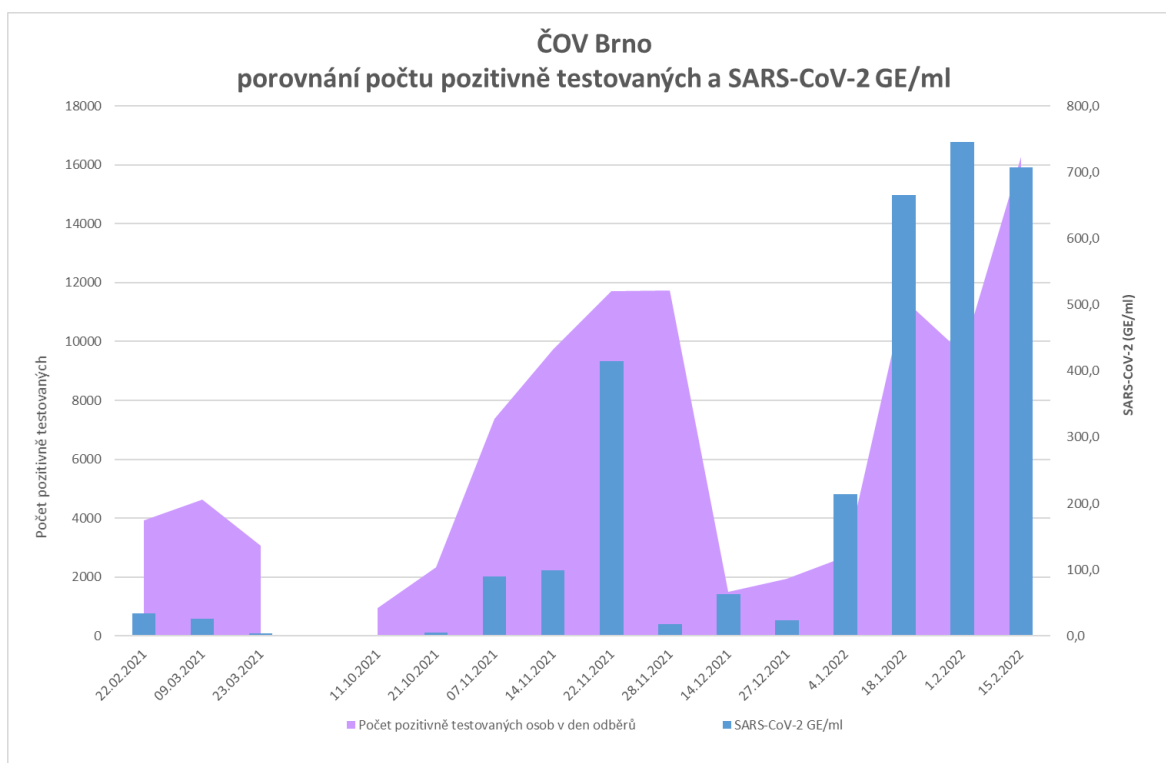
Výsledky analýz vzorků komunální odpadní vody odebrané na přítoku na ČOV Brno potvrzují trendy zjištěné jak na ČOV Kladno (Vrapice), tak na obou vodních linkách ÚČOV Praha, grafické znázornění těchto výsledků je na obr. 41, 42 a 43.



Obr. 41 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběru vzorku a koncentrace neopterinu v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Brno.



Obr. 42 Porovnání koncentrace neopterinu a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Brno.



Obr. 43 Porovnání počtu pozitivně testovaných osob v den odběr a množství SARS-CoV-2 GE/1ml v komunální odpadní vodě na přítoku na ČOV Brno.

3.4.3 Shrnutí výsledků monitoringu neopterinu v odpadních vodách

Neopterin patří k výborným prediktorům zánětlivých chorob, mezi které patří i covid-19. Vzhledem k tomu, že je vylučován močí a tím pádem je součástí komunálních odpadních vod, rozhodli jsme se ověřit možnost jeho využití jako nástroje včasného varování před nástupem této nové choroby přesto, že se jedná o nespecifický biomarker. Pro toto stanovení byla vyvinuta a validována vhodná analytická metoda. Metoda nevyžaduje složitou předúpravu (filtrace, ředění vzorků), vlastní analýza jednoho vzorku je rychlá (cca 15 minut), vyhodnocování naměřených hodnot rovněž.

Vzhledem k prioritnímu zaměření projektu COVMON na stanovení SARS-CoV-2 a jeho využití jako nástroje včasného varování před nástupem zvýšeného výskytu onemocnění covid-19, nebylo možno provést analýzu neopterinu ve všech v projektu odebraných vzorcích. Pro stanovení neopterinu bylo zpracováno celkem 116 vzorků z 9 odběrných míst. Odběrná místa (jednotlivé ČOV) byla vybrána dle aktuálních možností a ochoty ke spolupráci ze strany ČOV. Ve všech odebraných vzorcích bylo možno neopterin stanovit, mez stanovitelnosti byla 0,05 ug/l odpadní vody.

Neopterin je stabilní i ve zmrazených vzorcích, proto nepředpokládáme, že by stanovení bylo ovlivněno skladováním vzorků při -20 °C; ke zmrazení se přistupovalo v případě, že nebylo možno vzorky odpadní vody zpracovat bezprostředně po odběru. Vzhledem k relativně vysokým koncentracím neopterinu v odpadní vodě nevyžadovaly vzorky zakoncentrování před vlastní analýzou, po filtraci přes filtr z regenerované celulózy o porozitě 0,22 um byly kvůli snížení matričního efektu vzorky 10x ředěny ultračistou vodou. Ke kvantifikaci byla použita metoda kalibrace na vnější standard.

Ve všech lokalitách monitorovaných pro analýzu neopterinu delší dobu a s vyšší frekvencí odběrů byly pozorovány stejné trendy přesto, že se jednalo o aglomerace a ČOV s rozdílným počtem obsluhovaných obyvatel (Kladno, Brno, Praha). Je možné, že dochází ke ztrátám v kanalizační síti – degradace, záchyt na pevných částicích obsažených v odpadní vodě a na nárostech v kanalizační síti, ale tato sledování nebyla v rámci projektu COVMON prováděna. Vzhledem k tomu, že cílem bylo zjištění trendů, tj. nárůst či pokles množství neopterinu v odpadní vodě, nebylo ani aktuálně nutné se touto problematikou zabývat.

Neopterin je nespecifický bioindikátor zánětlivých onemocnění, nelze tedy zjištěné koncentrace vztahovat pouze k počtu osob nemocných jednou chorobou, v tomto případě covid-19.

Lze předpokládat, že se neopterin vyskytuje v odpadní vodě stále, ale nemáme k dispozici žádná data mimo období pandemie nemoci covid-19.

Bylo by zajímavé sledovat koncentrace neopterinu i v průběhu dalšího roku či let a zjistit, zda dochází k nárůstu koncentrace neopterinu např. při epidemii chřipky, která byla díky restrikcím v období šíření nemoci covid-19 zcela potlačena.

Medián inkubační doby pro covid-19 je 4 - 6 dní, ale může trvat také až 14 dní. Neopterin se dle literárních zdrojů objevuje v moči již třetí den po infikování pacienta (Al-kuraishy 2021). Při aplikaci epidemiologického přístupu k odpadním vodám je tedy analyzovatelný ještě dříve, než se u pacienta projeví příznaky choroby.

Výsledky ukázaly, že nejdříve dochází ke zvyšování koncentrace neopterinu, následuje zvyšování počtu virových částic SARS-CoV-2 a nárůst obou hodnot je potvrzen zvyšováním počtu pozitivně testovaných osob.

Na základě v projektu COVMON zjištěných skutečností lze konstatovat, že neopterin jako prediktor zánětlivých onemocnění se jeví být vhodným nástrojem pro monitoring těchto onemocnění z pohledu epidemiologického přístupu k odpadním vodám (SIMS 2020) a bylo by případné zařadit ho mezi sledované látky i jako nástroj včasného varování před nástupem infekčních zánětlivých onemocnění.

3.5 Testování klinických vzorků

3.5.1 Stanovení viru SARS-CoV-2 a neopterinu v moči

Metodika studie pediatrických pacientů: S nástupem zhoršující se epidemiologické situace a vzrůstajícími počty nemocných byla na konci roku 2021 zahájena studie průkazu výskytu RNA SARS-CoV-2 a dalších markerových molekul v moči dětských pacientů. Tato studie po schválení Etickou komisí a souhlasu rodičů k poskytování vzorků moči dětských pacientů byla prováděna v ordinaci pediatrie Roudnice n. Labem s cílem prokázat vylučování RNA SARS-CoV-2 a neopterinu jako nespecifického markeru provázejícího virová onemocnění močí. Do studie byli zahrnuti dobrovolníci ve věkovém rozmezí 2 - 19 roků Studie byla cílena na pacienty v první fázi onemocnění u příznakových jedinců s pozitivním prokázaným pozitivním testem PCR na přítomnost RNA SARS-CoV-2 od 1 do 3 dnů od projevu prvních příznaků nemoci. Ve sledovaném období v prvním pololetí roku 2022 byly podchyceny případy nemocí v období zvláště vysokého výskytu onemocnění covid-19 v populaci (druhá vlna epidemie). Tato studie měla za cíl prokázat jako možnou cestu vstupu virových částic do odpadních vod močí pacientů. Dalším markerem onemocnění u pozitivně testovaných příznakových pacientů, který studie využila a je průvodcem infekčních virových onemocnění, byl neopterin. Výsledky obou sledovaných parametrů by takto mohly být využity pro predikci zhoršující se situace a nástupu další vlny onemocnění v populaci, případně v určité zájmové lokalitě v návaznosti na napojení lokality na ČOV. Průkazů o vylučování RNA SARS-CoV-2 není mnoho, některé literární údaje se rozcházejí. Proto jsme studii cílili na prokazatelně příznakové pacienty. Vzorky moči pacientů byly analyzovány na přítomnost RNA SARS-CoV-2 v laboratoři VÚVeL metodou RT-PCR, přičemž izolace nukleových kyselin byla provedena komerčně dostupnou soupravou Viral RNA Mini Kit (Qiagen) dle návodu výrobce. Ke stanovení specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 byly použita stejná metoda (stejně cíle) RT-qPCR, jako u analýz odpadních vod.

Výsledky naší studie prokázaly u téměř 30 % příznakových jedinců vylučování RNA SARS-CoV-2 močí, což je námi očekávaný výsledek. Podle některých údajů v literatuře se RNA viru močí vylučuje jen u mizivého procenta příznakových pacientů, tj. u <5 % potvrzených infekcí (Peng *et al.*, 2020). Rovněž koncentrace neopterinu v moči se u nemocných s covid-19 prokazatelně zvyšuje.

3.5.2 Stanovení neopterinu v moči

U dětských pacientů s onemocněním COVID-19 s prokázaným PCR testem bylo provedeno vyšetření stejných (totožných) vzorků močí současně i na koncentraci neopterinu. Současně byla v každém vzorku moči stanovena hodnota kreatininu. Výsledek byl vyjádřen poměrem neopterin/kreatinin v jednotkách μmol neopterinu/mol kreatininu.

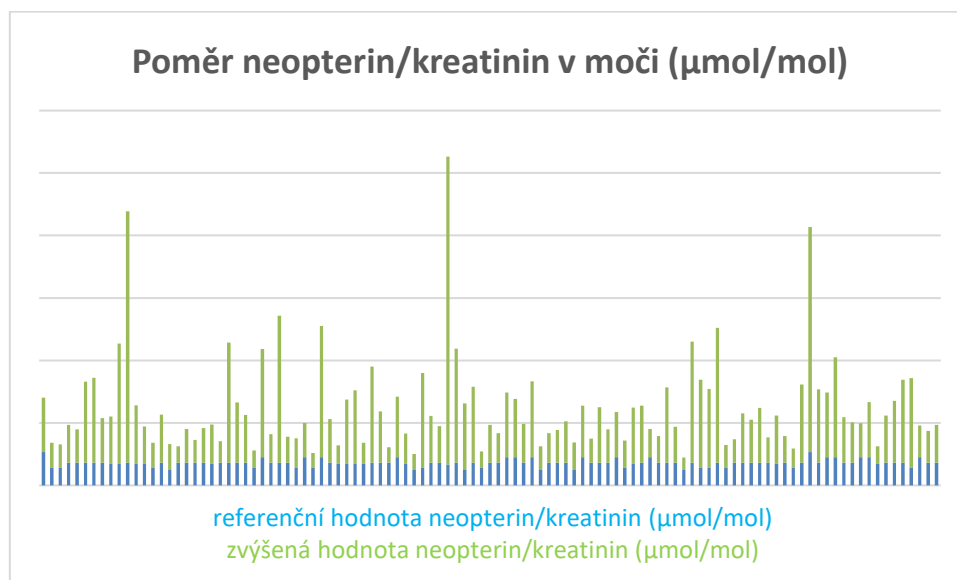
Vzorky močí na neopterin i kreatinin byly stanoveny ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové metodou HPLC. Neopterin v moči byl stanoven pomocí upravené metodiky (Melichar *et al.*, 2006). Před analýzou byly vzorky moči centrifugovány po dobu 45 s při 14 000 x g. Poté bylo odebráno 100 μl moči a zředěno 1 ml fosfátového pufru (15 mmol/L, pH 6,45), vzorky byly zfiltrány pomocí mikrotitrační desky s filtry. Jeden μl filtrátu byl nastříkovan na kolonu. Pro separaci neopterinu a kreatininu v moči byl použit chromatografický systém Prominence LC 20 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s UV a fluorescenčním detektorem, stacionární fází byly dvě sériově zapojené monolitní kolony RP-18e (4.6mmx50mm, 3.0mmx100mm) jako mobilní fáze byl použit 15 mmol/l fosfátový pufr o pH 6,45. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Celkový čas analýzy byl 5 min. Neopterin byl detekován fluorescenčně (353 nm excitační a 438 emisní vlnová délka) a současně kreatinin byl detekován pomocí UV při 235 nm.

Z celkového počtu 106 analyzovaných vzorků močí bylo u 94 vzorků prokázáno výrazné zvýšení hodnoty neopterinu oproti referenčním hodnotám. Pouze u 12 vzorků byla hodnota na úrovni spodní hranice

referenční hodnoty nebo těsně pod její hodnotou. Hodnota neopterinu/kreatininu byla ve vzorcích dětských pacientů s covid-19 zvýšena v průměru až šestinásobně.

Výsledky jsou dostatečně průkazné a potvrzují správnost hypotézy o vhodnosti sledování neopterinu v odpadních vodách v souvislosti s vylučováním tohoto biomarkeru močí ve zvýšených hodnotách v souvislosti s epidemií virových onemocnění včetně SARS-CoV-2.

Výsledky studie jsou uvedeny graficky, viz. **obr. 44**.



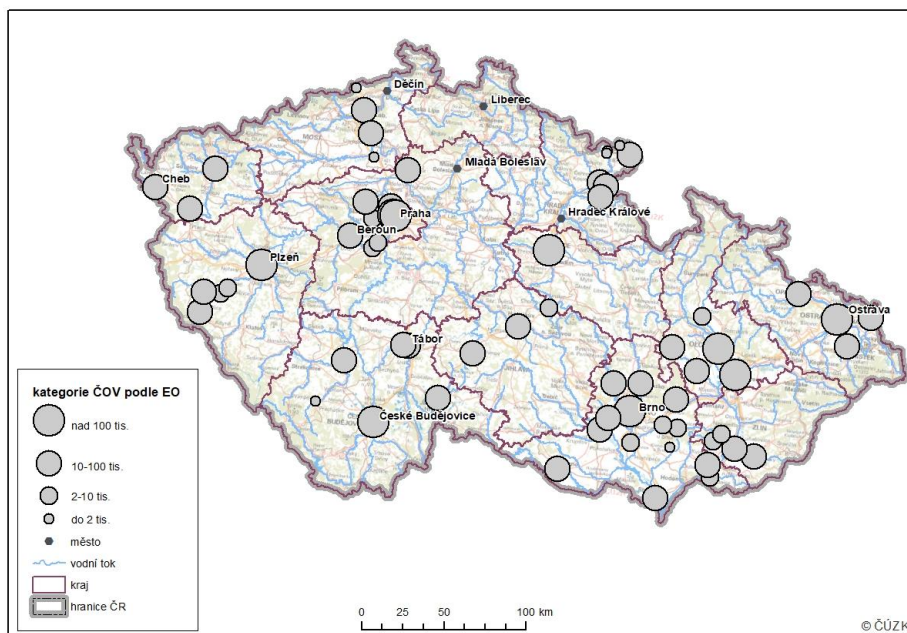
Obr. 44 Hodnoty neopterinu/kreatinin (μmol/mol) v moči dětských pacientů s covid-19.

3.6 Výsledky monitoringu RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách

Za účelem získání analytických dat, pro ověření možnosti vytvoření systému včasného zachycení varovného signálu nastupující nebo probíhající epidemiologické situace v ČR a jeho lokalizace byl prováděn systematický monitoring komunálních odpadních vod SARS-CoV-2. Kompletní datová sada obsahuje data z pilotního monitoringu v roce 2020, získaná v rámci řešení grantu VÚV, data získaná v rámci projektu COVMON v letech 2021 a 06/2022 a od 07/2022 data z pokračujícího grantu VÚV, financovaného z institucionálních prostředků MŽP.

3.6.1 Etapy monitoringu ČOV

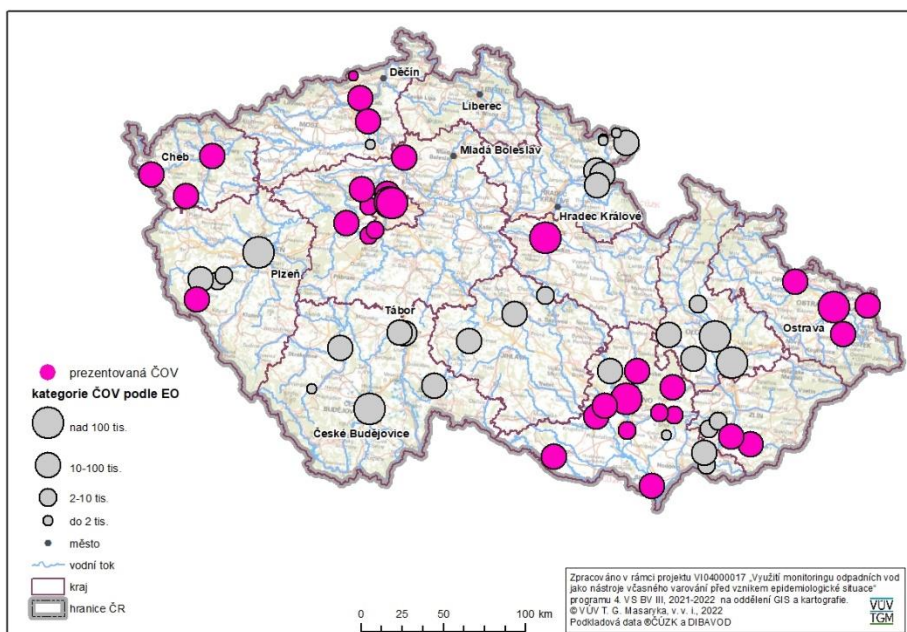
Celkem bylo v rámci monitoringu sledováno 66 ČOV různých velikostních kategorií, výběr byl proveden, tak aby byly zařazeny různé typy ČOV se zohledněním dostupnosti vzorků (logistika svozu, ochota provozovatelů). Do konce listopadu 2022 bylo odebráno více než 900 vzorků. Bližší popis ČOV je uveden v kap. 3.3, lokalizace je znázorněna na **obr. 45**. V průběhu sledování byly analyzovány různé typy vzorků (prosté, slévané 24hodinové vzorky typu C nebo B).



