

PRISUSTVO VIRUSA SARS-CoV-2 U OTPADNIM VODAMA

Vučković, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:625992>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vučković Bruno

PRISUSTVO VIRUSA SARS-CoV-2 U OTPADNIM VODAMA
THE PRESENCE OF THE SARS-CoV-2 VIRUS IN THE WASTEWATERS

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Ovim radom se zahvaljujem...

...ponajviše majci Jasni i ocu Teu na ohrabrenju i podršci kroz sve ove godine studiranja da bih napokon i postao magistar, te njima i posvećujem ovaj rad...

...svim prijateljima od doma koje sam imao i prije samog odlaska na fakultet, te novostečenim iz Zagreba (Posušja i okolice) te Rijeke koji su bili uz mene u težim i lakšim trenucima...

...kolegici i mentorici mag.oec, Gordani Bugarinović na prilici za stjecanje radnog iskustva tokom studiranja na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko goranske županije, te ostalim kolegama koje sam imao priliku time upoznati...

...mentoru doc.dr.sc. Marinu Gladu koji je imao iznimne razine strpljenja pri stručnom vođenju ovog diplomskog rada te mi prenio znanje koje će mi biti od koristi u budućim radnim ili obrazovnim okružjima...

...kolegama s raznih odsjeka Odjela za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju koji su mi pomogli u praksi pri izradi ovog diplomskog rada od uzorkovanja do laboratorijskih metoda...

Hvala vam na svemu.

Bruno Vučković

SAŽETAK

Uvodno poglavlje daje pregled važnosti utjecaja epidemiologije temeljene na otpadnim vodama u praćenju zaraznih bolesti. Naglašava potencijal detekcije i kvantifikacije virusne RNK u otpadnim vodama kao alat za ranu detekciju, nadzor i javnozdravstvene intervencije. U materijalima i metodama se opisuju tehnike uzorkovanja i analiza korištenih u ovom diplomskom radu, tj. proces prikupljanja uzoraka otpadnih voda s različitih lokacija grada Rijeke te procesa qPCR analize za detekciju i kvantifikaciju SARS-CoV-2 RNK. Također, naglašena je logika iza odabira lokacija uzorkovanja, odnosno što se sve uzimalo u obzir prilikom odabira istih poput blizine određenih javnozdravstvenih ustanova, te frekvencija i trajanje uzorkovanja. Pri obradi podataka te samom prikazu rezultata prezentirani su podaci prikupljeni putem qPCR analize uzoraka otpadnih voda. Uključuje grafičke prikaze intenziteta fluorescencije i standardnih krivulja korištenih u kvantifikaciji. Također se ukazuje na razlike u virusnim koncentracijama između lokacija uzorkovanja te na važnost razmatranja vanjskih faktora poput meteoroloških uvjeta pri uzorkovanju. U raspravi se zadire dublje u rezultate i uvide samog istraživanja. Naglašava se uspješno uspostavljanje metoda za detekciju i kvantifikaciju SARS-CoV-2 RNK u otpadnim vodama. No, napominju se i mnogi izazovi i ograničenja epidemiologije temeljene na otpadnim vodama kao što su manjak standardne definicije pozitivnih uzoraka i potrebe za daljnjim istraživanjima i razvoju metodologije. Konačno, zaključak sabire glavna otkrića i implikacije diplomskog rada. Naglašava vrijednost praćenja otpadnih voda za ranu detekciju, nadzor i javnozdravstvene intervencije te potencijal epidemiologije temeljene na otpadnim vodama u praćenju ne samo SARS-CoV-2 virusa već i ostalih novonastalih virusnih bolesti.

Sveukupno, diplomski rad pokazuje korisnost epidemiologije temeljene na otpadnim vodama u otkrivanju i praćenju zaraznih bolesti, pružajući vrijedne uvide za javnozdravstvene institucije.

Ključne riječi: Epidemiologija temeljena na otpadnim vodama, SARS-CoV-2, detekcija, nadzor, javno zdravstvo.

SUMMARY

The introductory chapter provides an overview of the importance of wastewater-based epidemiology in monitoring infectious diseases. It emphasizes the potential for detecting and quantifying viral RNA in wastewater as a tool for early detection, surveillance, and public health interventions. The materials and methods section describes the sampling and analysis techniques used in this master's thesis, specifically the process of collecting wastewater samples from various locations in the city of Rijeka and the qPCR analysis process for detecting and quantifying SARS-CoV-2 RNA. The rationale behind the selection of sampling locations is also highlighted, including considerations such as proximity to specific public health institutions, as well as the frequency and duration of sampling. The data processing and presentation of results include data collected through qPCR analysis of wastewater samples. It includes graphical representations of fluorescence intensities and standard curves used in quantification. It also highlights the differences in viral concentrations between sampling locations and the importance of considering external factors such as meteorological conditions during sampling. The discussion delves deeper into the results and insights of the research itself. It emphasizes the successful establishment of methods for detecting and quantifying SARS-CoV-2 RNA in wastewater. However, it also mentions numerous challenges and limitations of wastewater-based epidemiology, such as the lack of a standard definition for positive samples and the need for further research and methodological development. Finally, the conclusion summarizes the main findings and implications of the thesis. It emphasizes the value of wastewater monitoring for early detection, surveillance, and public health interventions, as well as the potential of wastewater-based epidemiology in monitoring not only SARS-CoV-2 but also other emerging viral diseases.

Overall, the thesis demonstrates the utility of wastewater-based epidemiology in detecting and monitoring infectious diseases, providing valuable insights for public health institutions.

Key words: Wastewater-based epidemiology, SARS CoV-2, detection, surveillance, public health.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SARS-COV, TEŠKI AKUTNI RESPIRATORNI SINDROM.....	2
1.2. SARS-COV-2, COVID-19 PANDEMIJA	6
1.3. EPIDEMIOLOGIJA TEMELJENA NA OTPADNIM VODAMA	10
1.4. NAJNOVIJI NAPRETKI I ZAKLJUČCI U RAZUMIJEVANJU PERZISTENCIJE SARS-COV-2 U OTPADNIM VODAMA.....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE.....	16
3.2. LABORATORIJSKE METODE.....	19
3.2.1. Izolacija RNK	19
3.2.2. qPCR.....	21
3.3. OBRADA PODATAKA	25
4. REZULTATI.....	26
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČAK	32
7. LITERATURA	33
ŽIVOTOPIS	38
PRILOZI.....	39
Popis tablica	39
Popis slika	39

1. UVOD

U uvodnom ću dijelu ovog rada objasniti pojam epidemiologije bazirane na podacima iz otpadnih voda, njenu povijest te korištenje u raznim područjima kao i buduće prospekte. Također ću napraviti kratak pregled SARS-CoV-1 virusa te se nastavno vezati na SARS-CoV-2 virus, odnosno pandemiju COVID19 kroz samu epidemiologiju temeljenu na otpadnim vodama.

