ALTERNATOR
Misliti znanost.

Kako analize odpadnih voda pomagajo pri odkrivanju in spremljanju virusnih epidemij

28. 11. 2022

Številka: 36/2022

Avtorji:

- Olivera Maksimović
- Katarina Bačnik
- Nina Prezelj
- Ion Gutierrez Aguirre
- Denis Kutnjak



Čistilna naprava v Kranju, foto: Arne Hodalič

Odpadne vode, ki se po kanalizacijskem sistemu iz gospodinjstev zbirajo v čistilnih napravah in na katere običajno pozabimo v trenutku, ko zapremo pipo ali potegnemo vodo na stranišču, v sebi skrivajo številne informacije o naših življenjskih navadah, zdravju in okolju, v katerem živimo. Razvoj metod za zaznavanje različnih snovi in mikrobov nam denimo omogoča spremljanje razširjenosti uporabe prepovedanih drog, nadzor nad onesnaženostjo s težkimi kovinami in organskimi onesnaževali in – nenazadnje – zgodnejše odkrivanje ter spremljanje širjenja virusnih povzročiteljev bolezni.

Zgodovina epidemiologije odpadnih voda

Začetki uporabe odpadne vode v epidemiologiji virusnih bolezni segajo v prvo polovico 20. stoletja, ko so znanstveniki prvič potrdili (https://doi.org/10.1084/jem.71.6.765) prisotnost virusa otroške paralize oziroma poliovirusa v odplakah. Z uspešnim okuževanjem opic z vzorci odpadne vode so potrdili verjetno prisotnost tega virusa v odpadni vodi ter opozorili na takrat še neznano fekalno-oralno pot prenosa poliovirusa. Hkrati pa so pokazali, da se lahko odpadno vodo uporabi kot pokazatelj prisotnosti in razširjenosti virusnih bolezni. Nadaljnje študije in hiter razvoj molekularnih metod – predvsem

odkritje zdaj že vsem poznane verižne reakcije s polimerazo (PCR) – so omogočile širšo uporabo epidemiologije odpadnih voda tudi za zgodnje odkrivanje in časovno spremljanje npr. bakterije salmonele, norovirusa, virusa hepatitisa A. Vsesplošno mednarodno uporabo epidemiologije odpadnih voda pa je pospešila pandemija covida-19, med katero je bilo ravno zgodnje odkrivanje virusa na širšem področju izrednega pomena za uspešno preprečevanje širjenja okužb. Monitoring SARS-CoV-2 v odpadnih vodah je tako postal komplementarna metoda za spremljanje dinamike epidemije .

Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah

SARS-CoV-2 je respiratorni virus, ki okužuje dihala, vendar preide tudi v prebavni trakt in se izloča v blatu okuženih posameznikov ter tako preko kanalizacijskega sistema pride do čistilne naprave. Glede na dosedanje izkušnje in raziskave SARS-CoV-2 v odpadnih vodah ne predstavlja znatne nevarnosti za zdravje ljudi. Njegova prisotnost in količina v odpadnih vodah pa nam lahko povesta veliko o poteku epidemije v neki populaciji. Pomembna lastnost virusov je, da se zunaj svojega gostitelja ne razmnožujejo in zato njihove koncentracije v odpadni vodi dajejo jasno sliko o razširjenosti bolezni, saj odražajo vse okužene in ne zgolj tistih, ki kažejo simptome okužbe z virusom in so pozitivni na testiranju. Študije (https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5) so pokazale, da lahko nukleinske kisline SARS-CoV-2 zaznamo v blatu še pred pojavom bolezenskih znakov ter pri posameznikih brez ali z blagimi bolezenskimi znaki, ki še posebej pri okužbah z novejšimi različicam virusa predstavljajo pomemben delež vseh okuženih. Gre torej za metodo zgodnjega zaznavanja virusa, ki je neodvisna od sprememb načinov kliničnih testiranj. Analize odpadnih voda so popolnoma anonimen pristop, saj se podatki pripišejo delu populacije, npr. prebivalcem občine in ne posamezniku. Dodatna prednost je tudi stroškovna učinkovitost v primerjavi z rednim obsežnim testiranjem prebivalstva. Koristi epidemiologije odpadnih voda so bile uradno prepoznane tudi na zadnjem srečanju (https://www.g7germany.de/resource/blob/974430/2042058/5651daa321517b089cdccfaffd1e37a1/2022-05-20-g7-health-ministers-communique-data.pdf) voditeljev držav G7, v okviru katerega so se v obdobju do leta 2024 zavezali k podpori takim neinvazivnim metodam, posebej pri postavitvi potrebne infrastrukture za monitoring patogenih mikrobov v odpadnih vodah.