Obr. 45 Lokalizace 66 sledovaných ČOV na území ČR.

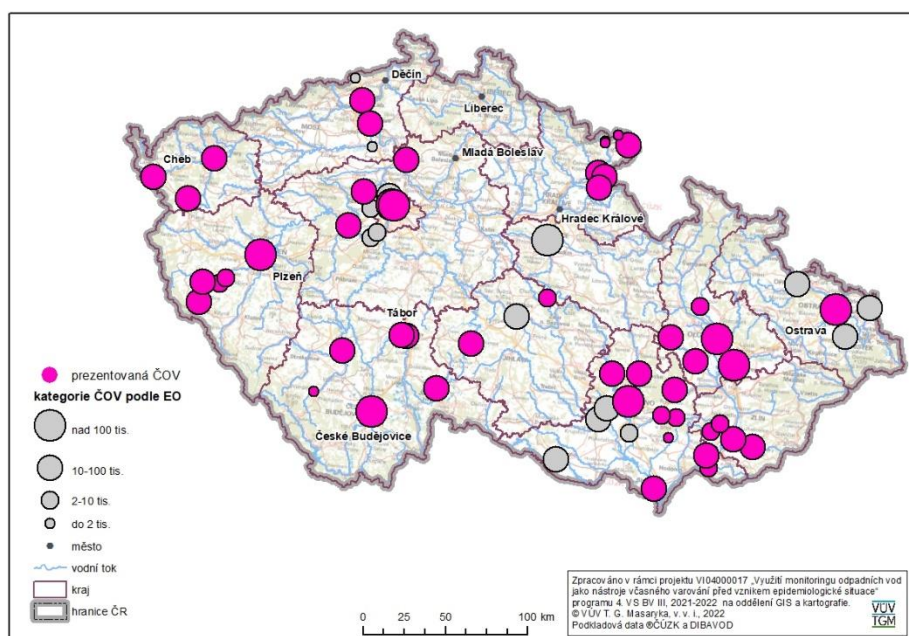
Monitoring probíhal v následujících 4 etapách:

1. etapa – 04-06/2020: bylo zařazeno 34 ČOV (vč. 6 ČOV, sledovaných SOVAKem. Etapa byla charakteristická nízkou prevalencí nemoci covid-19 na celém území ČR. Výběr ČOV směřoval do oblastí s pozitivními nálezy infikovaných osob. Průkaz SARS-CoV-2 byl prováděn pouze kvalitativně. Lokalizace sledovaných ČOV je uvedena na **obr. 46**. Odběry i analýzy byly financovány z grantu VÚV.



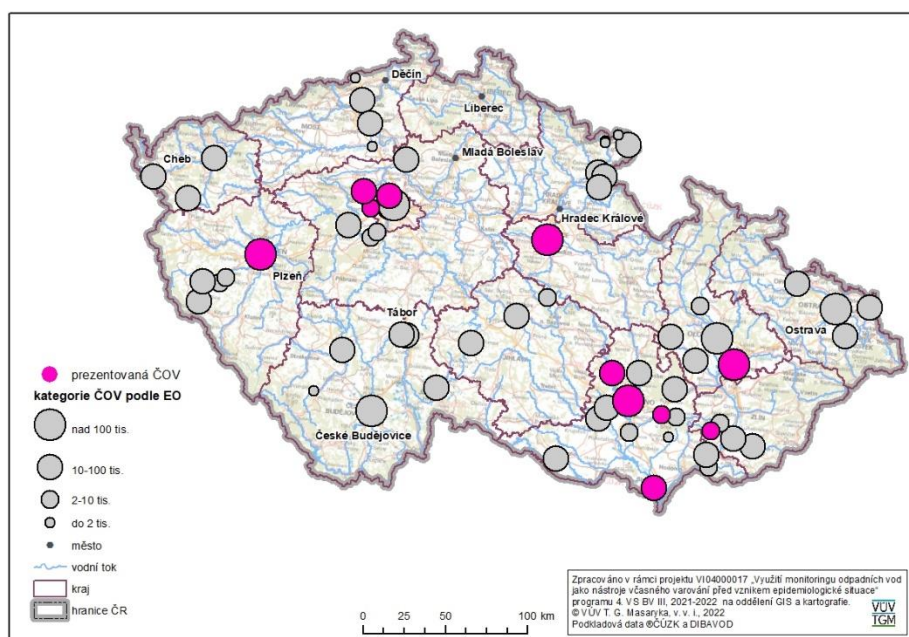
Obr. 46 Lokalizace 34 ČOV sledovaných v 1. etapě monitoringu.

2. etapa – 11/20 až 12/20: ve druhé etapě bylo odebráno 266 vzorků ze 49 ČOV, viz. **obr. 47** s nízkou četností odběrů (1-2x). Byla zachycena 2. vlna epidemie. Bylo provedeno určení citlivosti metody. Odběry byly financovány z grantu VÚV, analýzy zamražených vzorků z projektu COVMON.



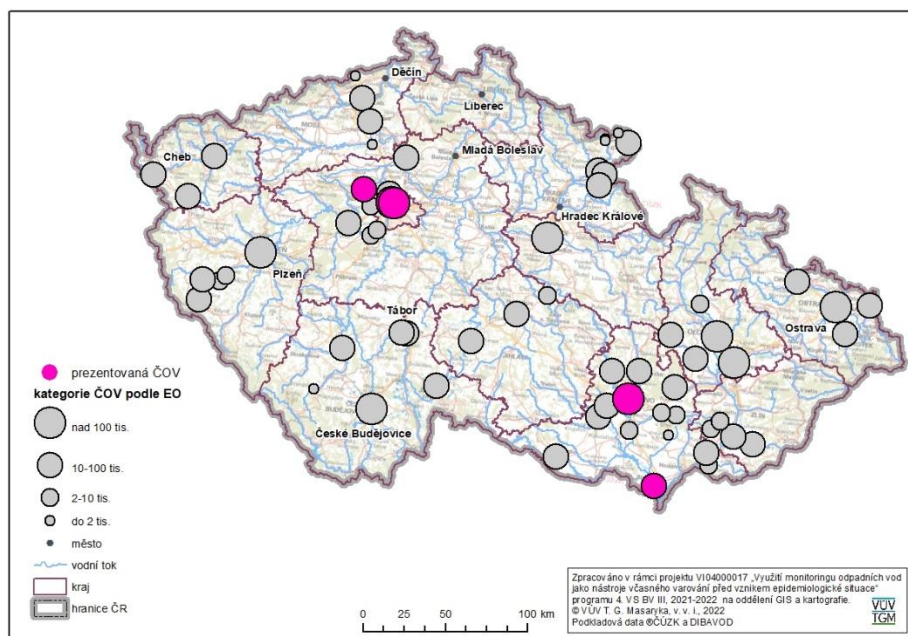
Obr. 47 Lokalizace 49 ČOV sledovaných ve 2. etapě monitoringu.

3. etapa – 02/21 až 05/21: ve 3. etapě bylo odebráno 167 vzorků ze 13 ČOV s vyšší četností (1x za 1-2 týdny). Bylo vybráno ČOV různých typů. Byl zachycen nástup, vrchol a pokles 3. vlny, viz. **obr. 48**. V rámci etapy byly prováděny pokusy vedoucí k ověřování procesu vzorkování – viz kap. 3.2.



Obr. 48 Lokalizace 13 ČOV sledovaných ve 3. etapě monitoringu.

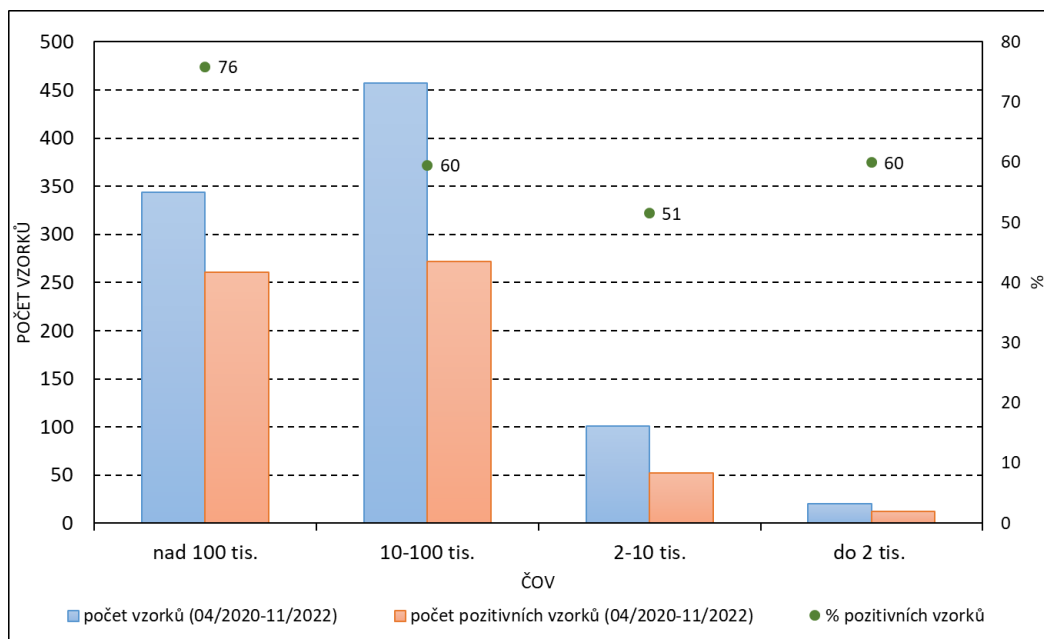
4. etapa – od 05/21- 12/22: v poslední etapě bylo odebráno cca 400 vzorků na 4 vybraných ČOV, viz. **obr. 49**, tj. stávající (SVL) a nová (NVL) vodní linka ÚCOV Praha, ČOV Brno (Modřice), ČOV Kladno (Vrapice) a ČOV Břeclav. Etapa byla zaměřena na dlouhodobé sledování průběhu epidemie a možnosti predikce změn vývoje. Etapa poskytla dostatek dat pro statistické hodnocení. Výsledky etapy byly pravidelně prezentovány na www.covmon.vuv.cz, včetně porovnání s průběhem počtů klinicky prokázaných infekcí a komentářem aktuálního stavu.



Obr. 49 Lokalizace 4 ČOV sledovaných ve 4. etapě monitoringu.

3.6.2 Porovnání vhodnosti velikostních kategorií ČOV k WBE monitoringu

RNA viru byla detekována ve vzorcích ČOV všech kategorií. Při porovnání velikostních kategorií ČOV bylo zjištěno, že největší podíl pozitivních nálezů byl zjištěn v kategorii nad 100 tis. EO (76 %). Velmi vysoká úspěšnost záchytu (60 %) byla v kategoriích 10–100 tis. EO a do 2 tis. EO V kategorii 2–10 tis. EO byly vzorky s prokázanou RNA SARS-CoV-2 v procentuálním podílu kolem 50 %, viz. **obr. 50**. Tyto výsledky ukazují, že pro epidemiologické analýzy lze použít všechny kategorie ČOV.



Obr. 50 Porovnání záchytu pozitivních vzorků v jednotlivých velikostních kategoriích ČOV.

3.6.3 Epidemiologická data použitá pro hodnocení

Výsledky monitoringu odpadních vod byly porovnávány s verifikovanými počty pozitivně testovaných osob, ze systému ISIN, průběžně zpracovávaných Oddělením biostatistiky SZÚ pro konkrétní sledované lokality. Data do ISINu jsou vkládána z Krajských hygienických stanic, systém hlášení zahrnuje nejen případy onemocnění koronavirem, ale řadu dalších infekčních nemocí. V údajích o každém případě je zaznamenáno množství údajů, ale kvalita dat není vždy stoprocentní. Pacienti byli zařazeni podle místa trvalého bydliště, což nemusí vždy souhlasit se skutečným pobytem osoby.

Pro možnost porovnání nejaktuálnějších výsledků monitoringu odpadních vod byly vždy pro aktuální období využívány volně dostupné údaje z covidových map nebo veřejně přístupných webů pro jednotlivá města (v současné době <https://obce.nery.cz>).

Pro porovnání výsledků jednotlivých ČOV s celkovými počty pozitivně testovaných osob v celé ČR byly používány údaje z <https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/covid-19>.

Způsob použití epidemiologických informací o počtech osob s pozitivním testem na covid-19 v monitorovaných oblastech, tj. městech a obcích napojených na příslušné ČOV: do výpočtu byly zahrnuty osoby 10 dnů před datem prvních příznaků do 3. dne po provedeném PCR testu, tj. 14denní interval.

3.6.4 Porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách s počty pozitivně testovaných osob

Pro posouzení možnosti využití dat ke sledování epidemické situace bylo nezbytné korelovat množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách s počty pozitivně testovaných osob. V rámci monitoringu bylo získáno velké množství dat o různé vypovídací hodnotě. Průběžné porovnání obou skupin dat ukazovalo velmi dobrou shodu a tudíž velký potenciál využití zvoleného přístupu ke sledování trendu vývoje a predikci nástupu nebo poklesu epidemie. Výsledky jsou uvedeny v následujících grafech, zdrojová data jsou uložena v tabulkovém souboru **T1 Výsledky_tabelárně**.

Údaje o množství virové RNA jsou v grafech uvedeny v GE (genomové ekvivalenty) v 1 ml odpadní vody. Spojnice trendu hodnot v grafech je vytvořena pomocí klouzavého průměru.

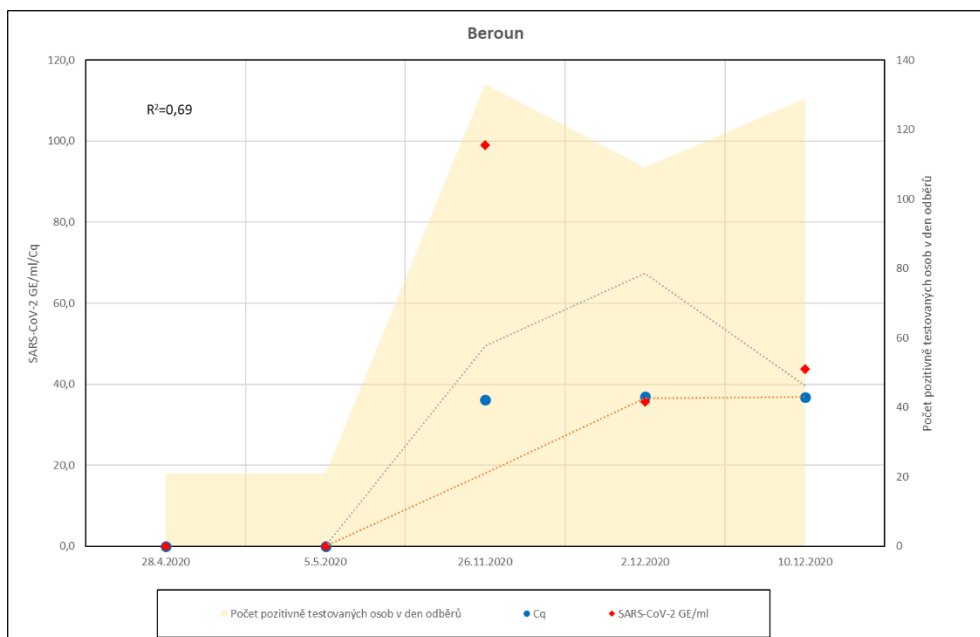
Citlivost a přesnost metodického přístupu je závislá na skupině epidemiologických (mj. množství a doba vylučování viru) a vodohospodářských proměnných (naředění virové RNA ve vzorku; podíl průmyslových odpadních vod, srážkových vod a komunálních odpadních vod; reprezentativnost a homogenita odebraného vzorku; režim odběrů vzorků (prosté/slévané, pracovní dny/víkendy); degradace RNA v dlouhé kanalizační síti, způsob a doba uchování vzorku, aj.). Vliv na korelaci obou skupin údajů má také robustnost epidemiologických dat a robustnost analytické metody (rozdíly ve výsledcích mezi laboratořemi). Tato data jsou ovlivněna aktuálním epidemickým režimem, který určuje množství osob, které jsou testovány, tj. četnost a způsob testování, mobilita osob a množství prováděných testů.

3.6.5 Výsledky monitoringu na jednotlivých ČOV

ČOV Beroun

Tab. 10 ČOV Beroun.

ČOV Beroun	
etapa	1., 2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
počet napojených obyvatel	30 354
nejnižší záchyt nakažených	109
-typ vzorku	P
-datum	12/20
-množství GE/ml	35,8
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	3
vhodná pro WBE	ano

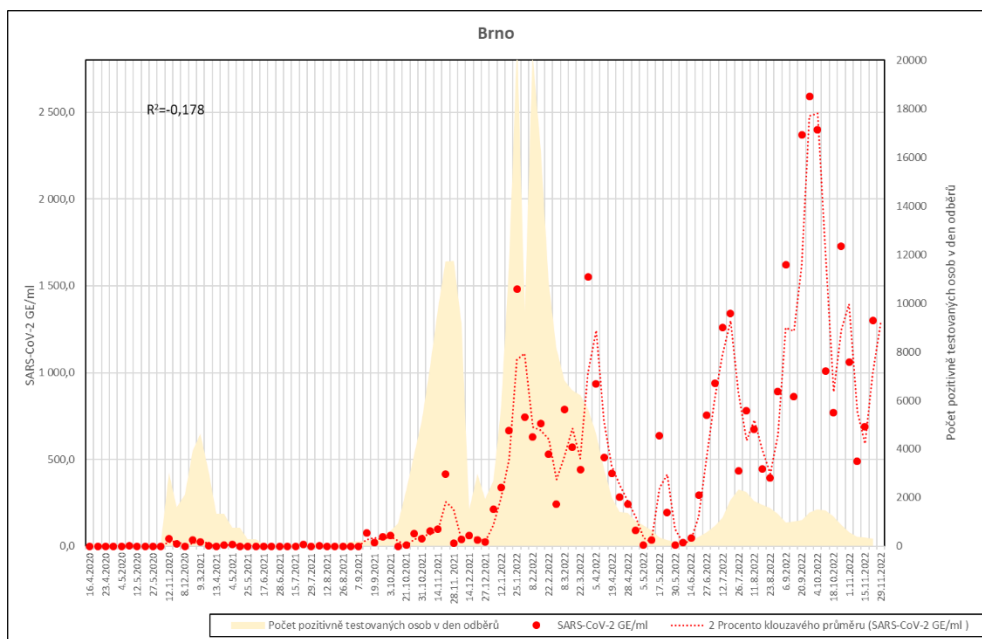


Obr. 51 ČOV Beroun.

ČOV Brno

Tab. 11 ČOV Brno.