1.1. SARS-COV, TEŠKI AKUTNI RESPIRATORNI SINDROM

Koronavirusi su skupina virusa koji se sastoje od mnogih poznatih sojeva filogenetski povezanih sa teškim akutnim respiratornim sindromom te znamo kako posjeduju mogućnost da zaraze ljude, šišmiše te neke od ostalih sisavaca. Pripadaju rodu *Betacoronavirus*, odnosno porodici *Sarbecovirus*. Oba soja su uzrokovale svojevrsne pandemije iako je prva inačica uzrokovala daleko manje slučajeva za razliku od pandemije SARS-CoV-2 virusa koja se i dalje odvija. Postoji stotine ostalih sojeva koronavirusa koje uglavnom ne pogađaju ljude, odnosno njihov glavni prirodni rezervoar su šišmiši a veći broj ih je identificiran i kod lavrenog uvijača od kojih je jedan upravo SARS-CoV-1. Od onih koji uzrokuju bolesti kod ljudi osim dva nabrojana navodimo:

- Humani koronavirus 229E
- Humani koronavirus NL63
- Humani koronavirus OC43
- Humani koronavirus HKU1
- MERS-CoV (izazvao pojavu srednjoistočnog respiratornog sindroma)

Vrijedi napomenuti kako oba virusa potječu od zajedničkog “pretka“ te kako SARS-CoV-2 nije direktni “potomak“ SARS-CoV-1 virusa. (Woo i sur., 2010)

Pandemija SARS-CoV-1 koja je trajala od 2002. do 2004. godine je uzrokovala najmanje 774 smrtna slučaja globalno a zaraženo je preko 8000 ljudi u 29 države svijeta. Stopa smrtnosti je iznosila čak 9%, a za starije od 60 godina i do 50%. Samo izbijanje zaraze je prepoznato u kineskom Foshanu, krajem studenog 2002.godine te Svjetska zdravstvena organizacija izdaje globalno upozorenje u ožujku 2003.godine. (Kineska vlada i zakon, 2003) U samim počecima pandemije sami uzrok nije bio poznat a mediji su krivca pronašli u virusu

influence. (BBC, 2003) No u samom početku pandemije kineska vlada zabranjuje lokalnim medijima pisati izvještaje o bolesti te se same informacije ne šire izvan pokrajine Guangdong gdje čak ni sami tim poslan od strane WHO (World Health Organization – Svjetska zdravstvena organizacija) nije imao pristup. Kineska se vlada kasnije nosila s teškim kritikama zbog načina nošenja s novonastalom pandemijom te se njena politika morala mijenjati kako bi se sama pandemija suzbila. (The New York Times, 2009)

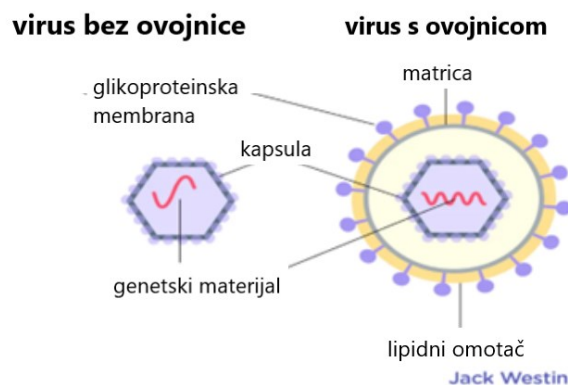
Kako se kasnije i ponovilo, samo izbijanje zaraze se odvijalo u industriji hrane, to jest na tržnicama te kako su zaraženi farmeri, trgovci, kuhari i slični ubrzo tražili liječničku pomoć, od prvih 305 slučajeva je čak njih 105 bilo zdravstvenih radnika. (Skowronski i sur., 2005) Razne pretpostavke globalnih zdravstvenih institucija te medija prestaju kada je Carlo Urbani, talijanski liječnik identificirao SARS kao uzrok nove zarazne virusne bolesti a kasnije i sam podliježe istoj. (WHO, 2018) Krajem 2004. godine kao i u 2005. godini nije bilo prijavljenih slučajeva SARS-CoV-1 a sami soj virusa koji je uzrokovao opisanu bolest nije viđen izvan laboratorija od tada. (Yardley, 2005)

Teški akutni respiratorni sindrom je bolest izazvana SARS-CoV-1 virusom a klinička slika se sastoji od bolova u mišićima, glavobolje, groznice i visoke temperature koje prate mnoge poteškoće u respiratornom sustavu poput kašlja, otežanog disanja i pneumonije. Također je prepoznat trend pada limfocita u krvi kod zaraženih. (Chan-Yeung i sur., 2003)

Iako ne pronalazim velik broj provedenih istraživanja koje bi povezale prvotnu SARS epidemiju i analize otpadnih voda, stručnjaci su dokazali kako je izvorno širenje epidemije povezano s neispravnim kanalizacijskim sustavom u gusto naseljenom Hong Kongu kada se smatralo da se tim putem zarazilo preko 300 ljudi. (Peiris i sur., 2003)

Zabrinutost o potencijalnom širenju okolišnim putevima nastaje kada se ustanovilo kako se SARS-CoV može replicirati unutar crijevnog trakta te da je takav patogen i odgovoran

za čest simptom dijareje kod zaraženih (od 8 do 73% svih slučajeva). Zbog takvih saznanja se i počinje povlačiti pitanje o samom prijenosu virusnih čestica te njihovom preživljavanju u vodama te otpadnim vodama. Kasnije studije su dokazale kako su koronavirusi osjetljiviji na temperaturu od poliovirusa (PV-1) te kako postoji znatna razlika u sposobnosti preživljavanja između tih virusa u otpadnim vodama. Ta sposobnost se u najvećem dijelu pridaje činjenici kako su virusi s ovojnicom kao SARS-CoV manje stabilni u okolišu za razliku od “golih virusa” poput poliovirusa.



Slika 1: Usporedba "golih" virusa i onih s ovojnicom. (Izvor: <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/virus-structure/general-structural-characteristics-nucleic-acid-and-protein-enveloped-and-nonenveloped>)

Koronavirusi odumiru jako brzo u otpadnim vodama s redukcijom od čak 99.9% u 3 dana. Nešto dulje preživljavaju u primarnim otpadnim vodama naspram daljnjih stupnjeva obrade, najvjerojatnije zbog veće količine suspendiranih krutih čestica koje pružaju određenu razinu zaštite od inaktivacije virusa. Za razliku od SARS-CoV virusa, PV-1 virus preživljava čak 10 dana u primarnim otpadnim vodama, te do 5 dana u sekundarnim. Opisana studija je dokazala kako bi transmisija SARS-CoV virusa vodenim okolišem bila od manjeg značaja naspram enterovirusa zbog brze inaktivacije. (Leung i sur., 2004)

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) 2016. prepoznaje koronavirusse kao moguće uzroke budućih epidemija kroz novonastale strategije nakon borbe s epidemijom ebole te potiču nova istraživanja, razvoj cjepiva, testova i lijekova. Nažalost, ova se pretpostavka potvrdila samo tri godine kasnije. (Asokan i sur. 2019)

1.2. SARS-COV-2, COVID-19 PANDEMIJA

Pandemija COVID-19 („coronavirus disease 2019) izazvana je sojem koronavirusa SARS-CoV-2. Virus je prvotno identificiran u Wuhanu, kineske pokrajine Hubei u prosincu 2019. godine a već u ožujku 2020. godine Svjetska zdravstvena organizacija proglašava pandemiju. (WHO, 2020)

Osim što se SARS-CoV-2 pokazao kao mnogo zarazniji i lakše prenosiv virus od prijašnjeg soja SARS-CoV-1, krivca pronalazim i u manjku internacionalne suradnje, odnosno: izostanku brzog obavještanja pri samom izbijanju epidemije, kašnjenju pri prepoznavanju kapljičnog prijenosa virusa, primjenjivanju sukladnih mjera suzbijanja, manjku koordinacije i usklađenosti različitih zemalja pri primjenjivanju istih, manjak financiranja zemalja u razvoju, neraspoređenost opreme i cjepiva, zaostajanje u praćenju podataka o infektivnosti, smrtnosti i odgovoru zdravstvenog sustava, nesposobnost u borbi protiv dezinformacija i slično.