Zaznavanje virusov v vzorcih odpadne vode je velik raziskovalni izziv

Oviri pri zaznavanju virusov v odpadnih vodah sta kompleksnost vzorca odpadne vode za analizo, saj so v njej prisotne številne snovi in raznoliki mikrobi, ter nizka koncentracija virusov. Pri zaznavanju virusov v odpadnih vodah sta tako izjemno pomembna preverjanje učinkovitosti koncentracijske metode in preverjanje občutljivosti metode za zaznavo virusov. Po vzorčenju odpadne vode na vtoku v čistilno napravo, kjer se reprezentativen vzorec zbira 24 ur, sledi koncentriranje virusov z uporabo različnih metod, denimo filtracije, flokulacije (izločanja majhnih delcev iz raztopine), obarjanja ali centrifugiranja. Med postopkom koncentracije se lahko kopičijo tudi inhibitorne snovi, ki zavirajo izolacijo nukleinskih kislin in PCR v nadaljevanju analize. Odplake vsebujejo tudi obilico drugih mikrobov in snovi, ki lahko vodijo do lažno pozitivnih rezultatov. Zato je za končne rezultate izjemno pomembna optimizacija in ustrezno preverjanje posameznih korakov analize.

Kako pri nas zaznavamo SARS-CoV-2 v odpadni vodi?

Po razglasitvi pandemije covida-19 marca 2020 smo tudi pri nas pričeli s prvimi poskusi testiranja odpadne vode na prisotnost SARS-CoV-2. Pri tem smo se oprli na predhodne izkušnje (https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115628) iskanja virusov v odpadnih, površinskih in namakalnih vodah, ki so nam – skupaj s hitro izmenjavo znanja z raziskovalci iz tujine – zelo koristile pri vzpostavljanju metodologije za zaznavanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah. Rezultate preverjanja metod oziroma posameznih korakov analize smo objavili v raziskavi (https://doi.org/10.1007/s12560-022-09533-0) , kjer smo predstavili primerjave med različnimi metodami in vzpostavitev sistema, ki ga še vedno uporabljamo v okviru monitoringa odpadnih voda v Sloveniji. Odpadno vodo prečrpamo skozi filter, ki ujame vse nukleinske kisline, prisotne v vzorcu. V nadaljnjem postopku odstranimo prisotne inhibitorne snovi in nukleinske kisline izperemo v manjši volumen ter jih s tem skoncentriramo. Prisotnost in količino iskanega genomskega materiala SARS-CoV-2 kasneje določimo s specifično verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR). Opisani protokol nam omogoča dolgoročno in sočasno spremljanje količine virusa v odpadnih vodah na sedmih čistilnih napravah: v Ljubljani, Domžalah - Kamniku, Kranju, Kopru, Velenju - Šoštanju, Celju in Mariboru. Kljub vzpostavitvi robustnih metod pa se kompleksna sestava vzorcev in njihov vpliv na analizo lahko močno razlikujeta od lokacije do lokacije, pa tudi znotraj istega mesta vzorčenja. Nihanja so posledica različnih temperatur, količine padavin, ki odpadno vodo razredčijo, spreminjajočega se deleža gospodinjske in industrijske odpadne vode ter drugih faktorjev, ki lahko močno vplivajo na rezultate. Za ublažitev omenjenih vplivov oziroma normalizacijo rezultatov uporabljamo podatke o količini virusa blage lisavosti paprike (PMMoV (https://en.wikipedia.org/wiki/Pepper_mild_mottle_virus)), ki poleg paprike okužuje tudi paradižnik in druge razhudnikovke. Virus je zelo stabilen in zato prisoten tako v prehranskih izdelkih, ki vsebujejo denimo papriko kot v vzorcih človeškega blata in odpadne vode. Zaradi njegove razširjenosti je dober indikator fekalne onesnaženosti, zato vzporedno sledenje prisotnosti omenjenega virusa v odpadnih vodah omogoča oceno vplivov zunanjih dejavnikov in normalizacijo podatkov o količini SARS-CoV-2 v odpadnih vodah. Na ta način dobimo natančnejše podatke o spreminjajočih se trendih koncentracij SARS-CoV-2 v vzorcih odpadne vode. Podatki so javno dostopni in služijo kot dodaten kamenček v mozaiku spremljanja stanja epidemije tega virusa v Sloveniji. V analizo odpadnih voda vključujemo tudi visoko zmogljivo določanje nukleotidnih zaporedij (sekvenciranje), s katerim sledimo prisotnosti in relativnim deležem mutacij, ki so značilne za posamezne različice SARS-CoV-2, ki krožijo v populaciji. Na ta način z analizo enega vzorca odpadne vode pridobimo širšo sliko o

deležu posameznih različic na nekem geografskem območju, kar omogoča zaznavanje pojavljanja novih različic in spremljanje njihovega širjenja.