ČOV Brno	
etapa	1. - 4.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
počet napojených obyvatel	426 483
nejnižší záchyt nakažených	30
-typ vzorku	S24
-datum	5/20
-množství	kvalitativně
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná (1/3 oddílná)
podíl průmyslových odpadních vod v %	30
vhodná pro WBE	Ano

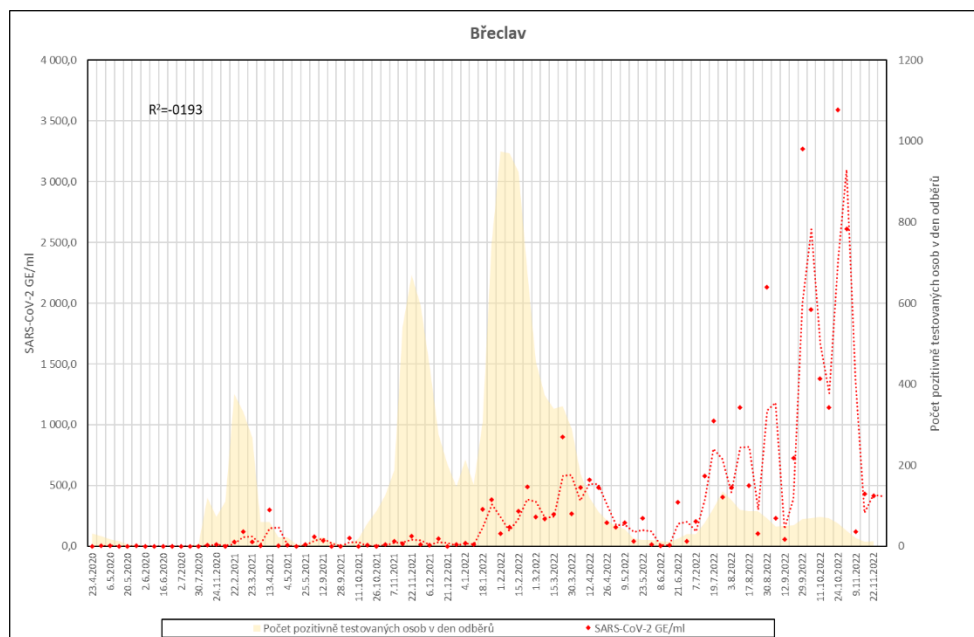


Obr. 52 ČOV Brno.

ČOV Břeclav

Tab. 12 ČOV Břeclav.

ČOV Břeclav	
etapa	1. - 4.
kategorie dle EO	10-100 tis.
počet napojených obyvatel	243 000
nejnižší záchyt nakažených	2
-typ vzorku	S24
-datum	5/20
-množství	kvalitativně
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná (1/3 oddílná)
podíl průmyslových odpadních vod v %	30
vhodná pro WBE	ano

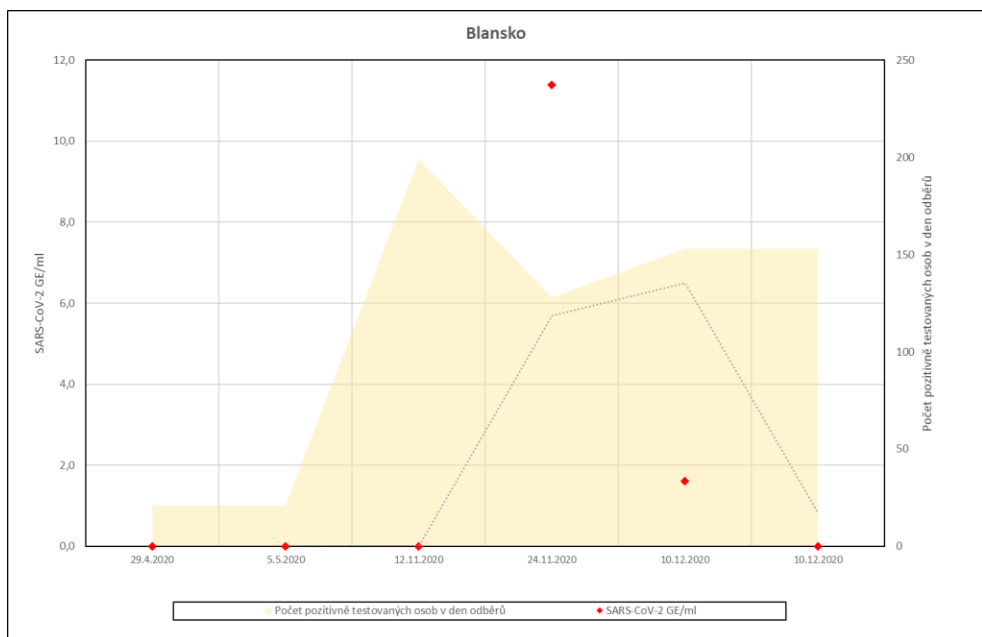


Obrázek 53 ČOV Břeclav.

ČOV Blansko

Tabulka 13 ČOV Blansko.

ČOV Blansko	
etapa	2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
počet napojených obyvatel	21 483
nejnižší záchyt nakažených	128
-typ vzorku	S24
-datum	11/20
-množství	89 GE/ml
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	8
vhodná pro WBE	ano



Obrázek 54 ČOV Blansko.

ČOV Broumov

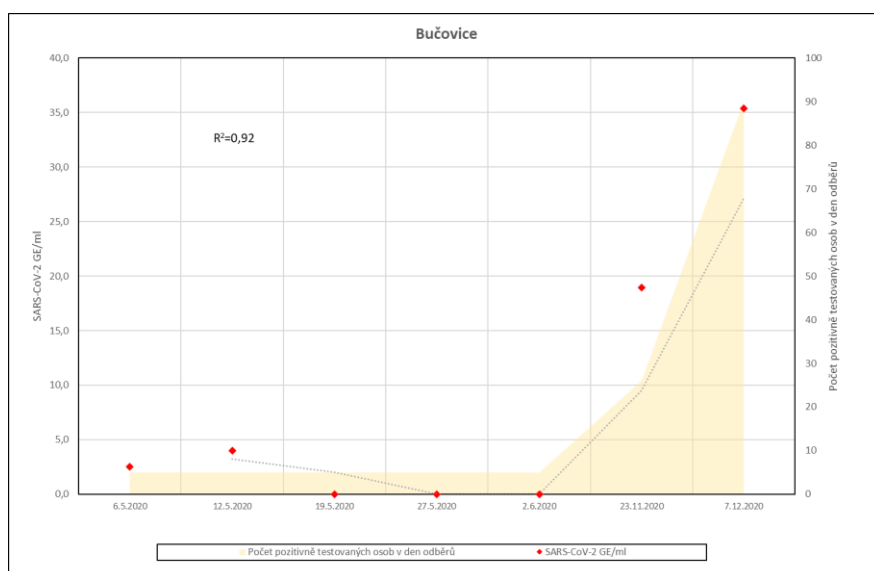
Tab. 14 ČOV Broumov.

ČOV Broumov	
etapa	2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
počet napojených obyvatel	15 530
nejnižší záchyt nakažených	47
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství	59 GE/ml a 35,9 GE/ml
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	45
vhodná pro WBE	ano

ČOV Bučovice

Tab. 15 ČOV Bučovice.

ČOV Bučovice	
etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	2-10 tis.
počet napojených obyvatel	9 861
nejnižší záchyt nakažených	0
-typ vzorku	S24 i P
-datum	5/20
-množství	kvalitativně
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	20
vhodná pro WBE	ano (dobrá korelace); zachyceni nenahlášení nakažení



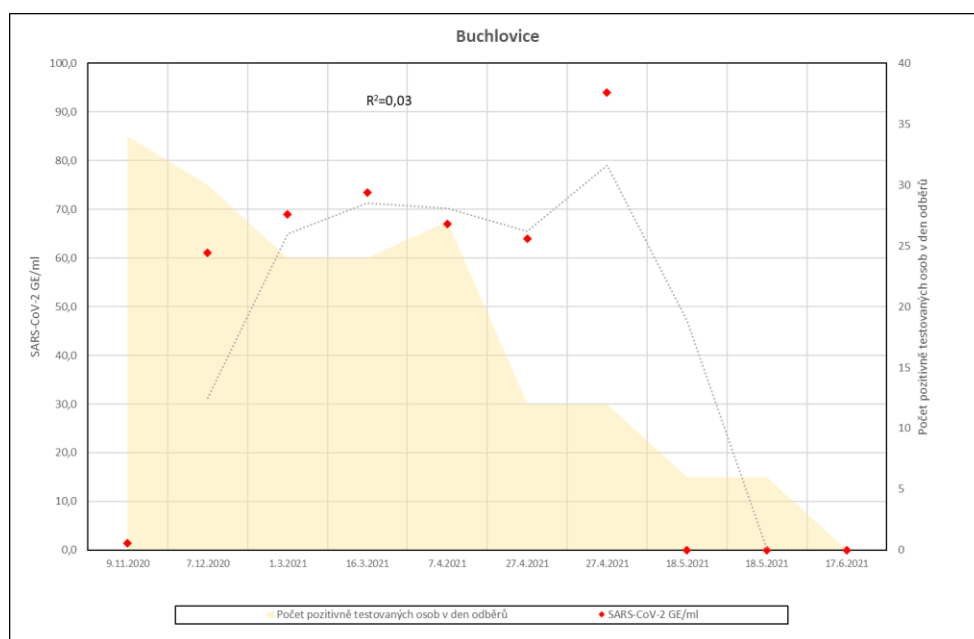
Obr. 55 ČOV Bučovice.

ČOV Buchlovice

Tab. 16 ČOV Buchlovice.

ČOV Buchlovice	
etapa	2. a 3.
kategorie dle EO	2-10 tis.
počet napojených obyvatel	2 340
nejnižší záchyt nakažených	12
-typ vzorku	S24 i P
-datum	4/21
-množství GE/ml	64,0; 94,0
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	18

vhodná pro WBE	ano
----------------	-----



Obr. 56 ČOV Buchlovice.

ČOV Bzenec

Tab. 17 ČOV Bzenec.

ČOV Bzenec	
etapa	2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
počet napojených obyvatel	10 032
nejnižší záchyt nakažených	32
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	77,3; 6,5
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	26

ČOV Černošice

Tab. 18 ČOV Černošice.

ČOV Černošice	
etapa	1.
kategorie dle EO	2 – 10 tis.
počet napojených obyvatel	9 108
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceny 4 případy
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, sledováno v době nízkých počtů nakažených (4)

ČOV České Budějovice

Tab. 19 ČOV České Budějovice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
nejnižší záchyt nakažených	430
-typ vzorku	524
-datum	11/20
-množství GE/ml	46,9
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Dobřichovice

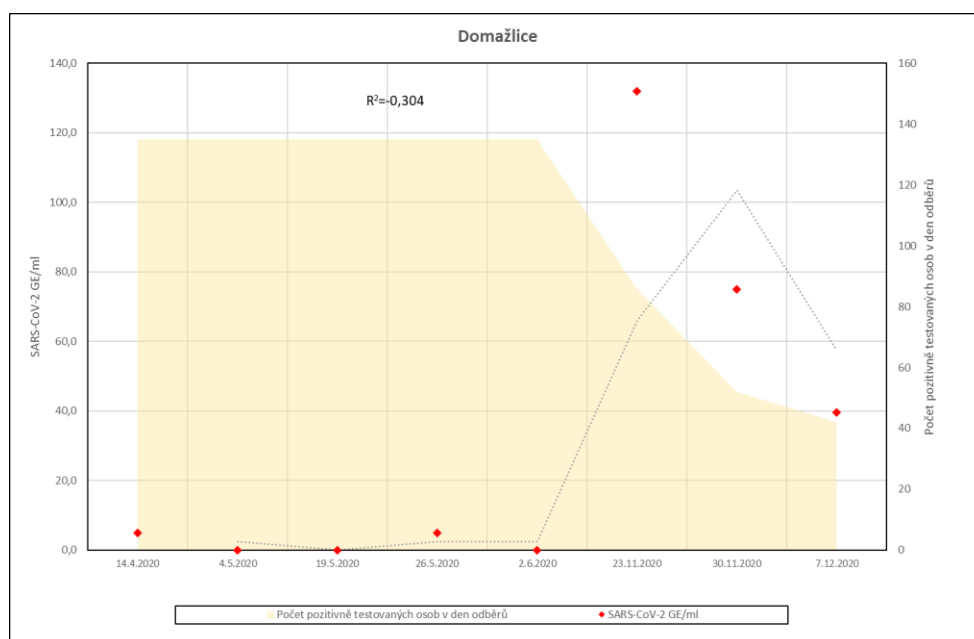
Tab. 20 ČOV Dobřichovice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2 – 10 tis.
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceno 18 případů
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Domažlice

Tab. 21 ČOV Domažlice.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
nejnižší záchyt nakažených	42
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	39,6; 43,2
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	ano



Obrázek 57 ČOV Domažlice

ČOV Frýdek-Místek

Tab. 22 ČOV Frýdek-Místek.

Etapa	1.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceny 203 případy
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Havlíčkův Brod

Tab. 23 ČOV Havlíčkův Brod.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
napojených obyvatel	24 950
nejnižší záchyt nakažených	593
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	186,5; 322,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Holýšov

Tab. 24 ČOV Holýšov.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2-10 tis.
napojených obyvatel	3 965
nejnižší záchyt nakažených	19
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	37,2; 71,5
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Horšovský Týn

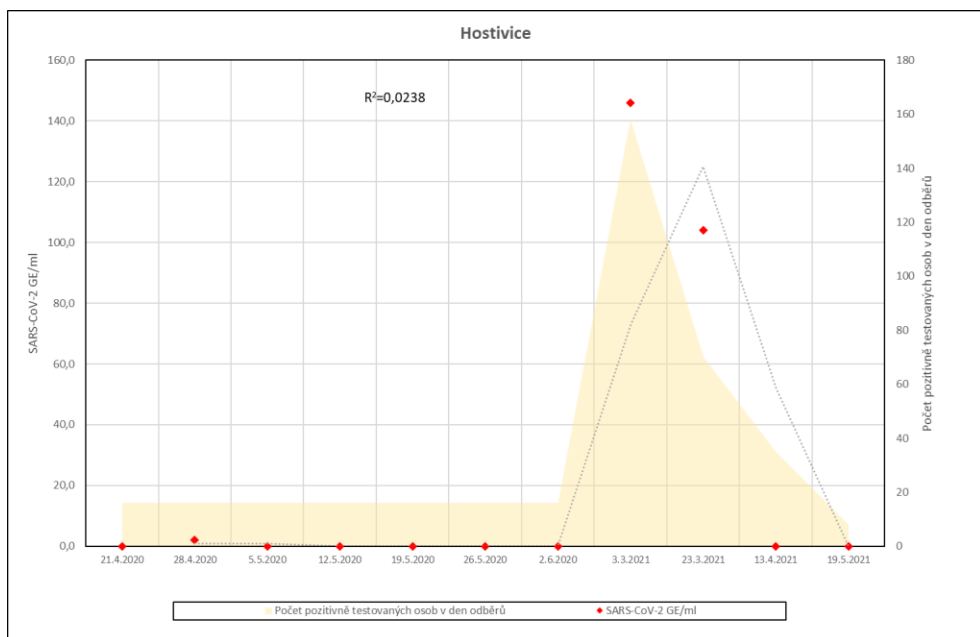
Tab. 25 ČOV Horšovský Týn.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
napojených obyvatel	4 029
nejnižší záchyt nakažených	18
-typ vzorku	S24
-datum	11/20
-množství GE/ml	21,8
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Hostivice

Tab. 26 ČOV Hostivice.

ČOV Hostivice	
Etapa	1 a 3.
kategorie dle EO	2-10 tis.
napojených obyvatel	8 600
nejnižší záchyt nakažených	1
-typ vzorku	P
-datum	4/20
-množství GE/ml	kvalitativně
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	oddílná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	ano



Obr. 58 ČOV Hostivice.

ČOV Husinec

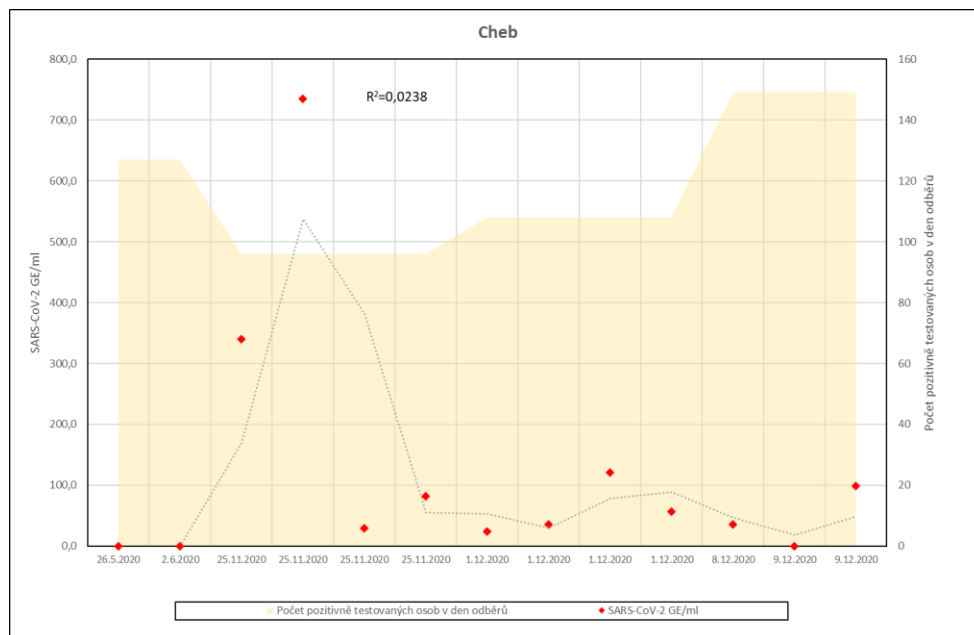
Tab. 27 ČOV Husinec.

Etapa	2.
kategorie dle EO	Do 2 tis.
napojených obyvatel	1 018
nejnižší záchyt nakažených	18
-typ vzorku	P
-datum	11/20
-množství GE/ml	12,0
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Cheb

Tab. 28 ČOV Cheb.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
napojených obyvatel	36 402
nejnižší záchyt nakažených	96
-typ vzorku	S24
-datum	11/20
-množství GE/ml	C1=340,5; C2=735,0; C3=29,3; C4=24,1
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	ano



Obr. 59 ČOV Cheb.

ČOV Ivančice

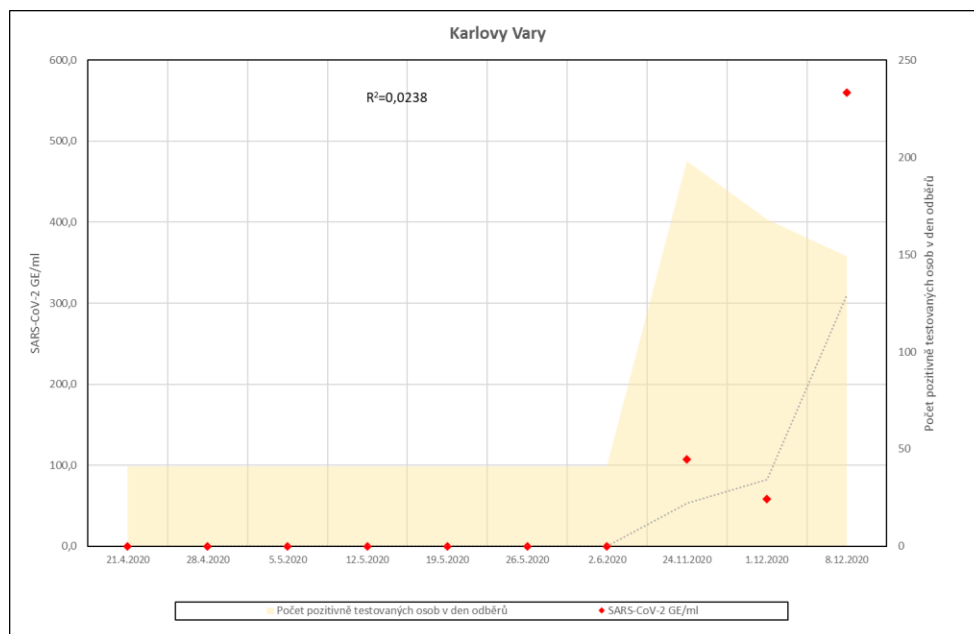
Tab. 29 ČOV Ivančice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	14 019
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceny 2 případy
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Karlovy Vary

Tab. 30 ČOV Karlovy Vary.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10-100 tis.
napojených obyvatel	61 328
nejnižší záchyt nakažených	149
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	560,0; 303,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	oddílná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	ano



Obr. 60 ČOV Karlovy Vary.