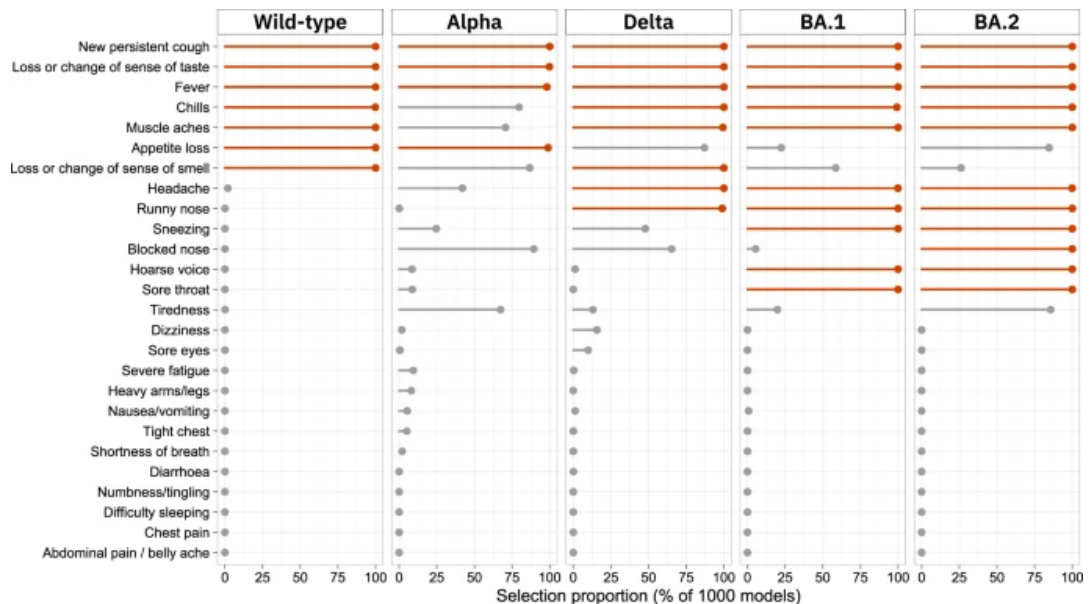
Iako još nije precizno utvrđen sami nastanak virusa, moguća su naredna dva smjera. Prvi bi bio poučak da je SARS-CoV-2 nastao iz takozvanog „natural spillover event-a“, odnosno putem istraživački nepovezanog zoonotičkog prijenosa virusa sa životinje (u ovom slučaju najvjerojatnije šišmiša) na čovjeka. Druga teorija pretpostavlja da je virus nastao u laboratorijskim uvjetima tokom istraživanja na jedan od tri sljedeća načina: zarazom istraživača prilikom prikupljanja uzoraka, prilikom istraživanja unutar laboratorija dok su još u prirodnim uvjetima i/ili nakon njihovog genetskog modificiranja. Na primjer, prva epidemija SARS-CoV-1 virusa bi se označila tzv. prirodnim prelijevanjem virusa kao i epidemija MERS-a te su nastanci tih bolesti izazvale sumnje za slične buduće događaje zbog pronalaska koronavirusa i sličnih virusa kod mnogih vrsta šišmiša cijelom Azijom kao što sam već i naveo na 7. stranici. (Sachs i sur., 2022)

Osim što se sam virus brzo širi kapljičnim putem, kao i zrakom putem aerosola također je moguć i asimptomatski kao i pre-simptomatski prijenos a reinfekcije su se znale događati i već unutar dva mjeseca. Sve navedeno otežava praćenje bolesti kao i primjenjivanje epidemioloških mjera. Sami virus je nadalje mutirao u mnoge varijante koje dijelimo na VOC (varijante koje izazivaju zabrinutost), VOI (varijante od značaja) te VUM (varijante pod nadzorom). VOC su varijante gdje postoji jasan dokaz mutacije koja će utjecati na određene sposobnosti samog virusa kao što su njegovo širenje, težina bolesti, imuni odgovor i slično. Nadalje same varijante imaju svoje pod varijante kao na primjer Omikron – BA 1.1 itd. Izdvajam sljedeće varijante koje izazivaju pozornost:

- **Alfa:** podvarijanta B.1.1.7; rujan 2020.godine, UK; povećana prenosivost i virulencija
- **Beta:** podvarijanta B.1.351; svibanj 2020.godine, JAR; povećana prenosivost, promjene na antigenost, učinkovitost cjepiva.
- **Gama:** podvarijanta P.1; studeni 2020.godine, Brazil; povećana prenosivost, virulencija, promjene na antigenost.
- **Delta:** podvarijanta B.1.617.2.; listopad 2020.godine, Indija; povećana prenosivost; promjene na antigenost.
- **Omikron:** podvarijanta B.1.1.529; studeni 2021.godine, Bocvana. (ECDC, 2023)

Osim što su ovakve varijante posljedično imale najčešće povećanu prenosivost, nerijetko su pokazivale mogućnost da poremete detekciju trenutnih dijagnostičkih analiza, smanje učinkovitost cjepiva, izazovu nešto drukčije simptome kao i reinfekciju u prethodno zaraženih i cijepljenih individua. (Vasireddy i sur., 2021)

Sami simptomi kao i kod SARS-CoV-1 pogađaju najviše respiratorni sustav. Najčešće se prijavljuju kašalj, temperatura, glavobolja, drhtavica, grlobolja te gubitak osjeta okusa ili mirisa. Također primjećujem ponešto drugačije simptome ovisno o varijanti:



Slika 2: COVID-19 specifičnost simptoma ovisno o varijanti. (Izvor: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-34244-2>)

Iako se virus, kako što sam već i naveo najviše širi kapljično te putem aerosola, SARS-CoV-2 RNA također pronalazimo i u uzorcima stolice (10^2 do 10^{10} kopija po gramu) koji dalje završavaju u otpadnim vodama. (Whitaker i sur., 2022)

Krajem 2020. otkriva se kako SARS-CoV-2 u otpadnim vodama ostaje infektivan i preko 7 dana, što je par dana dulje od SARS-CoV u sličnim uvjetima. Najveći problem leži u otpadnoj vodi iz zdravstvenih sustava koji su sposobni pozamašno povećati rizik od širenja u okolišu jer tamo i kruži najveća koncentracija zaraženih slučajeva. Dodatno pogoršava situacija činjenica da zbog inkapsulacije krutih tvari i nedovoljne dezinfekcije, virusne čestice preživljavaju u otpadnoj vodi čak i nakon odgovarajućih mjera dezinfekcije te brojnih

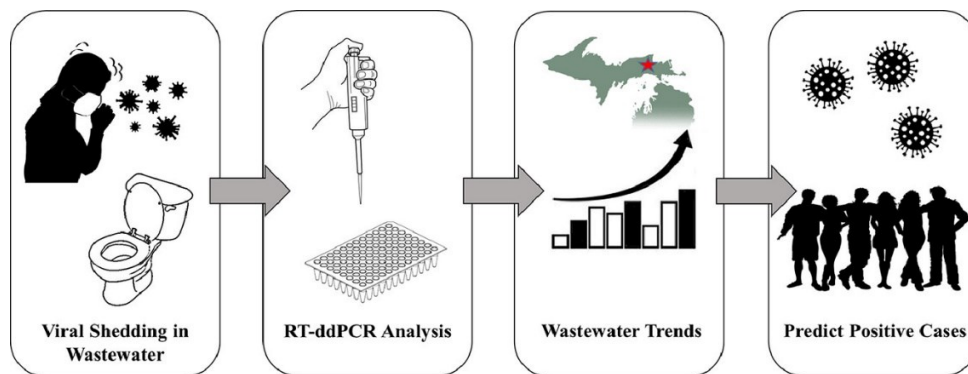
prethodnih procesa a na taj način je osiguran dugotrajan boravak istih čestica u okolišu. (Bivins i sur., 2020)