Odpadna voda na centralni čistilni napravi Domžale - Kamnik. Foto: Klemen Razinger



Vzorce odpadnih voda zbiramo s pomočjo avtomatskega vzorčevalnika. Na sliki je prikazan vzorčevalnik na centralni čistilni napravi Domžale - Kamnik. Foto: Nina Prezelj

Izkušnje iz testiranja SARS-CoV-2 v odpadni vodi prenašamo na druge epidemije

Monitoring odpadnih voda torej predstavlja dobro rešitev za dolgoročno spremljanje SARS-CoV-2. Vzpostavitev infrastrukture za sledenje SARS-CoV-2 v odpadni vodi nam omogoča hitrejši odziv na izbruhe drugih povzročiteljev bolezni,

kot je na primer virus opičjih koz. Izbruh opičjih koz se je začel letošnjo pomlad in primeri okužb so se hitro razširil po vseh kontinentih. Širjenje virusa v posameznih državah so najprej ugotovili na podlagi podatkov o bolnikih. Po potrditvi (https://time.com/6206767/wastewater-monkeypox-tracking/) , da je tudi ta virus mogoče najti v odpadnih vodah, so njegovo zaznavanje hitro vključili v monitoring odpadnih voda, kjer je ta že bil vzpostavljen za spremljanje SARS-CoV-2. Tako so denimo v Kaliforniji (https://health.ucsd.edu/news/releases/Pages/2022-08-10-uc-san-diego-researchers-add-monkeypox-to-wastewater-surveillance.aspx) zaznali prisotnost opičjih koz v številnih okrajih, še preden so zdravniki poročali o prvih primerih bolnikov. Prav tako so tudi v drugih zveznih državah ZDA z zgodnjim odkrivanjem s pomočjo analiz odpadnih voda zagotovili več časa za izvedbo preventivnih ukrepov proti širjenju bolezni. Podobno so z uporabo epidemiologije odpadnih voda letos v ZDA in Veliki Britaniji poročali o prisotnosti virusa otroške paralize v dveh okrožjih New Yorka in v Londonu. Čeprav smo ta virus v mnogih državah s cepivi izkoreninili že v zadnjih desetletjih prejšnjega stoletja in je tveganje za splošno populacijo precej nizko, je ta ugotovitev pristojnim omogočila, da sprejmejo ukrepe za zaščito ranljivih skupin in splošno povečajo ozaveščenost ter preprečijo nadaljnje širjenje virusa. V odpadni vodi so prisotni tudi virusi, ki okužujejo rastline in povzročajo velike izgube v kmetijstvu. Pri nas smo prvi pokazali (https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115628) , da so tudi po prehodu čistilne naprave v odpadni vodi prisotni rastlinski virusi, ki so še infektivni, torej sposobni okužiti rastline in povzročiti bolezen. Z uporabo sekvenciranja virusnih nukleinskih kislin smo zaznali 47 različnih vrst rastlinskih virusov, med njimi tudi takšne, ki predhodno niso bili opisani v Sloveniji.

Raziskave in razvoj metod v času pandemije covida-19 povečujejo pripravljenost za sledenje potencialnih patogenih mikrobov in drugih snovi ter označevalcev v odpadni vodi. Pristop epidemiologije odpadnih voda ima izredno velik potencial za dolgoročno spremljanje epidemiološkega stanja z zdravjem povezanih označevalcev, ki so poleg mikrobnih povzročiteljev bolezni tudi npr. toksini, hormonski motilci in geni za odpornost bakterij na antibiotike. Hkrati pa uporaba podobnih postopkov omogoča odzivanje na pojav patogenih mikrobov in onesnažil v kmetijstvu, živinoreji in na splošno v okolju. Analize odpadnih voda v prihodnosti lahko postanejo nepogrešljivo orodje za spremljanje življenjskih navad in zdravja ljudi ter okolja.



Čistilna naprava v Kranju. Foto: Katja Bidovec