ČOV Karviná

Tab. 31 ČOV Karviná.

Etapa	1.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	51 421
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceno 450
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	ne
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Konice

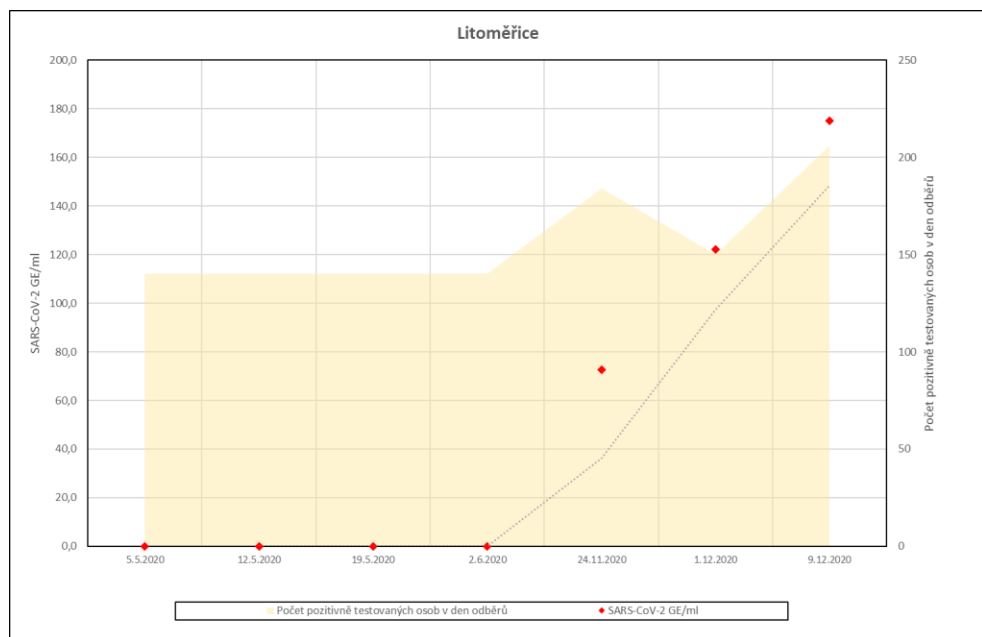
Tab. 32 ČOV Konice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	813
nejnižší záchyt nakažených	1
-typ vzorku	S24
-datum	12/20
-množství GE/ml	18,1
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat; záchyt 1 nahlášeného nakaženého

ČOV Litoměřice

Tab. 33 ČOV Litoměřice.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	38 202
nejnižší záchyt nakažených	150
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	132,5; 122,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	28
vhodná pro WBE	ano



Obr. 61 ČOV Litoměřice.

ČOV Mariánské Lázně

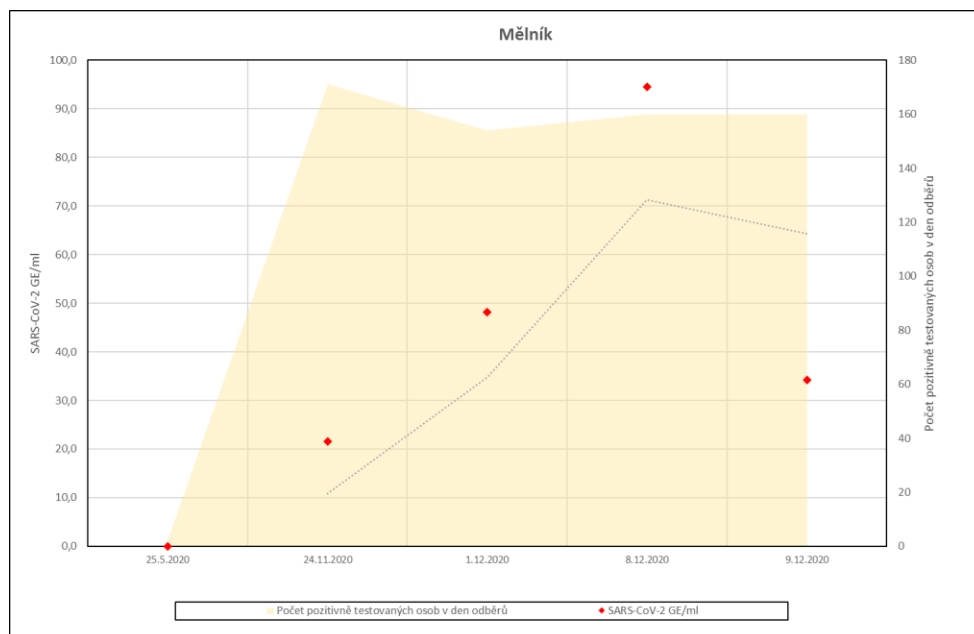
Tab. 34 ČOV Mariánské Lázně.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	17 680
nejnižší záchyt nakažených	50
-typ vzorku	P
-datum	12/20
-množství GE/ml	76,5
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	ano

ČOV Mělník

Tab. 35 ČOV Mělník.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	22 800
nejnižší záchyt nakažených	154
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	48,1 a 70,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	10
vhodná pro WBE	ano



Obr. 62 ČOV Mělník.

ČOV Meziměstí

Tab. 36 ČOV Meziměstí.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	2 229
nejnižší záchyt nakažených	8
-typ vzorku	P
-datum	11/20
-množství GE/ml	75,0
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	10
vhodná pro WBE	ano

ČOV Náchod

Tab. 37 ČOV Náchod.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
napojených obyvatel	28 030
nejnižší záchyt nakažených	141
-typ vzorku	S24
-datum	12/20
-množství GE/ml	142,5
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	20
vhodná pro WBE	ano

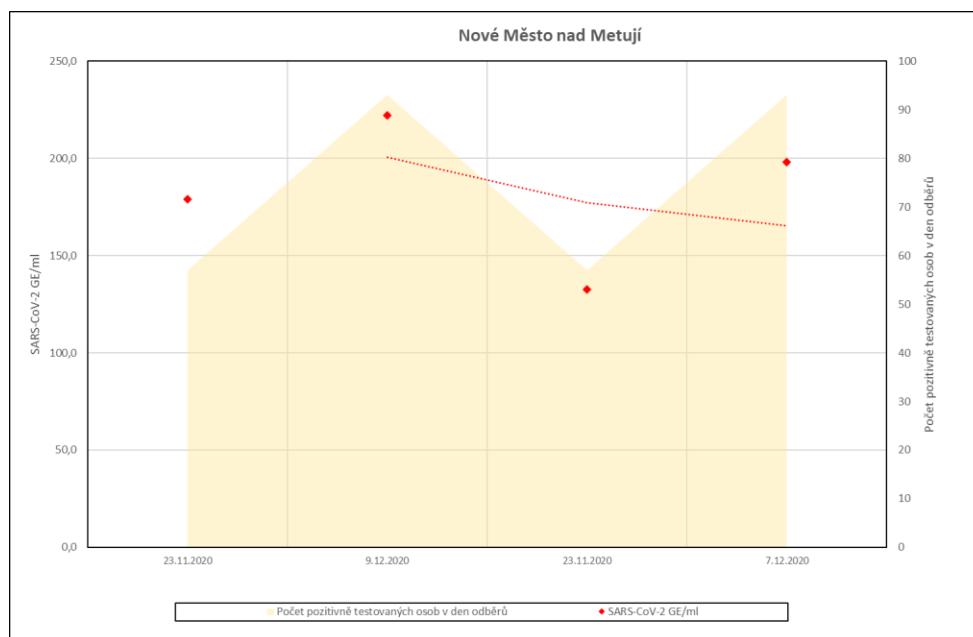
Nížebohy – domov pro seniory

V termínech 28. 4. 2020 a 5. 5. 2020 nebyla zjištěna přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě.

ČOV Nové Město nad Metují

Tab. 38 ČOV Nové Město nad Metují.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
napojených obyvatel	9 047
nejnižší záchyt nakažených	57
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	99,5 a 179,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	20
vhodná pro WBE	ano



Obr. 63 ČOV Nové Město nad Metují.

ČOV Nové Město nad Metují – bez Čistí

Tab. 39 ČOV Nové Město nad Metují – bez Čistí.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	182
nejnižší záchyt nakažených	?
-typ vzorku	P
-datum	11/20
-množství GE/ml	132,5
nemocnice na území	-
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Olomouc

Tab. 40 ČOV Olomouc.

Etapa	2.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
napojených obyvatel	95 867
nejnižší záchyt nakažených	350
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	15,9
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	50
vhodná pro WBE	ano; pozitivní byl i odtok

ČOV Opava

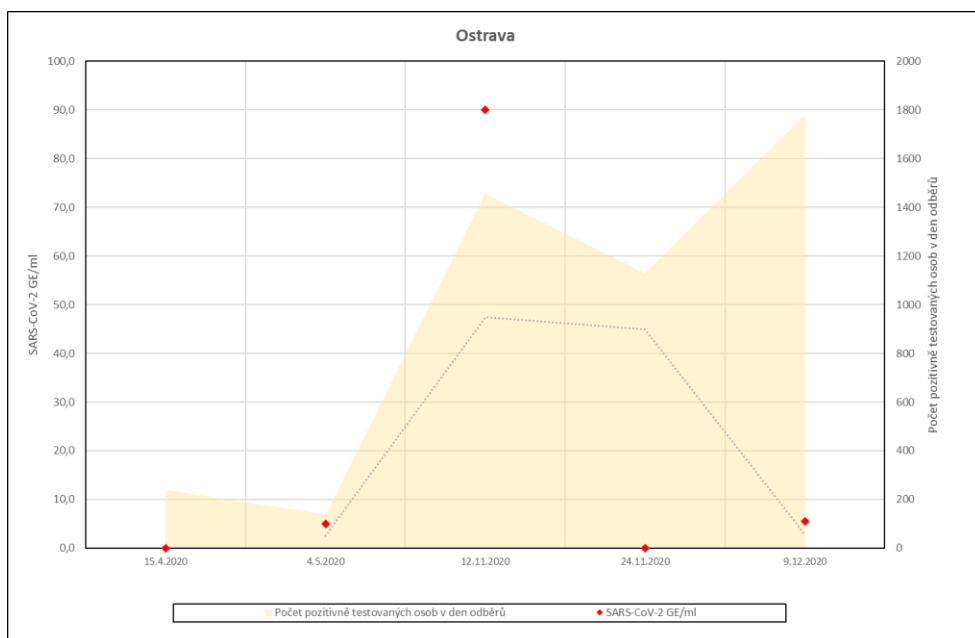
Tab. 41 ČOV Opava.

Etapa	1.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	51 904
nejnižší záchyt nakažených	nebylo zachyceno 87 případů
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	32
vhodná pro WBE	nelze hodnotit, málo dat

ČOV Ostrava

Tab. 42 ČOV Ostrava.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
napojených obyvatel	267 614
nejnižší záchyt nakažených	138
-typ vzorku	P
-datum	5/20
-množství GE/ml	kvalitativně
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	30
vhodná pro WBE	ano

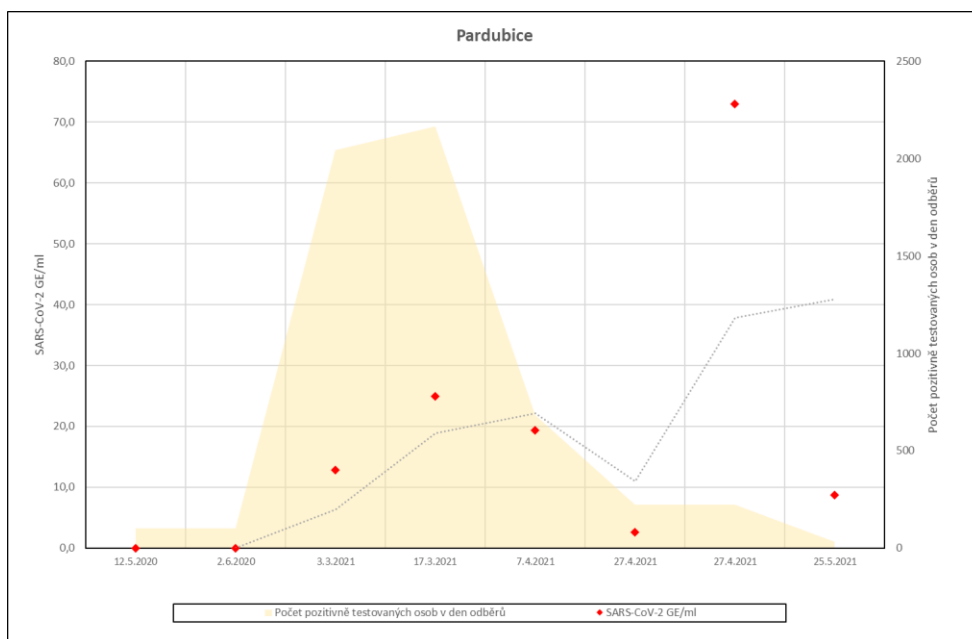


Obr. 64 ČOV Ostrava.

ČOV Pardubice

Tab. 43 ČOV Pardubice.

Etapa	1. a 3.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
napojených obyvatel	103 342
nejnižší záchyt nakažených	31
-typ vzorku	S24
-datum	5/21
-množství GE/ml	8,7
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	20
vhodná pro WBE	ano; velmi dobrý záchyt na velké ČOV



Obr. 65 ČOV Pardubice.

ČOV Petrovice (okres Ústí n. L.)

Tab. 44 ČOV Petrovice (okres Ústí n. L.).

Etapa	1.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	850
nejnižší záchyt nakažených	0
-typ vzorku	S24
-datum	4/20
-množství GE/ml	kvalitativně
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	oddílná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	ano; zjištěna přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě, i když nebyl hlášen žádný nakažený

ČOV Pelhřimov

Tab. 45 ČOV Pelhřimov.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
napojených obyvatel	15 400
nejnižší záchyt nakažených	0
-typ vzorku	P
-datum	4/20
-množství GE/ml	kvalitativně
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	50
vhodná pro WBE	ano; zjištěna přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě, i když nebyl hlášen žádný nakažený

ČOV Písek

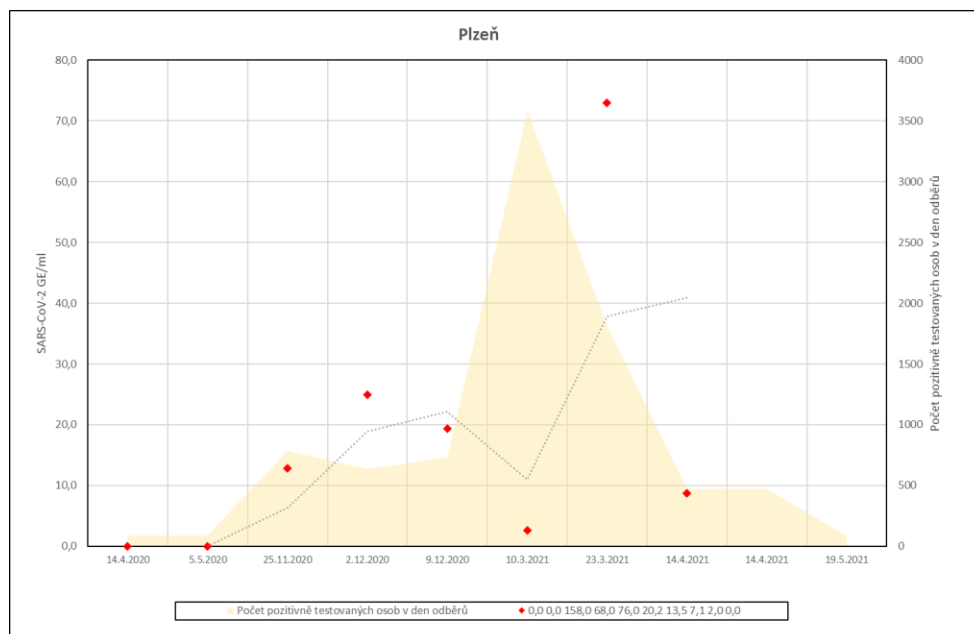
Tab. 46 ČOV Písek.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	30 350
nejnižší záchyt nakažených	161
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	39,4 a 65,5
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	25
vhodná pro WBE	ano

ČOV Plzeň

Tab. 47 ČOV Plzeň.

Etapa	1. – 3.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
napojených obyvatel	173 210
nejnižší záchyt nakažených	472
-typ vzorku	S24 i P
-datum	4/21
-množství GE/ml	7,1 a 2,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	30
vhodná pro WBE	ano

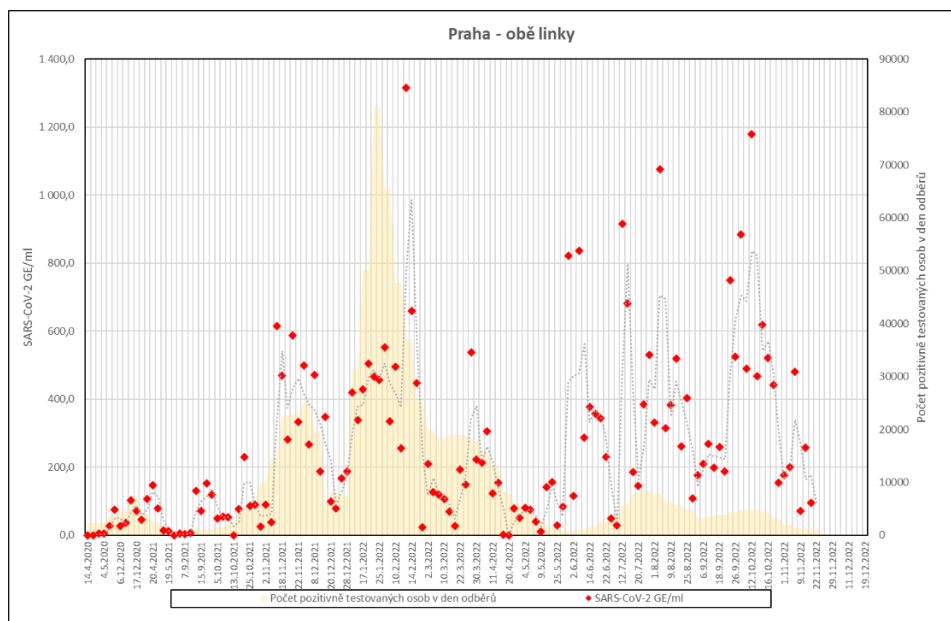


Obr. 66 ČOV Plzeň.

ÚČOV Praha (obě vodní linky - SVL i NVL)

Tab. 48 ÚČOV Praha (obě vodní linky - SVL i NVL).

ÚČOV Praha (obě vodní linky - SVL i NVL)	
etapa	1. – 4.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
napojených obyvatel	1 297 021
nejnižší záchyt nakažených	622
-typ vzorku	S24 (NVL)
-datum	8/21
-množství GE/ml	5,1
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	31
vhodná pro WBE	ano



Obr. 67 ÚČOV Praha (obě vodní linky - SVL i NVL).