Razna istraživanja mi pokazuju da preživljavanje virusa uvelike ovisi i o temperaturi ambijenta kao što je to bio i slučaj za SARS-CoV (do 3 dana na 20°C, no preko 14 dana na 4°C). Točnije, lipidna dvostruka membrana koja obavija proteinsku kapsulu takve “obavijene“ viruse čini podložnijima na određene promjene u okolišu poput pH, saliniteta, temperature i slično. (Yang i sur., 2022)

1.3. EPIDEMIOLOGIJA TEMELJENA NA OTPADNIM VODAMA

Otpadne vode se mogu definirati kao komplicirana matrica kemijskih i bioloških markera ljudske aktivnosti. Analiza otpadnih voda daje mogućnost za praćenje korištenja određenih tvari ili izloženost drugima odnosno dobiti određene kvalitativne i kvantitativne podatke za uvid u navike stanovništva na području koje te otpadne vode i zahvaćaju. Najčešće se takvim analizama pratilo korištenje lijekova, ilegalnih droga, alkohola, cigareta i slično te je o istima napisano i najviše radova u ovom području. Kasnije se shvatio i potencijal kojeg epidemiologija temeljena na otpadnim vodama nosi za dobrobit i unaprjeđenje ljudskog zdravlja te se počinje usmjeravati pozornost i na izloženost toksinima industrijskog podrijetla, patogenima i nadalje rezistenciji na antibiotike. Dakle, postoje mnoge strategije za budućnost takve epidemiologije a i samim time mnogi izazovi koji dolaze s analizom otpadnih voda i mjerenjem kemijskih te bioloških markera za praćenje zdravlja populacije odnosno izloženosti virusnim česticama. (Choi i sur., 2018)

Epidemiologija temeljena na otpadnim vodama se kroz zadnjih par godina koristila kao alat za praćenje širenja COVID-19 te su podaci često bili korišteni kao rano upozorenje za povećanje aktivnih slučajeva u zajednici no i otkrivanje novih varijanti istog virusa na određenom području. (Ahmed i sur., 2022)



Slika 3: Shematski prikaz predviđanja aktivnih slučajeva COVID19 putem analize otpadnih voda. (Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666765722001612>)

Takve analize virusnih čestica u otpadnim vodama nisu nova tema jer su na primjer slične metode korištene već 2011. u Finskoj te 2013. u Izraelu kako bi se procijenile količine polio virusa koje su kružile populacijom. Nakon tog razdoblja, WHO (Svjetska zdravstvena organizacija) izdaje temeljne smjernice za korištenje otpadnih voda u takvim analizama. Krajem 2013. godine se također počinje pratiti prisutnost antivirusnih lijekova poput oseltamivira kao direktna poveznica s dosadašnjim istraživanjima. (Kang i sur., 2022)

Kako bih nadalje približio pojam epidemiologije temeljene na otpadnim vodama moram opisati i što su to same otpadne vode. Naime, otpadne vode se također daju definirati kao vode koje su prošle svoj određeni uporabni ciklus te su sada “štetne“ za ljudsku populaciju, odnosno nisu za ponovno korištenje barem u većini slučajeva. S obzirom na mjesto nastanka, dijele se na sanitarne i industrijske otpadne vode, odnosno komunalne (kombinacija istih). Također postoje i atmosferske otpadne vode nastale od raznih padalina koje se nadalje odlijevaju u određene prirodne zahvate. Kakve će otpadne vode biti kvalitetom ovisi o mnogim faktorima kao što su ljudske djelatnosti, stupanj razvoja, navika ljudi ali i industrije na tom području itd. Otpadne vode se moraju pročistiti ako njihova kvaliteta nije unutar zakonom danih okvira s ciljem zaštite od potencijalnog zagađenja za okoliš i ljudsko zdravlje. Što se potrošnje vode tiče, najveći dio (45%) otpada na domaćinstva te industrijsku potrošnju (30%) a nešto manje na

javnu potrošnju i gubitke na mreži (25%). Kako bi se same otpadne vode tretirale mora se poznavati gdje one nastaju, odnosno gdje se prikupljaju te njene fizičko-kemijske i biološke karakteristike koje će biti osnova za odabir tehnologija za sami tretman. Na samim karakteristikama i stupnjevima pročišćavanja se neću zadržavati no ukratko ću spomenuti kako postoji:

1. Prethodna obrada (Odstranjivanje krupnih tvari, usitnjavanje i izjednačavanje)
2. Primarna obrada (Odvajanje zrnatih i plivajućih čestica, neutralizacija)
3. Sekundarna ili biološka obrada (Biološki procesi poput primjene procesa aktivnog mulja, prokapnika, cjediljki i slično te fizikalno-kemijski procesi poput zgrušavanja i pahuljičenja)
4. Tercijarna obrada (Razni fizikalni, kemijski i biološki procesi gdje bismo kao krajnju fazu izdvojili samu dezinfekciju). (Povrenović, 2013)

1.4. NAJNOVIJI NAPRETKI I ZAKLJUČCI U RAZUMIJEVANJU PERZISTENCIJE SARS-COV-2 U OTPADNIM VODAMA

U trenutku pisanja ovog diplomskog rada, WHO razmatra proglašenje kraja COVID-19 pandemije te bih stoga iskoristio trenutno stanje i da razmotrim brojke, odnosno statistiku. Putem službenih stranica Svjetske zdravstvene organizacije saznajemo kako je do 28. travnja 2023. globalno potvrđeno 764.474.387 slučajeva zaraženih SARS-CoV-2 virusom, potvrđenih 6.915.286 smrtnih slučajeva a pretpostavljenih oko 17,2 milijuna (izvještaj The Institute for Health Metrics and Evaluation) te se utrošilo preko 13 milijardi doza cjepiva. To bi značilo stopu smrtnosti u rangu od 0,9% do 2,2%. U Republici Hrvatskoj na isti dan podaci su ovakvi: 1,2 milijuna potvrđenih slučajeva, 18.155 smrtna slučaja i 5,3 milijuna utrošenih doza cjepiva, stopa smrtnosti prati globalne trendove.

Istraživanja diljem svijeta 2020.-2021. (Australija, Japan, Španjolska, Italija, Nizozemska te SAD) potvrđuju perzistenciju SARS-CoV-2 u otpadnim vodama te mogućnost njegovog prijenosa takvim putevima. Većina se istraživanja posvećuje uspostavljanju metoda detekcije za RNA SARS-CoV-2, optimiziraju koncentracijske alate, snižavajući granicu detekcije te rade na što uspješnijem i preciznijem lociranju samog izvora širenja virusa. Veliku ulogu igra i sama „WBE“ (Wastewater based epidemiology – epidemiologija temeljena na otpadnim vodama) kako bi se pratile infekcije u zajednici. Daljnja istraživanja rade na utvrđivanju distribucije i otpornosti samog virusa u takvoj okolini iako bi se dalo zaključiti da je i na samom kraju ove pandemije malo takvih informacija koje su ključne za epidemiologiju kako bi se ustvrdio broj potencijalnih novozaraženih slučajeva kanalizacijskim sustavima.

Epidemiologija temeljena na otpadnim vodama je vrijedna daljnjih ulaganja ponajviše iz razloga što tzv. nadzor okoliša temeljen na uzorcima otpadnih voda daje preciznija i brža predviđanja uz manja ulaganja o stanju zajednice na određenom “slijevu“ naspram kliničkih

ispitivanja. Također takva klinička ispitivanja osim što su skuplja i vremenski zahtjevnija ne mogu uključiti pre-simptomatske i asimptomatske slučajeve. Istraživanja su potvrdila kako se praćenjem i analizom otpadnih voda mogu ranije detektirati izbijanja virusa poput norovirusa i poliovirusa nego metodom kliničkih ispitivanja. Takav potencijal da se provede „screening“ šire populacije koristeći samo manji broj uzoraka bez ovisnosti o dostupnosti kliničkih ispitivanja nije zanemariv te definitivno može ubrzati rad institucija javnog zdravstva.

Takav nadzor bi služio kao sustav ranog upozorenja jer već znam da se određeni virusi kao što je i SARS-CoV-2 počinju širiti i par dana prije pojave simptoma kod zaražene osobe te samim time stvoriti podatke koji bi poboljšali praćenje incidencije. Dodatno, nadzor bi bio koristan i kod praćenja širenja virusa među putnicima zračnih te brodskih luka a molekularnom analizom na razini zajednice je bilo moguće i prepoznati postojeće te nove varijante samog virusa. (Maryam i sur., 2023)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Saznanje da se genetski materijal SARS-CoV-2, RNK virusa, može detektirati u izmetu zaraženih osoba potaknulo je samo istraživanje. Kako u ovom trenutku u Republici Hrvatskoj ne postoji reguliran sustav detekcije patogenih virusa u komunalnim otpadnim vodama, ovom istraživanju je primarni cilj uspostaviti metodu uzorkovanja, izolacije i detekcije SARS-CoV-2 RNK u komunalnim otpadnim vodama. Time bi se postavila dobra osnova za praćenje SARS-CoV-2 virusa i drugih emergentnih bolesti uzrokovanih virusima koji se izlučuju putem stolice i mokraće u kanalizaciju. Sekundarni cilj bi bio dokazati povezanost lokalnih epidemija i velike količine virusa (SARS-Cov-2) u komunalnim otpadnim vodama. Smatram da bi ta osnova bila iznimno korisna u ranom otkrivanju i upozoravanju na pojavu zaraznih bolesti te dobivanju informacija o efikasnosti javnozdravstvenih mjera za vrijeme epidemije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE

Grad Rijeka je najveća luka Republike Hrvatske, treći njen grad po veličini te administrativno središte Primorsko-goranske županije. Nalazi se na zapadu zemlje odnosno na ušću rijeke Rječine u Jadransko more, točnije Kvarnerski zaljev.

Prethodne studije o praćenju i nadzoru virusa u otpadnim vodama otkrile su snažnu povezanost između raširenih virusnih epidemija i visokih količina virusa u komunalnim otpadnim vodama (KOV). Znanstvena istraživanja otkrivaju da se SARS-CoV-2, RNA virus, često može pronaći u izmetu zaraženih osoba i, kao rezultat toga, u otpadnim vodama na početku pandemije COVID-19. Mehanizam za praćenje prijenosa COVID-19 razvijen je kao rezultat studije epidemiologije otpadnih voda pomoću signala SARS-CoV-2. Ovim projektom osmišljena je tehnika uzorkovanja, izolacije i detekcije humanih štetnih virusa u otpadnim vodama jer u Republici Hrvatskoj ne postoji reguliran, proučen niti dugotrajan sustav za navedeno.

Sami uzorci komunalnih otpadnih voda su prikupljeni na različitim ali i strateški odabranim lokacijama sustava za javnu odvodnju grada Rijeke:

- A. Delta – ulazna građevina uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (Delta bb)
- B. Kumičićeva ulica (raskrižje Kumičićeve i ulice Slavka Krautzeka)
- C. Škurinje (Osječka 29)
- D. Krešimirova ulica (raskrižje Krešimirove i ulice Nikole Tesle)
- E. Mlaka (Zvonimirova 2)

Na sljedećoj su slici (4) označene i same lokacije prikupljanja uzoraka radi bolje preglednosti.



Slika 4: Pregled lokacija uzorkovanja (Izvor: <https://www.google.hr/maps>)

Osobno sam i posjetio lokaciju A, odnosno uređaj za pročišćavanje komunalnih voda grada Rijeke (slika 5) na Delti kako bih i svjedočio samoj proceduri načina uzorkovanja i primanja samih uzoraka. U samom zapisniku (slika 6) pri preuzimanju uzoraka otpadnih voda se bilježe i vremenski uvjeti na dan preuzimanja te prethodni dan, mjesto i vrijeme uzorkovanja, temperatura vode, protok te moguće dodatne napomene. Također moraju biti istaknute informacije o osobama koje naručuju uzorak, vrše uzorkovanje, predaju sami uzorak te preuzimaju isti.

Napomenuo bih kako se sami uzorci uzimaju prije procesa pročišćavanja o kojima sam već pisao u uvodnom poglavlju a zbog čega je naznačeno da se radi o ulaznoj građevini na prijašnjoj stranici.



Slika 5 - Lokacija A (uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Rijeke)

Oznaka dokumenta
OB 135-200

Izdanje: 1
Strana/stranica: 1/1

**Nastavni ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO
PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE
Zdravstveno-laboratorijski odjel
Krešimirava 52a, Rijeka
Tel: 951/588-735; 991/203-9722
E-mail: skolebijs@zazjppg.hr**

ZAPISNIK O PROVEDENOM UZORKOVANJU Broj zapisnika: Z-2407-2-2023-11

Zaakreditirani:
1. Opadna voda HRN ISO 5667-10:2008, HRN EN ISO 19458:2008
2. Opad HRI CEN/TR 15310-1:2008, HRI CEN/TR 15310-2:2008, HRI CEN/TR 15310-3:2008, HRI CEN/TR 15310-4:2008

Termostatar:
3. SRF HRN EN ISO 21645:2021
4. Osnak:

Naručitelj/OIB: VIK Datum: 7.02.2023.

Uređaj za uzorkovanje: 660400

Vremenske prilike dan uzorkovanja/dan prije uzorkovanja: sunčano / sunčano

U sjeku tehnološkog procesa Da Ne Kompozitni uzorak Da Ne
4h 8h 12h 24h

Prisutna vidljiva otpadna tvar*** Da Ne

R.b.	Mjesto uzorkovanja	Sat uzorkovanja	T _z ° / T _v ° (°C)	Sloboda** Ukapat** Ch.(mg/L)	Protok	Napomena
1	1772 244 344	8,15	9,0 / 6,5	-	110410	71. NjR
2	1772 244 330	8,30	9,0 / 6,0	-		-1L

* Temperatura zraka/temperatura vode, **Ako se mjeri klir, ***Ako DA, opisati sukladno postupku M 200-200.

Inkubiranje mjernog neispravnosti rezultata: Da Ne Inkubiranje izvještaja o sukladnosti: Da Ne

Pravilo odlučivanja za akreditirane metode prema postupku izdavanja izvještaja o ispitivanju (P 4-200):

- Ako je Pravilo odlučivanja definirano propisima/specifikacijama/normativnim dokumentima, u tom slučaju će se kod izvještaja o sukladnosti primijeniti njihovo regulativno po kojemu se provodi ispitivanje.
- Ako Pravilo odlučivanja nije definirano propisima/specifikacijama/normativnim dokumentima, u tom slučaju će se rezultat ocijeniti kao „sukladan“ kad se mjerni rezultat nalazi unutar ili je jednak postavljenim granicama bez ujecaja prolične mjerne nesigurnosti.

Popunjavanje zapisnika daje se suglasnost za davanje izvještaja o sukladnosti prema gore navedenom Pravilu odlučivanja.