ČOV Prostějov

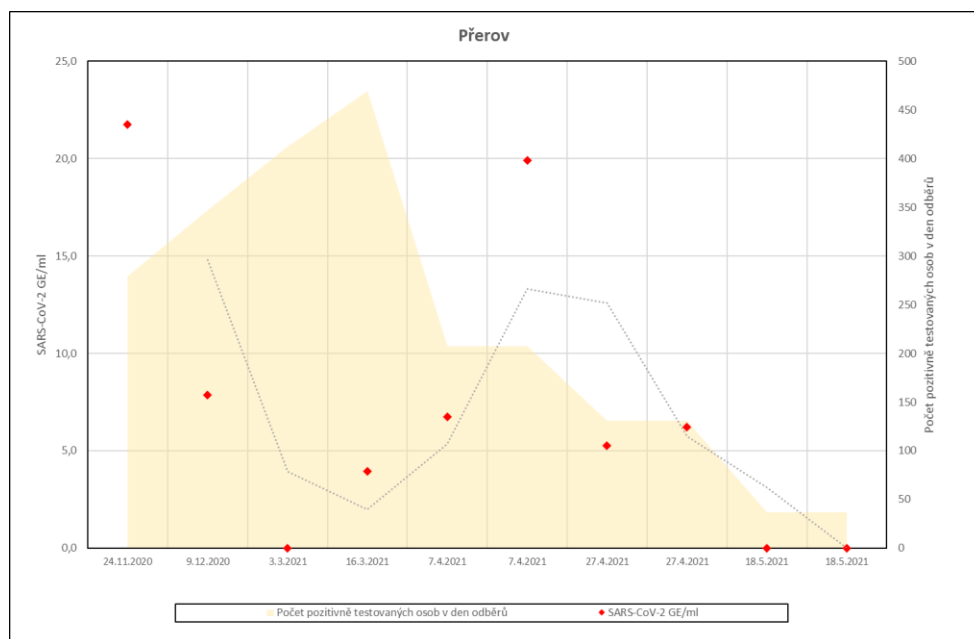
Tab. 49 ČOV Prostějov.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	48 149
nejnižší záchyt nakažených	262
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	114,0 a 0,3 (pod mezí detekce)
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	39
vhodná pro WBE	ano

ČOV Přerov

Tab. 50 ČOV Přerov.

Etapa	2. a 3.
kategorie dle EO	nad 100 tis.
napojených obyvatel	41 741
nejnižší záchyt nakažených	131
-typ vzorku	S24 i P
-datum	4/21
-množství GE/ml	5,3 a 6,2
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	39
vhodná pro WBE	ano



Obr. 68 ČOV Přerov.

ČOV Rostoky

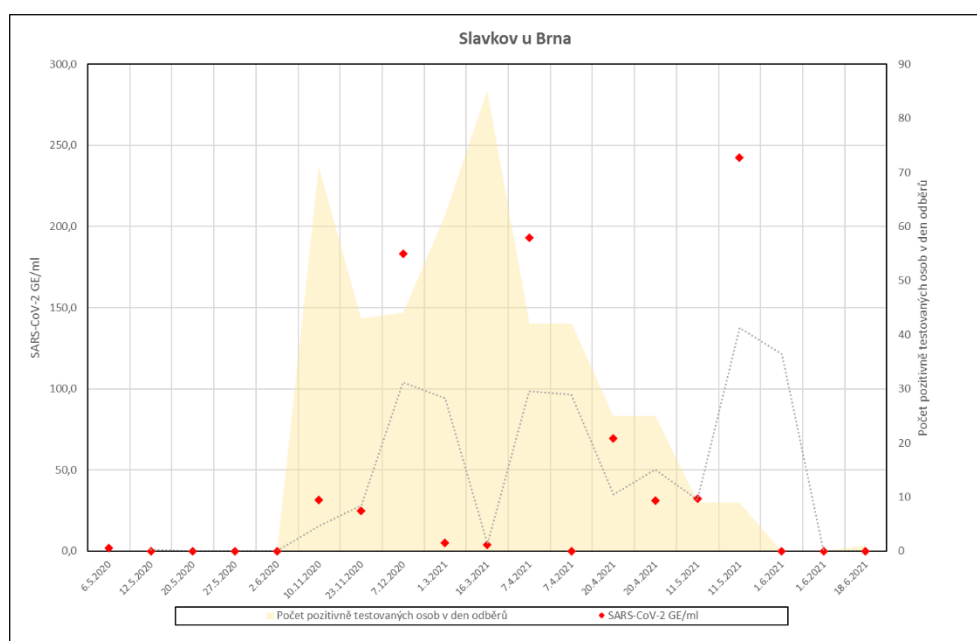
Tab. 51 ČOV Rostoky.

Etapa	1. a 3.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	16 000
nejnižší záchyt nakažených	31
-typ vzorku	S24 i P
-datum	4/21
-množství GE/ml	135,5 a 107,0
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	25
vhodná pro WBE	ano

ČOV Slavkov u Brna

Tab. 52 ČOV Slavkov u Brna.

Etapa	1. – 3.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	6 500
nejnižší záchyt nakažených	9
-typ vzorku	S24 i P
-datum	5/21
-množství GE/ml	32,5 a 242,5
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	20
vhodná pro WBE	ano



Obr. 69 ČOV Slavkov u Brna.

ČOV Staňkov

Tab. 53 ČOV Staňkov.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	2 761
nejnižší záchyt nakažených	10
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	65,5 a 11,1
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	31
vhodná pro WBE	ano

ČOV Strážnice

Tab. 54 ČOV Strážnice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	6 345
nejnižší záchyt nakažených	31
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	14,0 a 5,9
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	13
vhodná pro WBE	ano

ČOV Studnice

Tab. 55 ČOV Studnice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	111
nejnižší záchyt nakažených	2
-typ vzorku	P
-datum	12/20
-množství GE/ml	22,9
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	30
vhodná pro WBE	ano

ČOV Tábor

Tab. 56 ČOV Tábor.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
napojených obyvatel	31 805
nejnižší záchyt nakažených	177
-typ vzorku	S24
-datum	11/20
-množství GE/ml	78,5
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	oddílná
podíl průmyslových odpadních vod v %	34
vhodná pro WBE	ano

ČOV Tábor - Klokoaty

Tab. 57 ČOV Tábor – Klokoaty.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 – 100 tis.
napojených obyvatel	12 739
nejnižší záchyt nakažených	nebylo zachyceno 121 případů
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	25
vhodná pro WBE	málo dat, nelze posoudit

ČOV Teplice nad Metují

Tab. 58 ČOV Teplice nad Metují.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	1 285
nejnižší záchyt nakažených	11
-typ vzorku	P
-datum	11/20
-množství GE/ml	17,8
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	oddílná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	málo dat, nelze posoudit

ČOV Teplice nad Metují - Podhradí

Tab. 59 ČOV Teplice nad Metují – Podhradí.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	250
nejnižší záchyt nakažených	?
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	0
vhodná pro WBE	málo dat, nelze posoudit

ČOV Tetčice

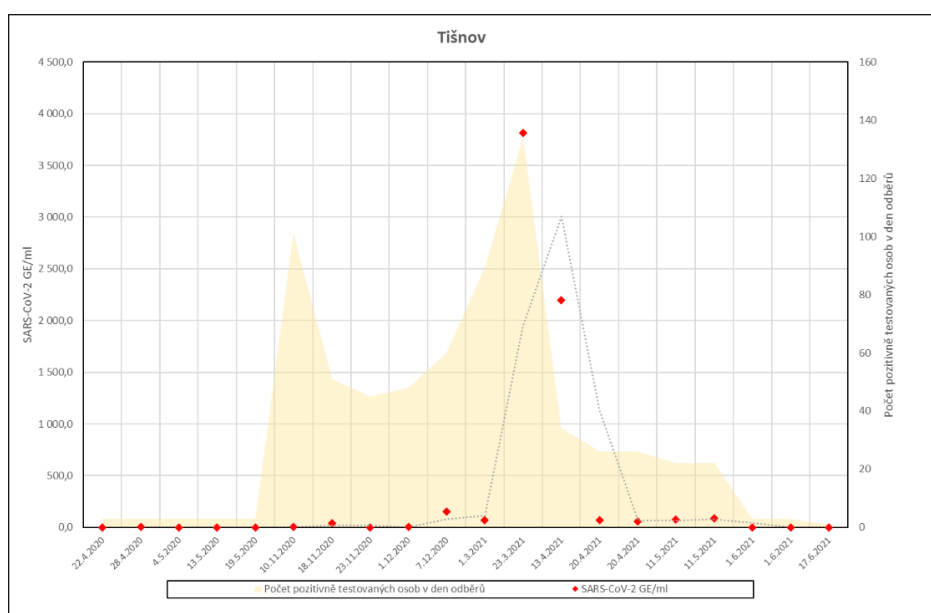
Tab. 60 ČOV Tetčice.

Etapa	1.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	12 238
nejnižší záchyt nakažených	nebylo zachyceno 6 případů
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	24
vhodná pro WBE	málo dat, nelze posoudit

ČOV Tišnov

Tab. 61 ČOV Tišnov.

Etapa	1. - 3.
kategorie dle EO	10-100 tis.
napojených obyvatel	11 439
nejnižší záchyt nakažených	3
-typ vzorku	S24
-datum	4/20
-množství GE/ml	kvalitativně
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	25
vhodná pro WBE	ano; velmi dobrý záchyt na ČOV střední kategorie



Obr. 70 ČOV Tišnov.

ČOV Uherské Hradiště

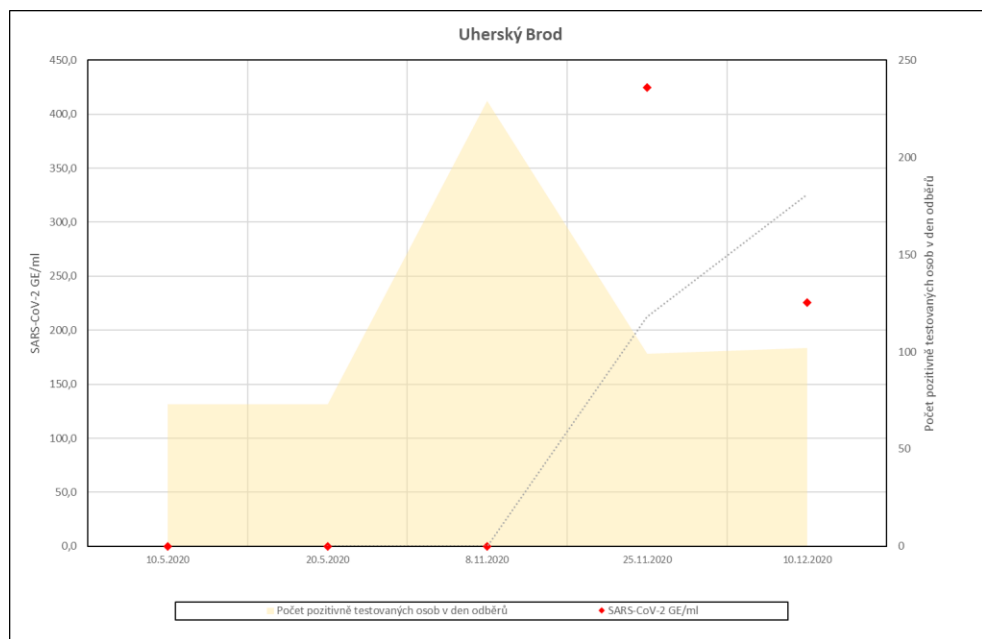
Tab. 62 ČOV Uherské Hradiště.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	39 610
nejnižší záchyt nakažených	262
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	24,7 a 7,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	36
vhodná pro WBE	ano

ČOV Uherský Brod

Tab. 63 ČOV Uherský Brod.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	21 410
nejnižší záchyt nakažených	99
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	424,9 a 202,5
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	39
vhodná pro WBE	ano



Obr. 71 ČOV Uherský Brod.

ČOV Uhřice

Tab. 64 ČOV Uhřice.

Etapa	2.
kategorie dle EO	do 2 tis.
napojených obyvatel	691
nejnižší záchyt nakažených	4
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	69,5 a 19,8
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	10
vhodná pro WBE	ano

ČOV Uničov

Tab. 65 ČOV Uničov.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	10 200
nejnižší záchyt nakažených	45
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	59,5 a 77,2
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	40
vhodná pro WBE	ano

ČOV Ústí nad Labem

Tab. 66 ČOV Ústí nad Labem.

Etapa	1. a 2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	88 606
nejnižší záchyt nakažených	486
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	95,5 a 71,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	60
vhodná pro WBE	ano

ČOV Velehrad

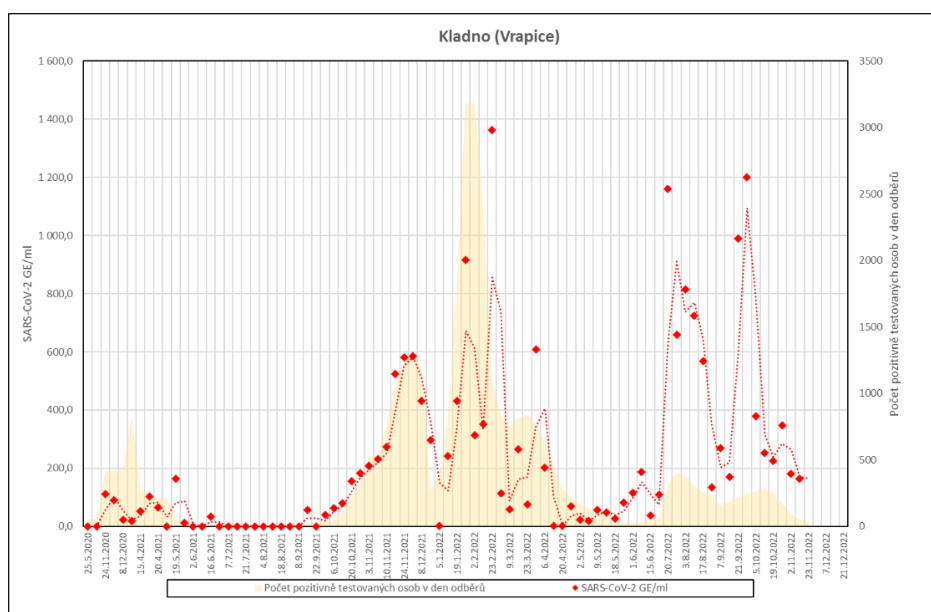
Tab. 67 ČOV Velehrad.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	1 855
nejnižší záchyt nakažených	35
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	19,2 a 25,6
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	23
vhodná pro WBE	ano

ČOV Kladno (Vrapice)

Tab. 68 ČOV Kladno (Vrapice).

ČOV Kladno (Vrapice)	
etapa	1. a 4.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	80 000
nejnižší záchyt nakažených	14
-typ vzorku	S24
-datum	6/21
-množství GE/ml	32,5
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	20
vhodná pro WBE	ano



Obr. 72 ČOV Kladno (Vrapice).

ČOV Vyškov

Tab. 69 ČOV Vyškov.

Etapa	2.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	24 709
nejnižší záchyt nakažených	143
-typ vzorku	S24 i P
-datum	12/20
-množství GE/ml	54,0 a 41,0
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	15
vhodná pro WBE	ano

ČOV Znojmo

Tab. 70 ČOV Znojmo.

Etapa	1.
kategorie dle EO	10 - 100 tis.
napojených obyvatel	42 890
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceno 43 případů
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ano
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	23
vhodná pro WBE	málo dat, nelze posoudit

ČOV Židlochovice

Tab. 71 ČOV Židlochovice.

Etapa	1.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	4 532
nejnižší záchyt nakažených	nezachyceny 4 případy
-typ vzorku	-
-datum	-
-množství GE/ml	-
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	oddílná
podíl průmyslových odpadních vod v %	16
vhodná pro WBE	málo dat, nelze posoudit

ČOV Ždírec nad Doubravou

Tab. 72 ČOV Ždírec nad Doubravou.

Etapa	2.
kategorie dle EO	2 - 10 tis.
napojených obyvatel	3 200
nejnižší záchyt nakažených	29
-typ vzorku	S24 i P
-datum	11/20
-množství GE/ml	82,0 a 39,8
nemocnice na území	ne
typ kanalizace	jednotná
podíl průmyslových odpadních vod v %	50
vhodná pro WBE	ano

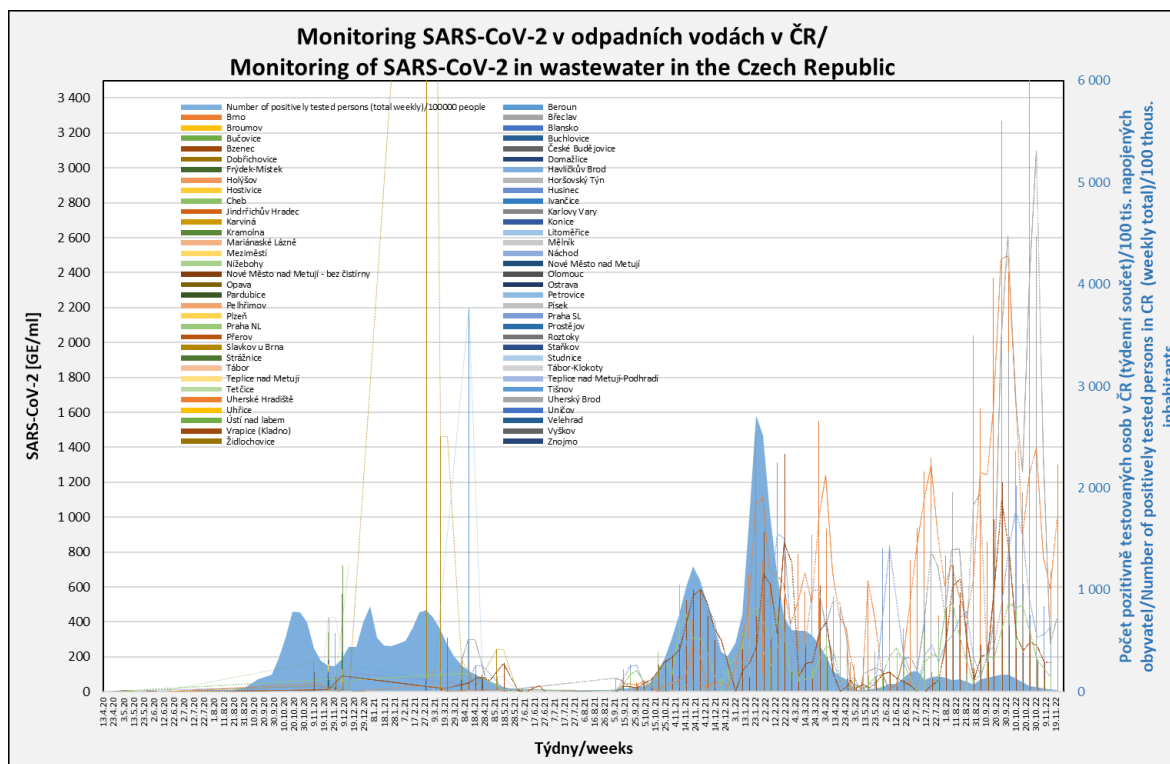
3.6.6 Výsledky dlouhodobého monitoringu

Na 5 vybraných ČOV (SVL a NVL ÚČOV Praha, ČOV Brno, ČOV Kladno a ČOV Břeclav), které spadají do různých kategorií, byl prováděn dlouhodobý monitoring, který poskytl jedinečné výsledky pro hodnocení jednotlivých ukazatelů a jejich korelací, viz. **obr. 73**. Tyto ČOV byly sledovány od dubna 2020 do konce roku 2022, aktuální výsledky včetně komentářů vývoje byly jednou za týden až 14 dní publikovány na webových stránkách <http://covmon.vuv.cz> a současně na <https://www.vuv.cz/virus-covid19-v-odpadnich-vodach/o-tematu-23/>.