Suglasnost korištenja rezultata ispitivanja u svrhu znanstvenih istraživanja bez navođenja podataka od naručitelja: Da Ne

Suglasnost slanja ispitnog izvještaja e-poštom: Da Ne e-poštom: _____

Predstavnik Naručitelja: Urošević Uzorkovao: Jadrić
Uzorke predao: MSD Uzorke preuzeo: Jadrić

Slika 6 - Zapisnik o provedenom uzorkovanju

3.2. LABORATORIJSKE METODE

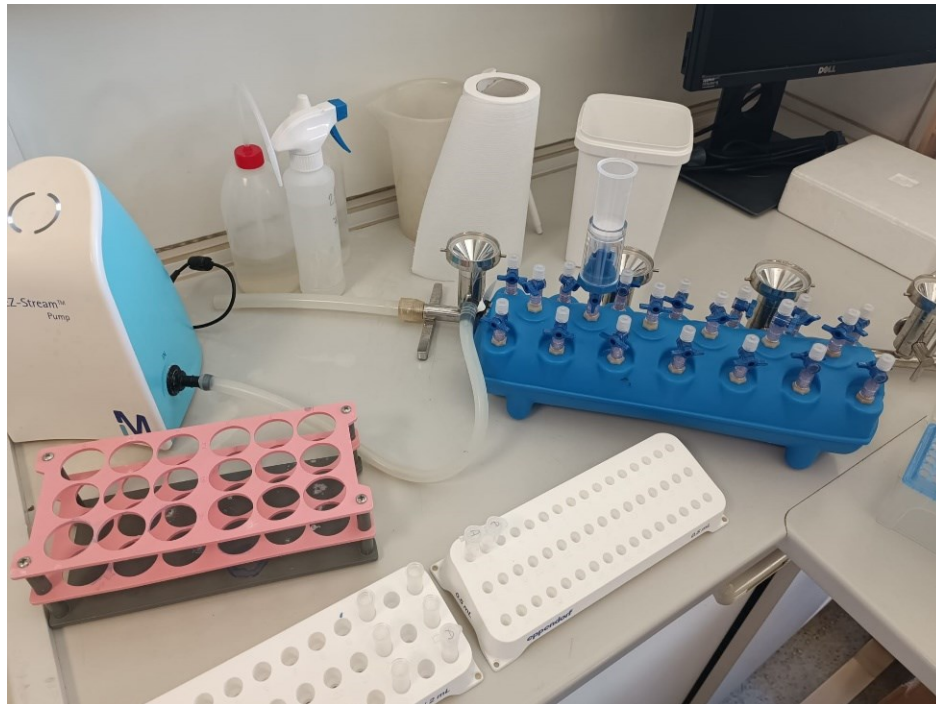
3.2.1. Izolacija RNK

Metoda za izolaciju SARS-CoV-2 RNK iz uzorka komunalnih otpadnih voda je uspostavljena pomoću Wastewater Large Volume TNA Capture Kita, Promega, USA.

S obzirom na kompleksne karakteristike komunalnih otpadnih voda odredio se optimalni volumen uzorka za detekciju virusne RNK metodom qRT-PCR te on iznosi 40 ml. U prvom dijelu se priprema uzorak kako bi naposljetku došlo do eluiranja RNK. Uzorak se inkubira sat vremena na 60 °C kako bi se izvršila pasterizacija a zatim se u sami uzorak dodaje 0,5 ml proteaze, miješa se te ponovno inkubira pola sata na sobnoj temperaturi. Zatim, kako bi se uklonile krute tvari zaostale u talogu, uzorak se centrifugira 10 min/3.000 xg. Nadalje, uzorak se dijeli na dva uzorka od 20 ml supernatanta te dodaje po 6 ml pufera 1 (Binding Buffer 1) te 0,5 ml pufera 2 (Binding Buffer 2) te miješa laganim okretanjem. Potom se dodaje 24 ml izopropanola i ponovno miješa na isti način.

Na vakumsku pumpu se stavlja mini kolona PureYield Midi Binding Column, (slika 7). Sadržaj iz epruveta se dodaje na mini kolonu te se propušta pod utjecajem vakuuma čime se RNK veže na samu kolonu a ostatak tekućine prolazi i odbacuje se. Na isti način zatim se dodaje 5 ml otopine za uklanjanje inhibitora (Inhibitor Removal Wash – CWE) te naposljetku 20 ml otopine za ispiranje RNK (RNA Wash Solution – RWA), (slika 8).

Umetanjem epruvete za prikupljanje RNK od 1,5 ml u osnovni eluator (Eluator™ Vacuum Elution Device), sustav za eluiranje je spreman. Mini-kolona se napuni sa 0,5 ml prethodno zagrijane (60 °C) vode bez nukleaza (Nuclease-Free Water) i sve dok sva tekućina ne prođe kroz kolonu, primjenjuje se najveći vakuum. Za eluiranje ukupno 1 ml otopine RNA, metoda se ponavlja uz dodavanje dodatnih 0,5 ml prethodno zagrijane vode bez nukleaza.



Slika 7 - Vakuumpumpa s mini kolonom



Slika 8 - Otopine za uklanjanje inhibitora i ispiranje RNK

Slijedi korak pročišćavanja RNK. U prethodno dobivenih 1ml eluirane RNK se dodaje 0,4 ml pufera 1 i 0,1 ml pufera 2 te nakon mješanja sadržaj se dijeli u dvije epruvete odnosno u svaku po 0,75 ml i dodaje 0,75 ml prije ponovnog miješanja. PureYield mini kolona se stavlja u epruvetu za prikupljanje te se cijeli volumen uzorka propušta kroz kolonu u koracima od 0,75 ml nakon čega se koristi mikrocentrifuga jednu minutu postavljena na 10.000 xg. Zatim se ispiru kolona jednim centrifugiranjem s 0,3 ml otopine za uklanjanje inhibitora a zatim dvaput s 0,5 ml otopine za ispiranje RNK. Mini kolona se prenosi u čistu epruvetu od 1,5 ml te na istu dodaje 0,02 ml prethodno zagrijane vode bez nukleaza te se ostavlja jednu minutu kako bi se voda upila u filter kolone. RNK se eluira centrifugiranjem na 10.000 xg tijekom 1 min a sami postupak se ponavlja s još 0,02 ml vode bez nukleaza kako bi se prikupilo ukupno 0,04 ml RNK otopine za daljnji postupak vezan uz „real time“ PCR.

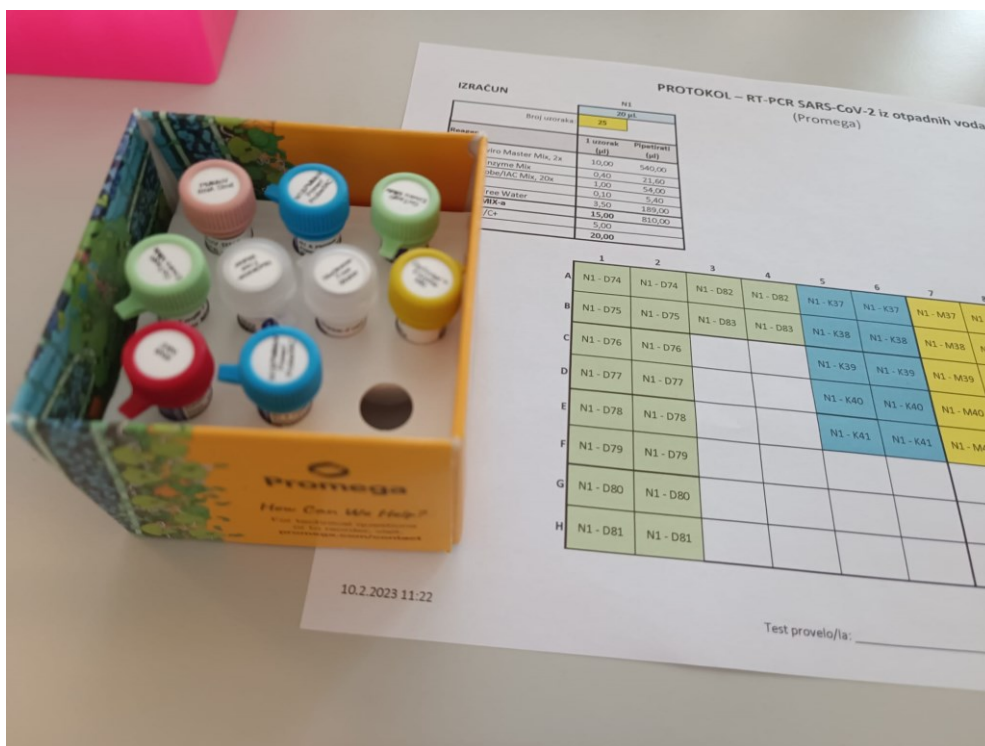
3.2.2. qPCR

PCR u realnom vremenu izvodi se pomoću kita (GoTaq® Wastewater Probe RT-qPCR Master Mix System, Promega, USA). Na mikrotitarskoj pločici za qPCR se pripremaju reakcijske smjese u ukupnom volumenu od 0,02 ml za detekciju tri virusna gena (N1, N2 i E). Svaka reakcijska smjesa sadržava 10 µl 2x GoTaqR WW mastermix, 0,4 µl 50x GoScriptR RT, 1 µl 20x Prime/Probe/IAC mixa, 3,6 µl vode bez nukleaza i 5 µl izolirane RNK. Za negativnu kontrolu umjesto uzorka nukleinske kiseline se dodaje uzorak vode bez nukleaza, za kontrolu izolacije se koristi uzorak vode bez nukleaza koji je prošao postupak izolacije ukupne RNK, dok se za pozitivnu kontrolu koristi 5 µl SARS-CoV-2 RNK dobivenim u kitu. Za dobivanje baždarne krivulje se pripremaju deseterostruka razrjeđenja kvantifikacijskog

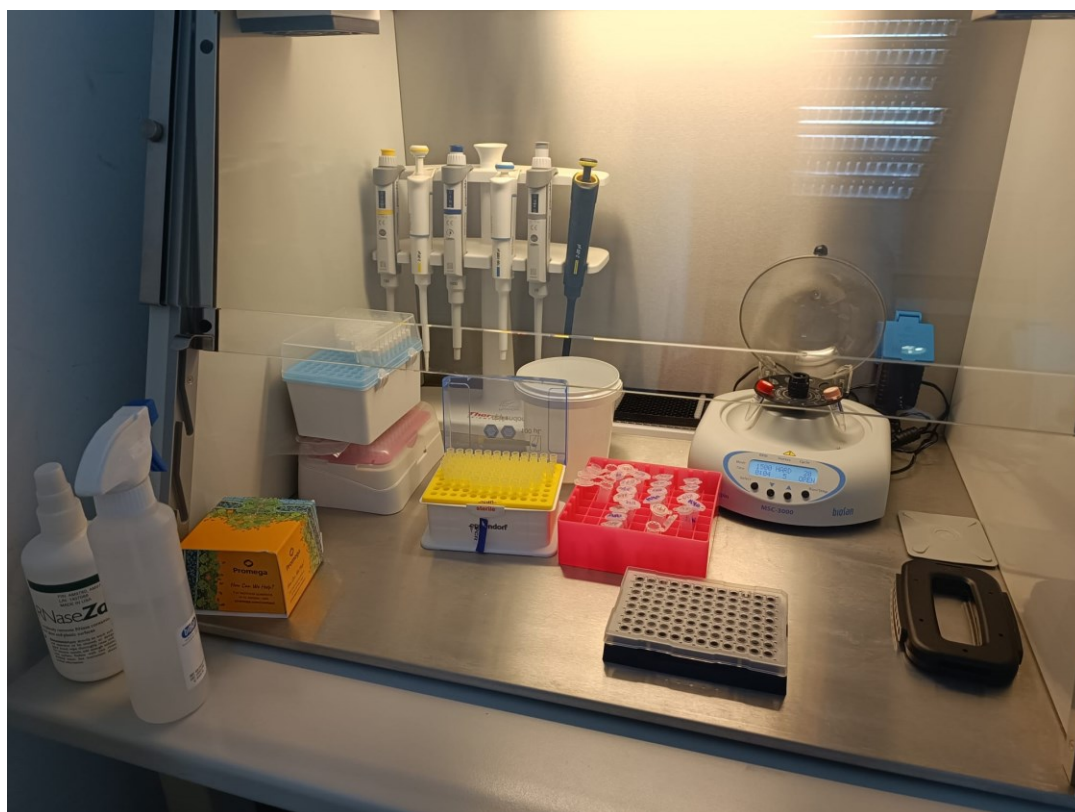
standarda dsDNA 2 x 10⁶ kopija/ µl (RNK ekvivalent 4 x 10⁶ kopija/ µl) i 5 µl svakog razrjeđenja dodano je u reakcijsku smjesu, (slike 9 i 10). Po završetku priprema razrjeđenja standarda i svih reakcijskih smjesa, provodi se pipetiranje adekvatnog volumena svake smjese, uzorka, standarda i kontrole u odgovarajuću jažicu miktrotitarske pločice. Pločica se potom zatvara samoljepljivom membranom te se postavlja u QuantStudio 5 qPCR uređaj (Thermofisher Scientific, SAD), (slika 11). Uređaj se pokreće prethodno programiranim protokolom (tablica 1).

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	45°C	15 min	1
Inaktivacija RT / aktivacija GoTaq	95°C	2 min	1
Denaturacija	95°C	15 sek	40
Anealing/ekstenzija	62°C	60 sek	

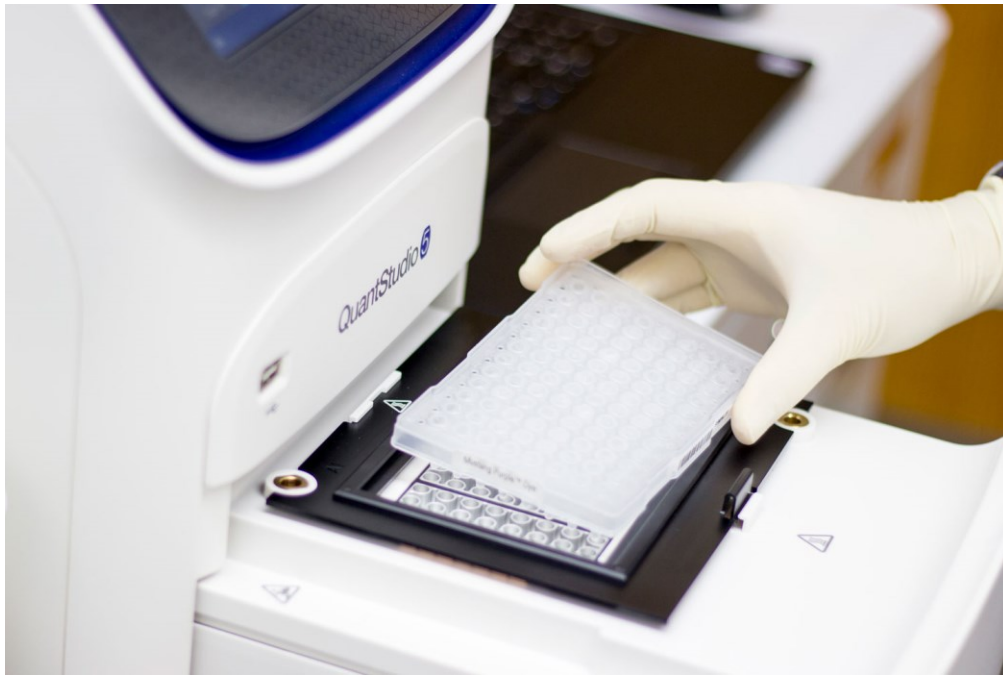
Tablica 1 - Prikaz protokola za qPCR uređaj