Výsledky stanovení RNA SARS-CoV-2 v OV na těchto ČOV byly porovnávány s verifikovanými počty pozitivně testovaných osob, ze systému ISIN, průběžně zpracovávaných Oddělením biostatistiky SZÚ pro konkrétní sledované lokality. Pro možnost porovnání nejaktuálnějších výsledků monitoringu odpadních vod byly vždy pro aktuální období využívány volně dostupné údaje z covidových map nebo veřejně přístupných webů pro jednotlivá města (v současné době <https://obce.nery.cz/>). Údaje o množství virové RNA jsou uvedeny v GE (genomové jednotky) v 1 ml odpadní vody. Spojnice trendu hodnot v grafech je vytvořena pomocí klouzavého průměru.

Statistické zpracování dlouhodobého sledování je součástí kapitoly **3.6.6**.

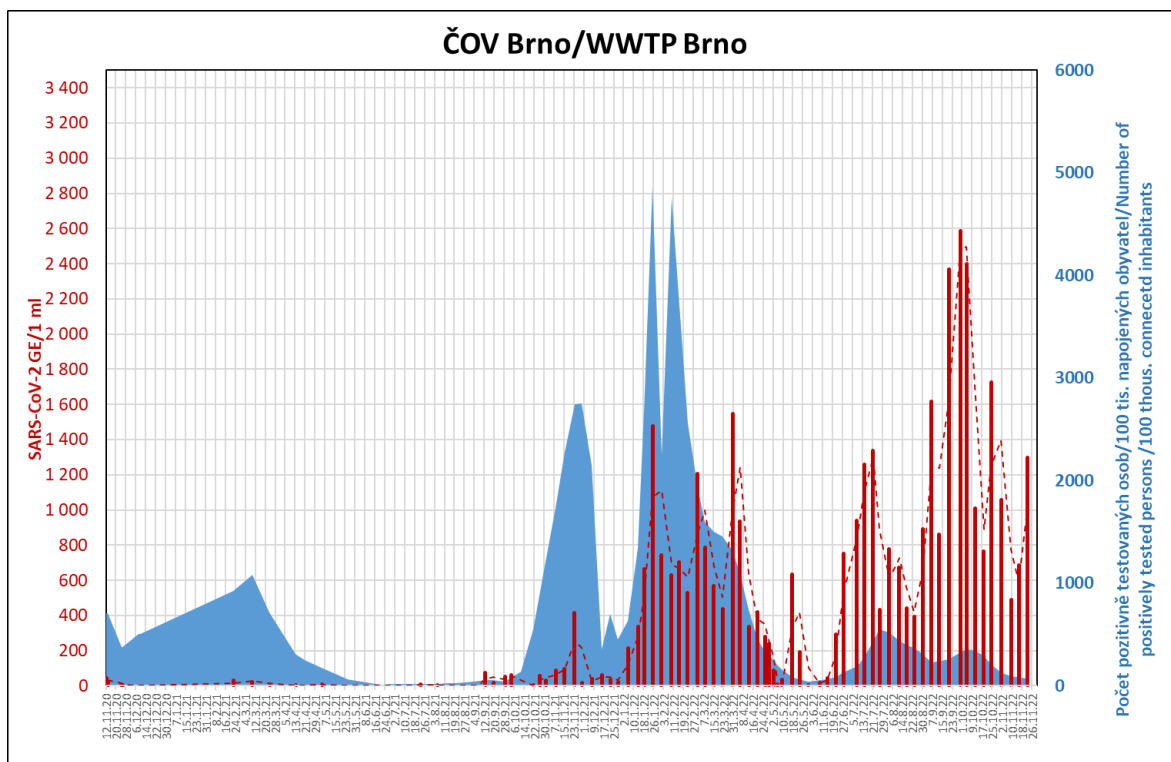
Uvádíme komentáře situace pro 47. týden 2022. Stránky budou aktualizovány do 50. týdne 2022, kdy monitoring odpadních vod končí.



Obr. 73 Výsledky dlouhodobého monitoringu na vybraných ČOV – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtů pozitivně testovaných osob v celé ČR (na 100 tis. obyvatel).

Komentář situace k 25. 11. 2022 pro ČOV Brno

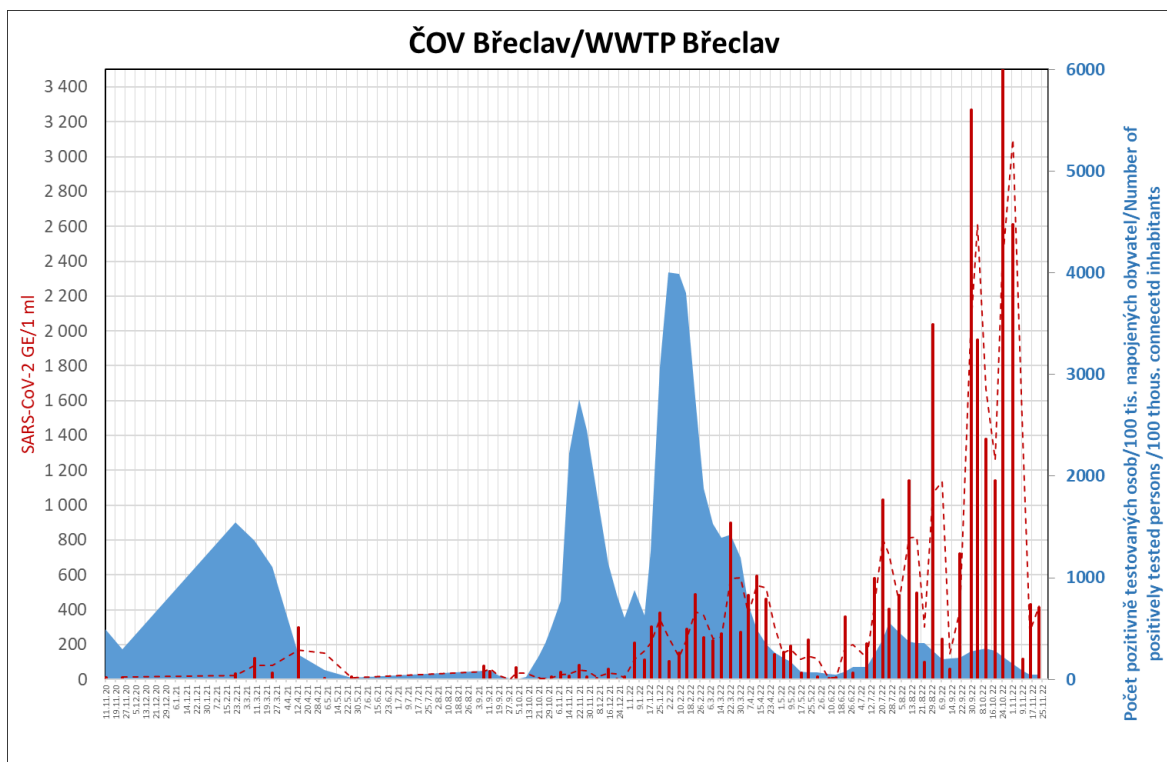
Po poklesu na konci srpna 2022 došlo během září a října ke zvyšování na dosud nejvyšší hodnoty. Poměr k počtům pozitivně testovaných je však již od začátku léta inverzní, tj. virus je v populaci přítomen, ale nezpůsobuje významné ovlivnění zdravotního stavu populace. Říjnové hodnoty ukázaly na ukončení další vlny a postupné snižování množství markeru covidu-19 v odpadní vodě. Současně dochází i ke snižování počtu pozitivně testovaných osob. Na konci října byl zjištěn nárůst množství markeru SARS-CoV-2 v odpadních vodách, následovaný dalším poklesem. Listopadová data ukazují na ustálení hodnot (stagnaci) markeru covid-19.



Obr. 74 Výsledky dlouhodobého monitoringu na ČOV Brno – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).

Komentář situace k 25. 11. 2022 pro ČOV Břeclav

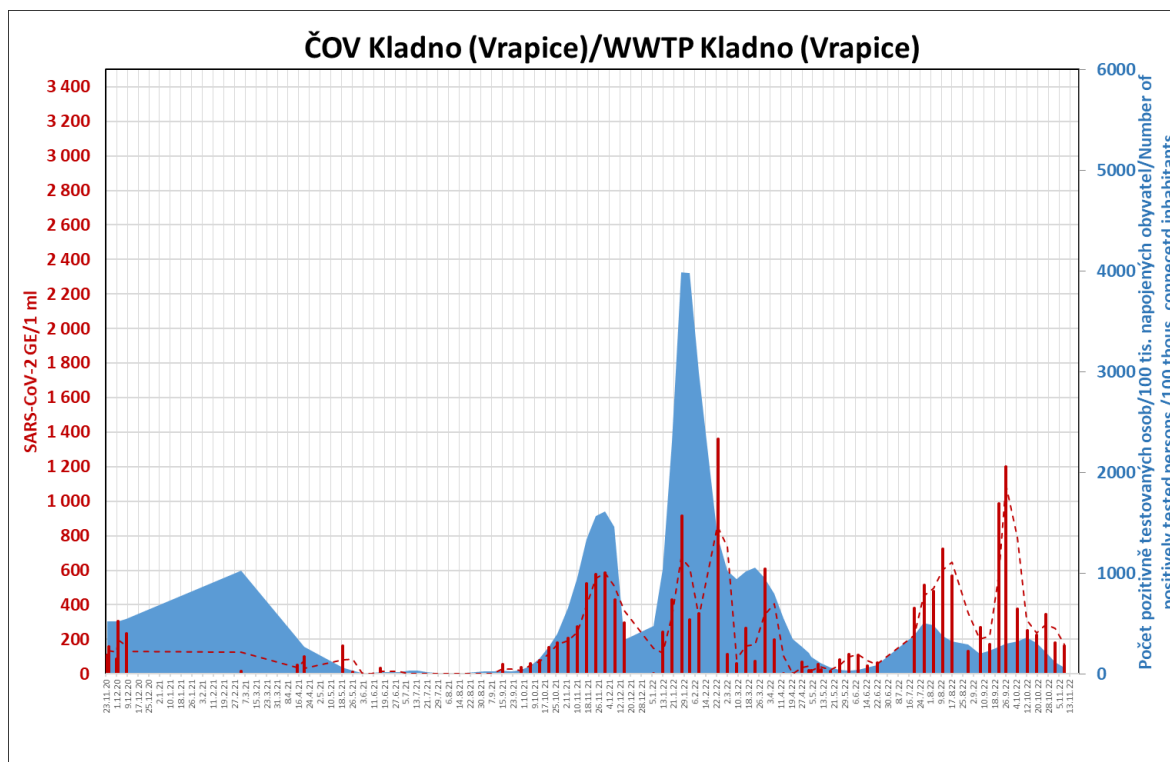
Množství virových částic v odpadní vodě v září stoupl k dosud nejvyšším hodnotám. Poměr k počtům pozitivně testovaných je však již od začátku léta inverzní, tj. virus je v populaci přítomen, ale nezpůsobuje významné ovlivnění zdravotního stavu populace. Říjnové hodnoty ukázaly na ukončení další vlny a postupné snižování množství markeru covidu-19 v odpadní vodě. Současně docházelo ke snižování počtu pozitivně testovaných osob. Na konci října byl zjištěn nárůst množství markeru SARS-CoV-2 v odpadních vodách, následovaný jeho dalším poklesem. Listopadová data ukazují na ustálení hodnot (stagnaci) markeru covid-19.



Obr. 75 Výsledky dlouhodobého monitoringu na ČOV Břeclav – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).

Komentář situace k 23. 11. 2022 pro ČOV Kladno

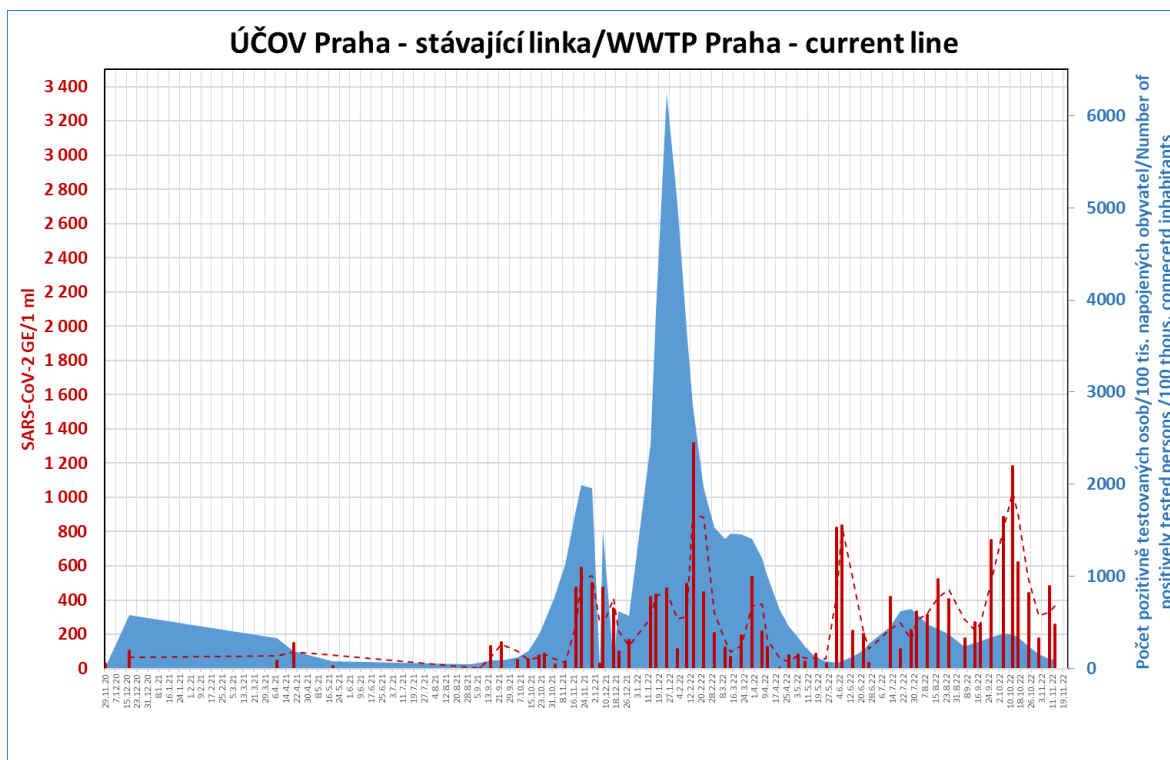
Ve 2. polovině roku 2022 byly v odpadních vodách zaznamenány dvě epidemické vlny, kterým odpovídal výrazně nižší počet klinicky potvrzených případů než na začátku roku. Aktuální stav ukazuje od 2. poloviny října pokles výskytu markeru covid-19, který je doprovázen poklesem počtu pozitivně testovaných osob.



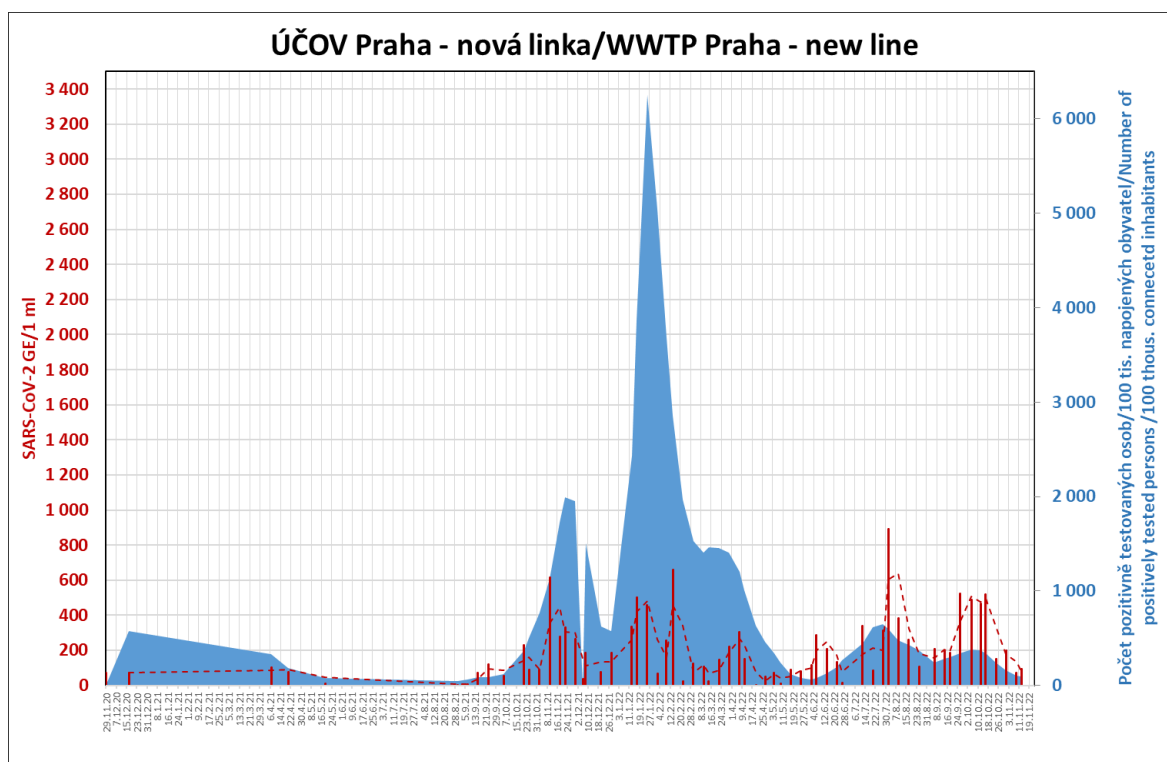
Obr. 76 Výsledky dlouhodobého monitoringu na ČOV Kladno (Vrapice) – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).

Komentář situace k 23. 11. 2022 pro ÚČOV Praha - SVL (stávající) a NVL (nová vodní linka)

V říjnu 2022 byla v odpadních vodách zachycena podzimní epidemická vlna, která již nebyla doprovázena výskytem významného počtu klinických případů. Aktuální stav ukazuje pokračující pokles výskytu markeru covid-19, který je doprovázen poklesem počtu pozitivně testovaných osob.



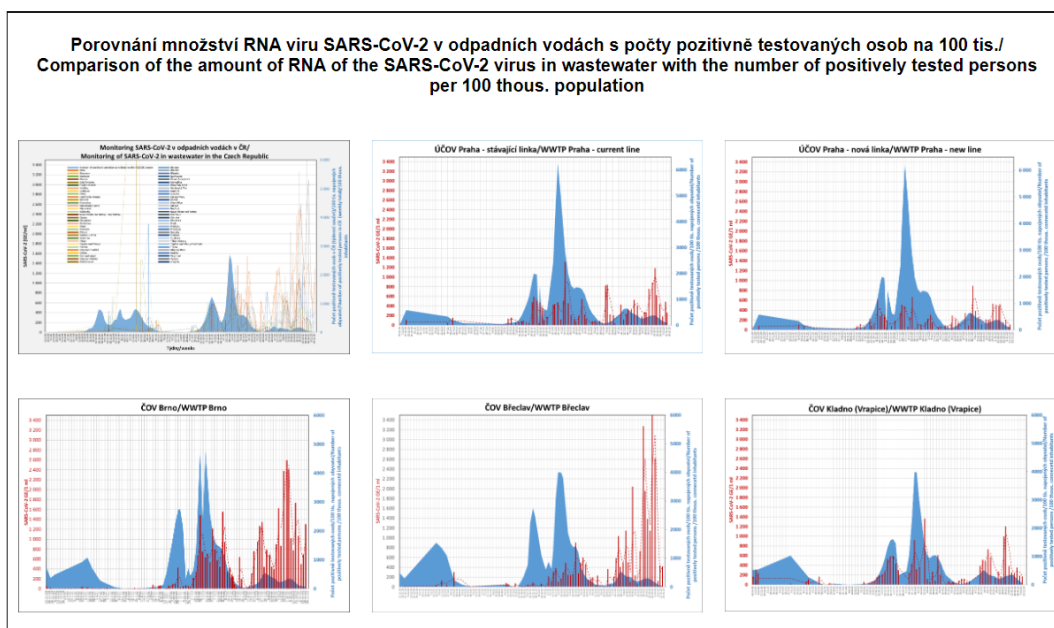
Obr. 77 Výsledky dlouhodobého monitoringu na stávající vodní lince ÚČOV Praha – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).



Ob. 78 Výsledky dlouhodobého monitoringu na nové vodní lince ÚČOV Praha – porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a počtu pozitivně testovaných osob (na 100 tis. obyvatel).

NA webových stránkách je k dispozici porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách s počty pozitivně testovaných osob na 100 tis. napojených obyvatel:

Porovnání výsledků



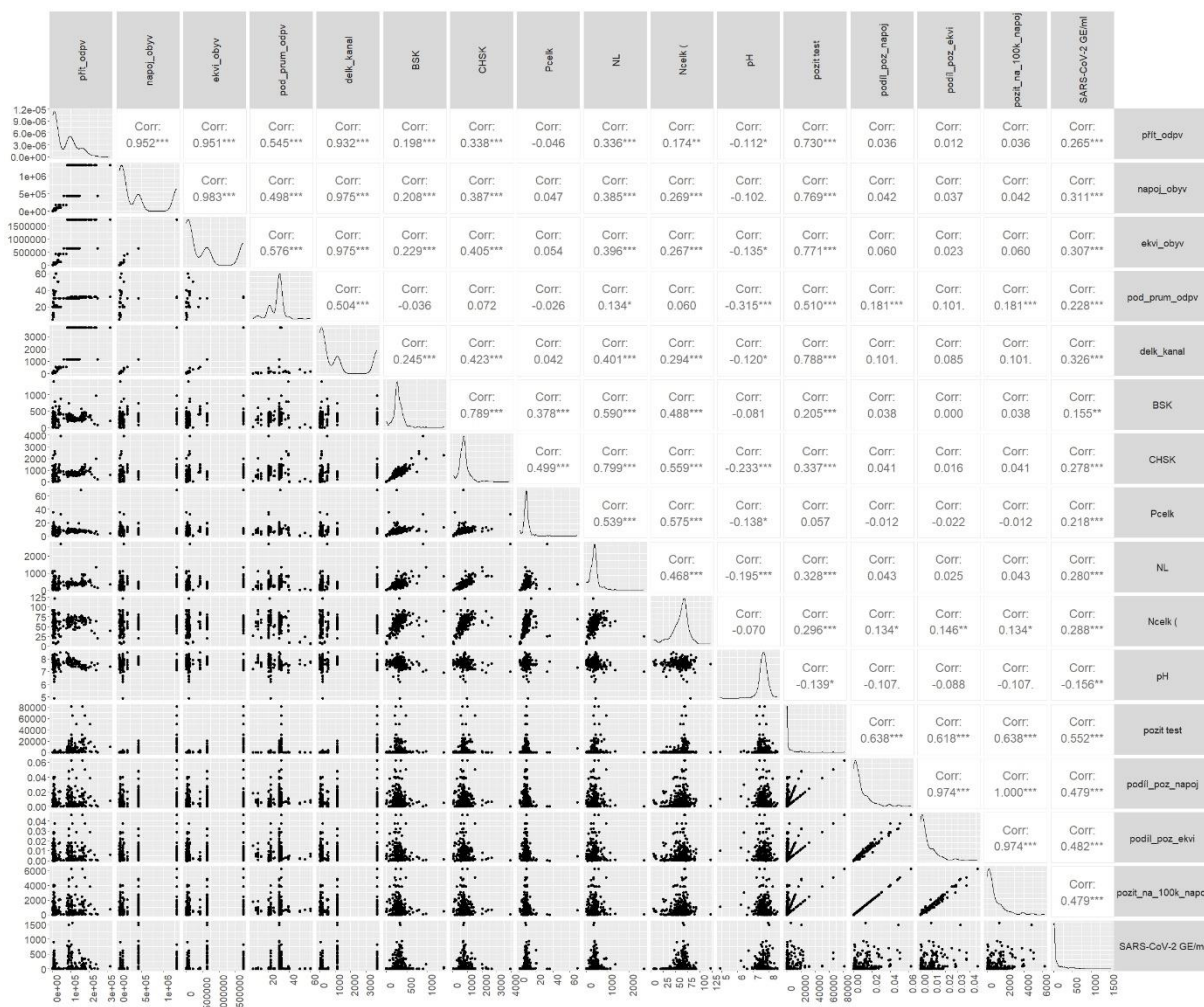
Obr. 79 Porovnání množství RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách s počty pozitivně testovaných osob na 100 tis. napojených obyvatel.

3.6.7 Statistické vyhodnocení výsledků

Data, která byla získána v rámci řešení projektu, byla statisticky zpracována. Korelační analýzy byly provedeny v programu R (verze 4.0.3, www.rproject.org) pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Pro všechny korelační analýzy byla použita pouze data z nátoků na ČOV.

3.6.7.1 Korelační analýza SARS-CoV-2 GE/ml s počty pozitivně testovaných osob, chemickými parametry odpadních vod a vybranými charakteristikami ČOV

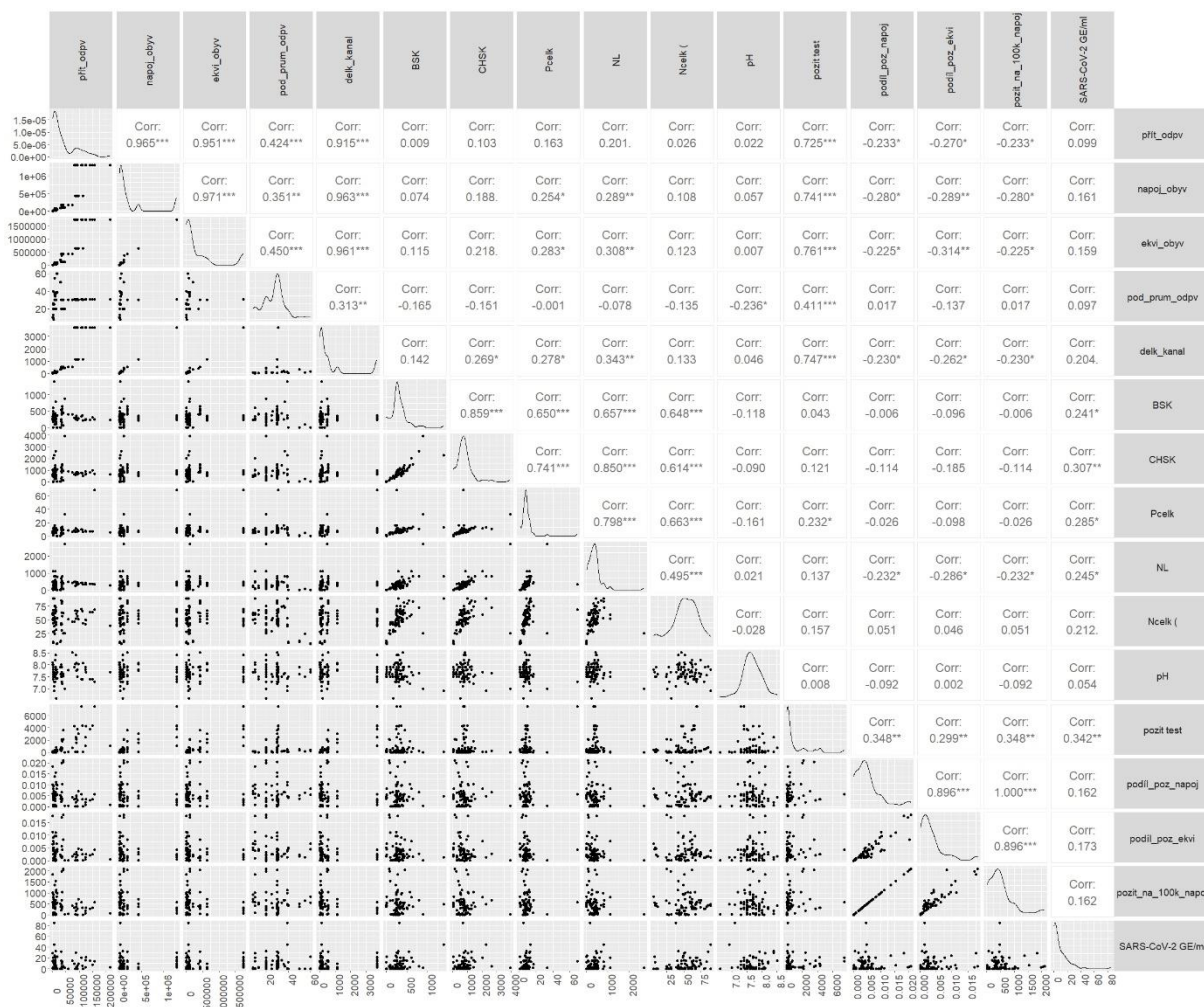
Pro zjištění souvislosti mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml, počty pozitivně testovaných osob, chemickými parametry odpadních vod a vybranými charakteristikami ČOV byla použita všechna dostupná data bez rozlišení typu odběru vzorků. Hodnocení bylo provedeno bez ohledu na varianty viru viz. **obr. 80**, tak i pro jednotlivé varianty, viz. **obr. 81 – 83**.



Obr. 80 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – všechny etapy.

Výsledek korelační analýzy ukázal pro všechny ČOV na korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml v odpadních vodách. Korelační koeficient dosahoval hodnoty 0,55. Podobná korelace byla pozorována mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a podílem pozitivně testovaných osob ze všech osob napojených na příslušnou ČOV (0,48).

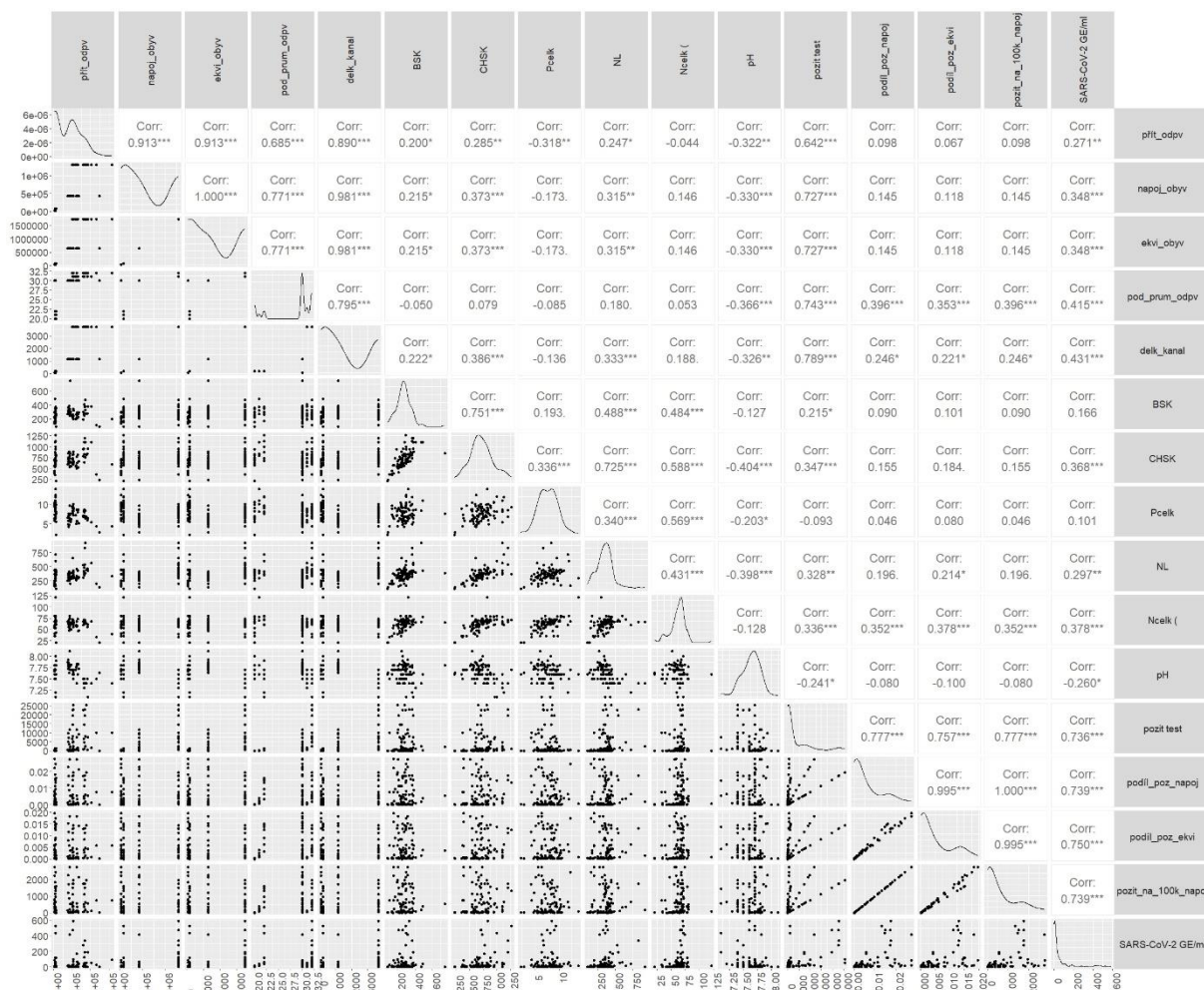
Ze získaných dat byla zjišťována korelace mezi SARS-CoV-2 GE/ml a koncentrací chemických parametrů. Korelace nebyla v získaných datech prokázána. Korelační koeficient dosahoval hodnot 0,1-0,3. Korelace nebyla zjištěna ani mezi SARS-CoV-2 GE/ml a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.



Obr. 81 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – Varianta ALFA.

Výsledek z korelační analýzy pro variantu alfa neprokázal korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml v odpadních vodách. Korelační koeficient dosahoval hodnoty pouze 0,3. Podobná korelace byla pozorována mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a podílem pozitivně testovaných osob ze všech osob napojených na příslušnou ČOV (0,16). Tyto výsledky byly významně ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat. V případě varianty alfa to bylo málo získaných hodnot pro mnoho ČOV.

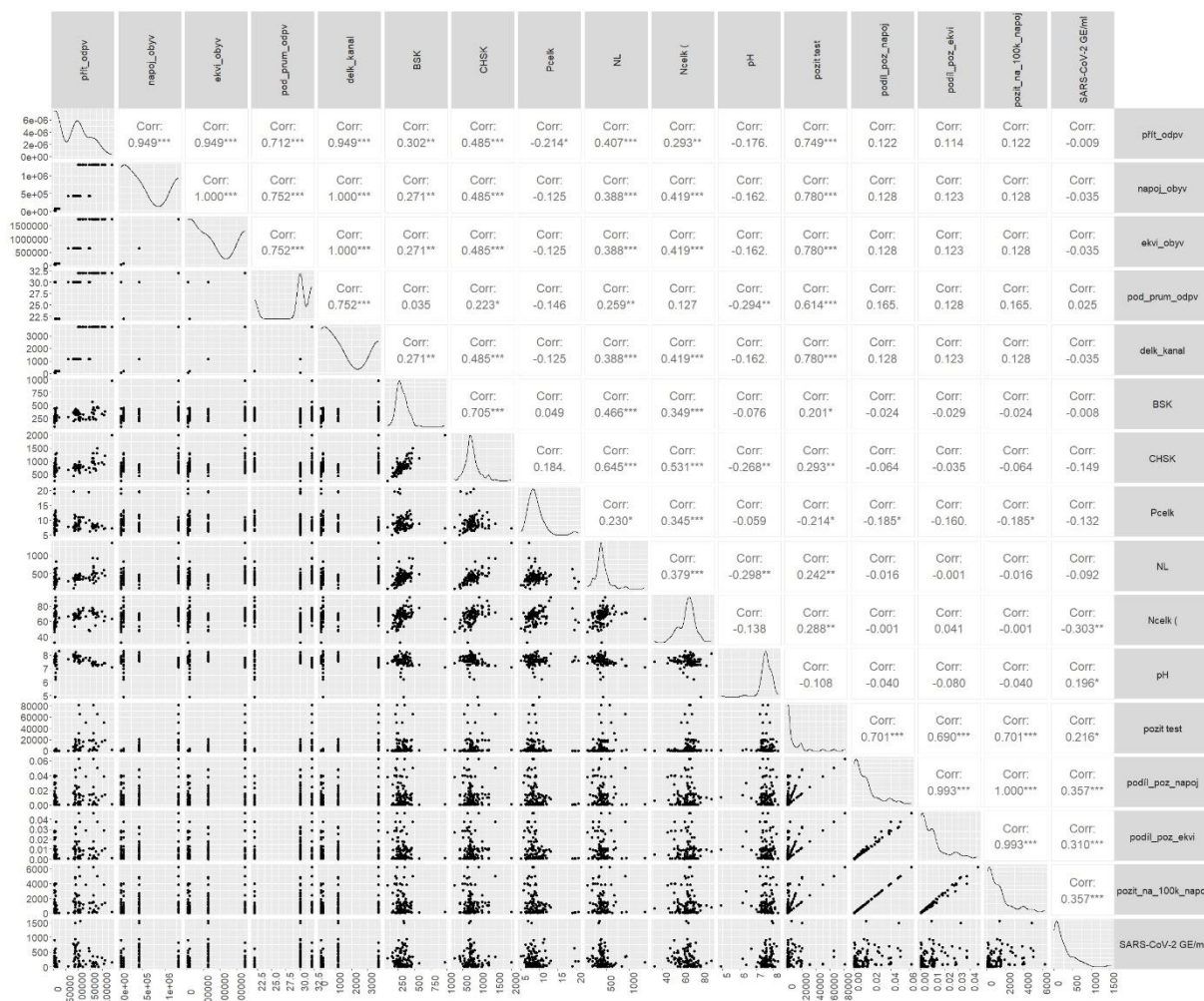
Ze získaných dat byla zjišťována korelace mezi SARS-CoV-2 GE/ml a koncentrací chemických parametrů. Korelace nebyla v případě varianty alfa v získaných datech prokázána. Korelační koeficient dosahoval hodnot 0,1-0,3. Korelace nebyla zjištěna ani mezi SARS-CoV-2 GE/ml a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.



Obr. 82 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – Varianta DELTA.

Výsledek z korelační analýzy pro variantu delta prokázal vysokou korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml v odpadních vodách. Korelační koeficient dosahoval hodnoty 0,74. Podobná korelace byla pozorována mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a podílem pozitivně testovaných osob ze všech osob napojených na příslušnou ČOV (0,74). Tyto výsledky byly významně ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat. V případě varianty alfa to bylo způsobeno nízkým počtem získaných hodnot pro mnoho ČOV.

Ze získaných dat byla zjišťována korelace mezi SARS-CoV-2 GE/ml a koncentrací chemických parametrů. Korelace nebyla v případě varianty delta v získaných datech prokázána. Korelační koeficient dosahoval hodnot 0,1-0,4. Korelace nebyla zjištěna ani mezi SARS-CoV-2 GE/ml a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.



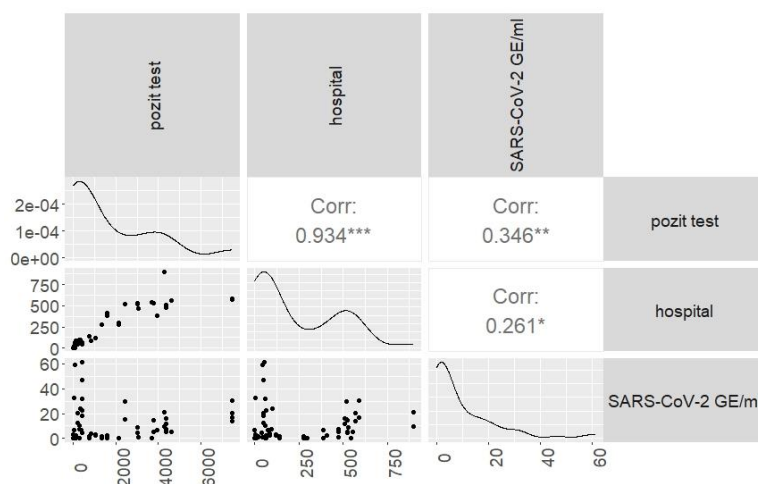
Obr. 83 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů pozitivně testovaných osob, chemických parametrů odpadních vod a vybraných charakteristik ČOV – Varianta OMIKRON.

Výsledek z korelační analýzy pro variantu omikron neprokázal korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml v odpadních vodách. Korelační koeficient dosahoval hodnoty jen 0,22. Podobná korelace byla pozorována mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a podílem pozitivně testovaných osob ze všech osob napojených na příslušnou ČOV (0,36). Tyto výsledky byly významně ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat. V případě varianty omikron to bylo způsobeno zejména změnou závažnosti klinických příznaků infekce a přístupu obyvatel k testování.

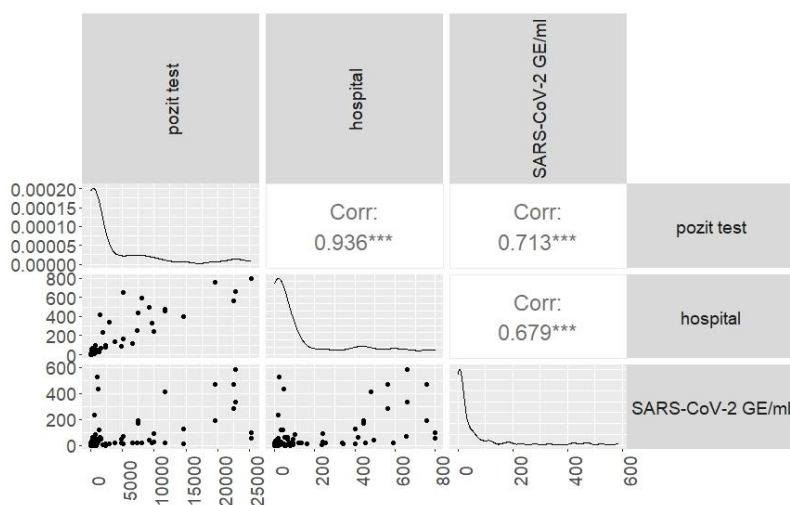
Ze získaných dat byla zjišťována korelace mezi SARS-CoV-2 GE/ml a koncentrací chemických parametrů. Korelace nebyla v případě varianty delta v získaných datech prokázána. Korelační koeficient dosahoval hodnot 0,01-0,3. Korelace nebyla zjištěna ani mezi SARS-CoV-2 GE/ml a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.

3.6.7.2 Korelační analýza SARS-CoV-2 GE/ml s počty hospitalizovaných osob

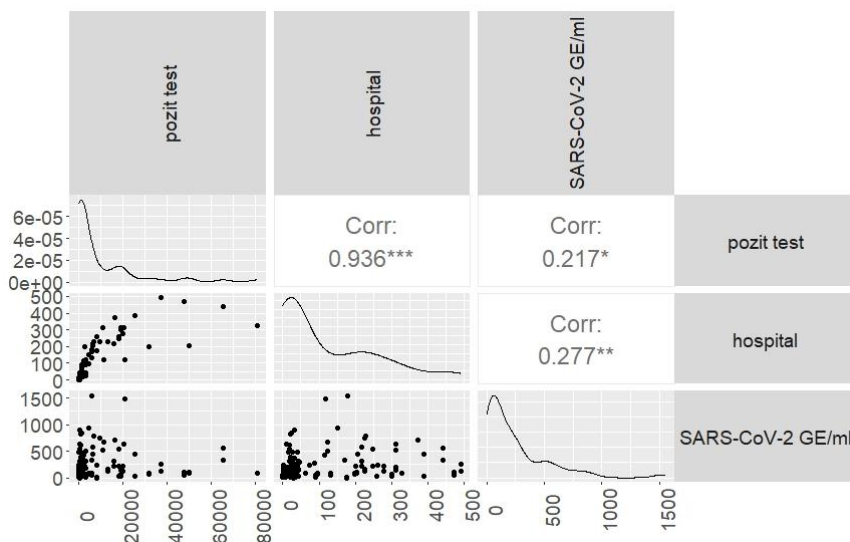
Pro zjištění vztahu mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml v odpadních vodách a počty hospitalizovaných osob byla použita data z odběrných míst Břeclav, Brno, Praha a Kladno (Vrapice), pro která byla tato data dostupná. Analýzy byly provedeny pro jednotlivé varianty viru, viz. **obr. 84 – 86**.



Obr. 84 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů hospitalizovaných osob – varianta ALFA.



Obr. 85 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů hospitalizovaných osob – varianta DELTA.



Obr. 86 Statistické hodnocení SARS-CoV-2 GE/ml a počtů hospitalizovaných osob – varianta OMIKRON.

Z analyzovaných dat vyplynula pozitivní korelace mezi SARS-CoV-2 GE/ml a počty hospitalizovaných osob v případě varianty delta, korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,7.

3.6.7.3 Korelace SARS-CoV-2 GE/ml s počty pozitivně testovaných osob v závislosti na velikostní kategorii ČOV, typu odběru a variantě viru

Pro zjištění vztahu mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a počtem pozitivně testovaných osob v závislosti na velikostní kategorii ČOV, typu odběru a variantě viru byla použita všechna dostupná data. Výsledky jsou uvedeny níže, viz. **tab. 73**.

Tab. 73 Určení vztahu mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a počtem pozitivně testovaných osob v závislosti na velikostní kategorii ČOV, typu odběru a variantě viru.

	signifikantní korelace
	data nejsou k dispozici
	byly naměřené samé 0

		korelační koef.	signifikance	z kolika hodnot je provedena analýza	korelační koef.	signifikance	z kolika hodnot je provedena analýza
všechny varianty dohromady	eo_kat	proste_rho	proste_p	proste_N	smesne_rho	smesne_p	smesne_N
	10-100 tis.	0,31	0,0053	79	0,50	3,78E-18	268
	2-10 tis.	0,36	0,0499	31	0,59	4,07E-06	52
	do 2 tis.	0,68	0,0101	13	0,78	0,22	4
	nad 100 tis.	0,68	0,0004	22	0,61	1,07E-24	233
divoka	eo_kat	proste_rho	proste_p	proste_N	smesne_rho	smesne_p	smesne_N
	10-100 tis.	NA	NA	4	NA	NA	58
	2-10 tis.	NA	NA	9	NA	NA	9
	do 2 tis.	NA	NA	2	NA	NA	2
	nad 100 tis.	NA	NA	3	-0,21	0,477	14
alfa	eo_kat	proste_rho	proste_p	proste_N	smesne_rho	smesne_p	smesne_N
	10-100 tis.	0,23	0,050	75	0,22	0,02	102
	2-10 tis.	-0,03	0,905	22	0,42	0,01	43
	do 2 tis.	0,55	0,079	11	-1,00	1,00	2
	nad 100 tis.	0,62	0,004	19	0,57	0,000003	59
delta	eo_kat	proste_rho	proste_p	proste_N	smesne_rho	smesne_p	smesne_N
	10-100 tis.	0	0	0	0,81	1,11E-10	41
	2-10 tis.	0	0	0	0	0	0
	do 2 tis.	0	0	0	0	0	0
	nad 100 tis.	0	0	0	0,80	2,70E-14	59
omikron	eo_kat	proste_rho	proste_p	proste_N	smesne_rho	smesne_p	smesne_N
	10-100 tis.	0	0	0	0,10	0,421	67
	2-10 tis.	0	0	0	0	0	0
	do 2 tis.	0	0	0	0	0	0
	nad 100 tis.	0	0	0	-0,12	0,237	101

Z uvedených výsledků je patrné, že signifikantní korelace byly zjištěny pro prosté i směsné vzorky a pro všechny velikostní kategorie ČOV, s výjimkou slévaných vzorků z ČOV do 2 tisíc napojených obyvatel. Výsledek pro tuto kategorii ČOV byl ale do značné míry ovlivněn nedostatkem dat k analýze. Z hlediska korelačních koeficientů se ukázalo, že pro monitoring SARS-CoV-2 v odpadních vodách jsou vhodnější směsné vzorky. Analýzy neprokázaly, že by některé z uvedených velikostních kategorií ČOV byly pro účel monitoringu vhodnější.

4 SOUHRN

V průběhu řešení projektu bylo získáno množství zásadních informací čerpajících z obdobných studií a mnoho empiricky získaných údajů, ze kterých byly vyvozeny závěry s cílem formulace nejvhodnějšího přístupu k monitoringu odpadních vod pro podmínky ČR.

Významné poznatky získané z odborných studií a výzkumných prací v oblasti WBE v době covidu-19:

- RNA viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách je možné detekovat dříve, než je prokázána klinickými testy,
- k dosažení pozitivní detekce RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách je zapotřebí minimálně 4-17 (medián 8), 9-43 (medián 18) a 17-97 (medián 38) denně hlášených nových případů covid-19 na 100 000 obyvatel pro hladiny pravděpodobnosti 50 %, 80 % a 99 %,
- dozorová činnost pro monitorování trendů v daném místě by měla být prováděna jednou laboratoří za použití jedné metody,
- není k dispozici žádné zdůvodnění ani silné empirické důkazy, které by sloužily jako základ pro převod koncentrace genetických ekvivalentů v odpadních vodách na počet nakažených osob ve sledované populaci.

Souhrn získaných výsledků a závěrů získaných v průběhu řešení projektu:

1. Vzorkování

- Byly prokázány rozdíly ve fekálním znečištění odpadních vod na nátoky na ČOV v průběhu dne, přičemž přibližně 70 % denního znečištění vstupuje do ČOV mezi 10. a 23. hodinou. V této době byly zjištěny i nejvyšší koncentrace RNA SARS-CoV-2.
- Pro stanovení RNA SARS-CoV-2 je možné použít slévané i prosté vzorky. Odběr prostých vzorků by měl být směřován do doby vysokého fekálního zatížení odpadních vod.
- Při četnosti 2 odběrů týdně lze získat přesnější představu o vývoji epidemické situace, které je vhodné pro aktivní sledování trendu probíhající epidemie, zpřesnění a potvrzení nastalé významnější změny a eliminaci výkyvů v obsahu virové RNA. Vhodné je vzorkování provádět s odstupem 3 dnů bez zahrnutí víkendů, z důvodu odlišného životního režimu obyvatel. Pro dlouhodobé preventivní sledování je dostačující četnost odběrů 1x týdně.
- K provádění monitoringu jsou vhodné ČOV všech velikostních kategorií i při nízké prevalenci nakažených osob ve spádové oblasti.
- Rozsáhlá síť ČOV a velký rozsah kanalizačních sítí v ČR nabízí velmi vhodné prostředí pro provádění WBE monitoringu.

2. Stabilizace a uchování vzorků

- Optimálním postupem zpracování vzorku je okamžité zpracování vzorku do 24 hodin po odběru, stabilizaci PEG + NaCl je vhodné provést co nejdříve, tj. po příjmu vzorku do laboratoře. 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 °C.
- Při skladování vzorků při -20 °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 %.

3. Stanovení RNA SARS-CoV-2

- Byl vyvinut a odzkoušen „Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2 metoda stanovení RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách“, který byl předán MZ a je zveřejněn zde: https://www.vri.cz/wp-content/uploads/2022/02/141_MetPostup_Final_Vasickova.pdf.
- Použitá metoda je vysoce citlivá, pozitivní nález virové RNA byl zjištěn již pro jednotky až desítky osob zachycených klinickým PCR testováním. Metodou byl získán pozitivní výsledek analýzy i pro případ, že v dané lokalitě nebyl oficiálně zaznamenán žádný případ infekce SARS-CoV-2.
- Za odpovídající nejistotu stanovení bylo stanoveno 40 %.
- Významnou částí postupu analýzy odpadních vod je homogenita vzorku, která 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.
- 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.

3. PCR stanovení přítomnosti RNA virů chřipky A a B a hepatitidy A (HAV)

- Byly vytvořeny a validovány postupy detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B a viru hepatitidy A metodou RT-qPCR v odpadních vodách.
- Bylo analyzováno 118 vzorků z velkých měst, kde byl v době epidemie předpokládán alespoň minimální výskyt chřipky. Ve vzorcích byla v 88 % prokázána přítomnost RNA SARS-CoV-2, v žádném vzorku nebyly detekovány specifické oblasti genomu virů chřipky A a B, což bylo způsobeno úplným potlačením výskytu chřipky na území ČR v období epidemie.
- I přes neprokázání specifických oblastí genomu virů chřipky A a B v našich vzorcích je pravděpodobné, že využití WBE je v podmínkách ČR vhodným nástrojem pro epidemiologický dohled výskytu a šíření respiračních nemocí, jejichž epidemické šíření má celospolečenský význam v důsledku velmi vysoké nemocnosti a pracovní neschopnosti s rychlým nástupem nemoci.
- 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 známy epidemiologické souvislosti, při nichž byla prokázána RNA HAV v odpadních vodách. Proto lze předpokládat, že využití WBE pro detekci RNA HAV bude v podmínkách ČR vhodným nástrojem pro epidemiologický dohled nad výskytem a šířením nebezpečného onemocnění.

4. Stanovení neopterinu

- Byl vyvinut a odzkoušen postup stanovení neopterinu v odpadních vodách jako biomarkeru buněčné imunitní reakce těla na virové a bakteriální infekce. Metoda je na principu kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), mez stanovitelnosti metody byla 0,05 ug/l odpadní vody.
- Na třech dlouhodoběji monitorovaných ČOV (ÚČOV Praha, ČOV Brno, ČOV Kladno (Vrapice) bylo zjištěno, že v odpadních vodách nejdříve dochází ke zvyšování koncentrace neopterinu, které je následováno zvyšováním koncentrace RNA SARS-CoV-2.

- 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 z pohledu epidemiologického přístupu k odpadním vodám.

5. 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 a v období výskytu jednotlivých variant viru.
- Vyhodnocení bylo komplikováno průběhem protiepidemických opatření, kdy se velmi často měnily možnosti a povinnosti testování, které významně ovlivňovaly přirozené epidemiologické údaje o počtech pozitivně testovaných osob. Tato fakta se promítla do kvality datových sad počtů pozitivně testovaných osob, které byly použity pro vyhodnocení a ovlivnily korelace těchto počtů s výsledky z odpadních vod.
- Výsledné hodnocení výsledků bylo ovlivněno i evidencí pozitivně testovaných osob. Pozitivně testované osoby byli do systému zařazeni podle místa trvalého bydliště, což nemuselo vždy souhlasit s jejich skutečným pobytem.
- 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 (GE/ml) v odpadních vodách. Podobná korelace byla pozorována mezi množstvím detekovaného SARS-CoV-2 GE/ml a podílem pozitivně testovaných osob napojených na jednotlivé ČOV.
- Nebyla prokázána korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a koncentrací chemických parametrů.
- Nebyla prokázána korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.
- Výsledek korelační analýzy pro variantu alfa neprokázal korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekované RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách. Výsledky byly významně ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat (málo získaných hodnot pro mnoho ČOV). Korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a koncentrací chemických parametrů nebyla v případě varianty alfa v získaných datech prokázána. Korelace nebyla zjištěna ani mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.
- Výsledek korelační analýzy pro variantu delta prokázal vysokou korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti 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 ze všech osob napojených na příslušnou ČOV. Korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a koncentrací chemických parametrů nebyla v případě varianty delta v získaných datech prokázána. Korelace nebyla zjištěna ani mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.
- Výsledek z korelační analýzy pro variantu omikron neprokázal korelaci mezi počtem pozitivně testovaných osob v oblasti ČOV a množstvím detekované RNA SARS-CoV-2 v odpadních vodách. Korelace nebyla pozorována ani mezi množstvím detekovaného množství RNA SARS-CoV-2 a podílem pozitivně testovaných osob ze všech osob napojených na konkrétní ČOV. Tyto výsledky byly významně ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat (změna závažnosti klinických příznaků infekce a přístupu obyvatel k testování). Korelace mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a koncentrací chemických parametrů nebyla v případě varianty delta v získaných

datech prokázána. Korelace nebyla zjištěna ani mezi množstvím RNA SARS-CoV-2 a množstvím odpadních vod, podílem průmyslových odpadních vod, délkou kanalizační sítě či počtem na ČOV napojených obyvatel.

- 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 mj. ovlivněny počtem a skladbou analyzovaných dat a závažností klinických příznaků infekce.
- Statistické vyhodnocení pomocí korelačních koeficientů potvrdilo, že pro monitoring SARS-CoV-2 v odpadních vodách jsou vhodnější slévané vzorky.
- Statistické analýzy neprokázaly, že by některé z uvedených velikostních kategorií ČOV byly pro účel monitoringu vhodnější než jiné.
- 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

5 ZÁVĚR

Stanovení korelací a komparací mezi naměřeným množstvím genetického materiálu rizikového biologického agens nebo biomarkeru v odpadních vodách a hlášenými klinickými případy onemocnění nebo rozšířením onemocnění ve sledované populaci je konečným cílem WBE. Korelace prokázané v naší studii potvrdily, 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 vytvoření 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).

6 PŘÍLOHY

- P1_ Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2 (VÚVeL 141/2022)
- P2_ Detekce indikátorů fekálního znečištění – humánních adenovirů metodou qPCR a
- P3_ Detekce a kvantifikace externí kontroly procesu analýzy vzorků odpadních vod metodou RT-qPCR s následujícím stanovením účinnosti celého procesu
- P4_ Protokol o schválení Metodického postupu analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2
- P5_ Zpráva k MPZ detekce SARS-CoV-2 v odpadních vodách
- P6_ Standardní operační postup: Detekce specifických oblastí genomu viru hepatitidy A metodou RT-qPCR
- P7_ Standardní operační postup: Detekce specifických oblastí genomu virů chřipky A a B metodou RT-qPCR
- P8_ Seznam použité literatury
- P9_ Seznam našich publikací a prezentací
- P_10 Metodický postup využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování
- T1_ výsledky tabelárně_T1.1-T112
 - T1.1_duplicity_VUV
 - T1.2_duplicity VUVeL-Brno
 - T1.3_duplicity VUVeL-Praha
 - T1.4_duplicity VUV Praha-Brno
 - T1.5_prostýXS24
 - T1.6_INFluenza
 - T1.7_HAV_NoV
 - T1.8_S18xS24
 - T1.9_homogenita
 - T1.10_časová FCH-data
 - T1.11_časová data-CoV
 - T1.12_kategorie
- T2_přehled a charakteristika sledovaných ČOV
- T3_výsledky monit_etapa 4_k 221125
- T4_neopterin výsledky
- T5_výsledky monit_grafy
- T6_Statistika