Slika 9 - Protokol za RT-PCR Sars-CoV-2 iz otpadnih voda



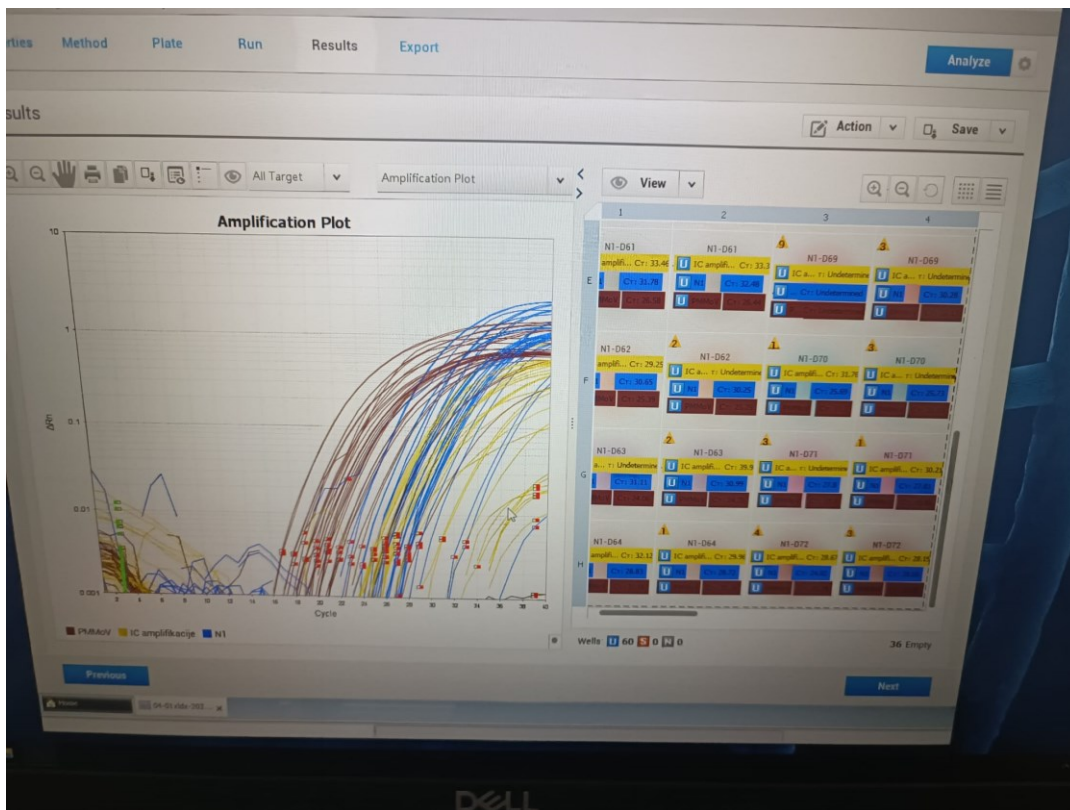
Slika 10 - Postupak pripremanja razrijeđenja za RT PCR



Slika 11 - Postavljanje pločice u qPCR uređaj

3.3. OBRADA PODATAKA

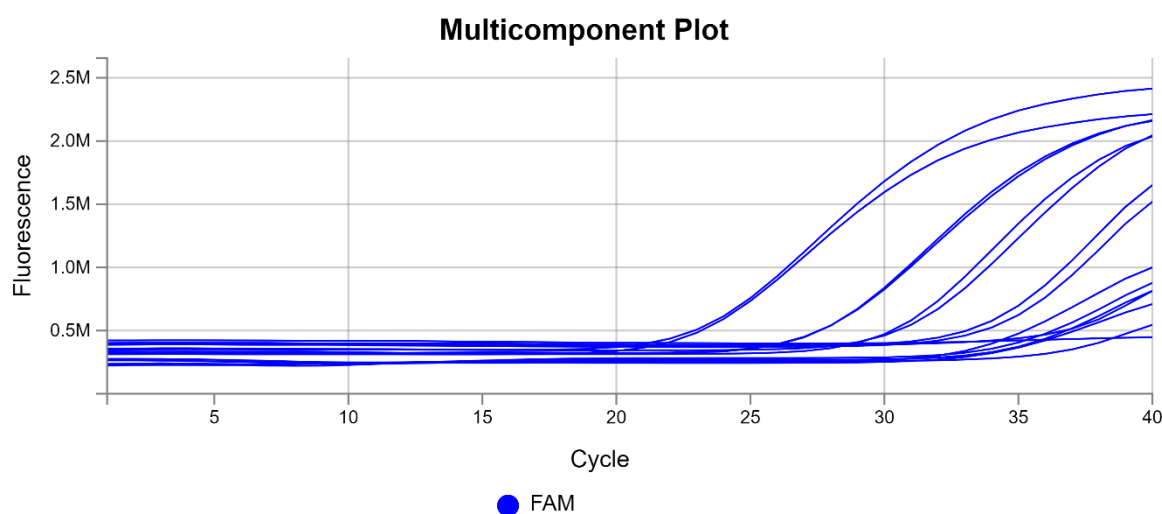
Po završetku programa obrađuju se dobiveni podaci (slika 12) i uz pomoć standardnih krivulja dobivaju konačni podaci o broju kopija SARS-CoV-2 virusa po reakcijskoj smjesi (jažici) za svaki uzorak. Dobiveni rezultati su prikazani u sljedećem poglavlju.



Slika 12 – Prikaz sučelja programa QuantStudio™ Design and Analysis nakon završene RT-qPCR reakcije

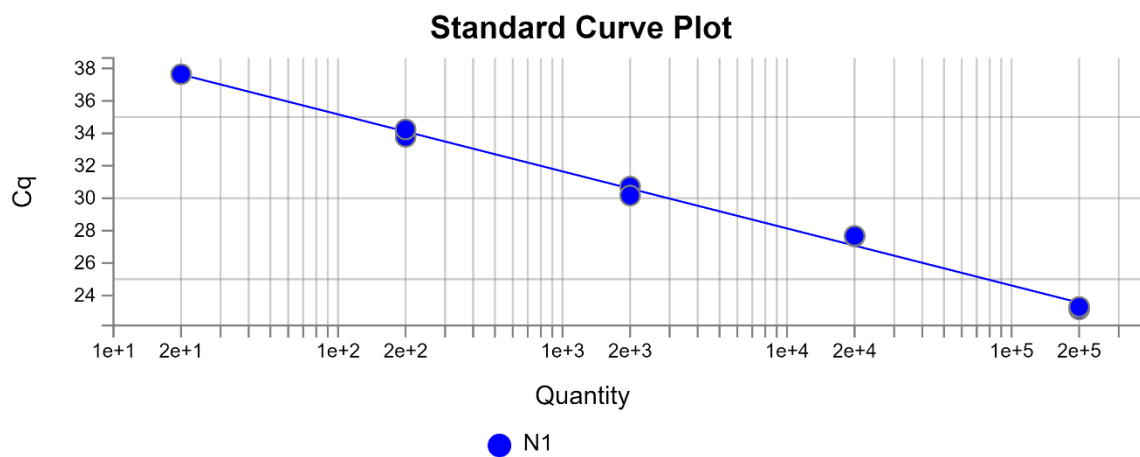
4. REZULTATI

Prikazani graf (Slika 13) je primjer prikaza rezultata qPCR-a. Iz istoga je vidljiv intenzitet fluorescencije kroz 40 ciklusa qPCR-a. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini umnožene specifične sekvence SARS-CoV-2.



Slika 13 - Grafički prikaz rezultata qPCR-a za N1 gen

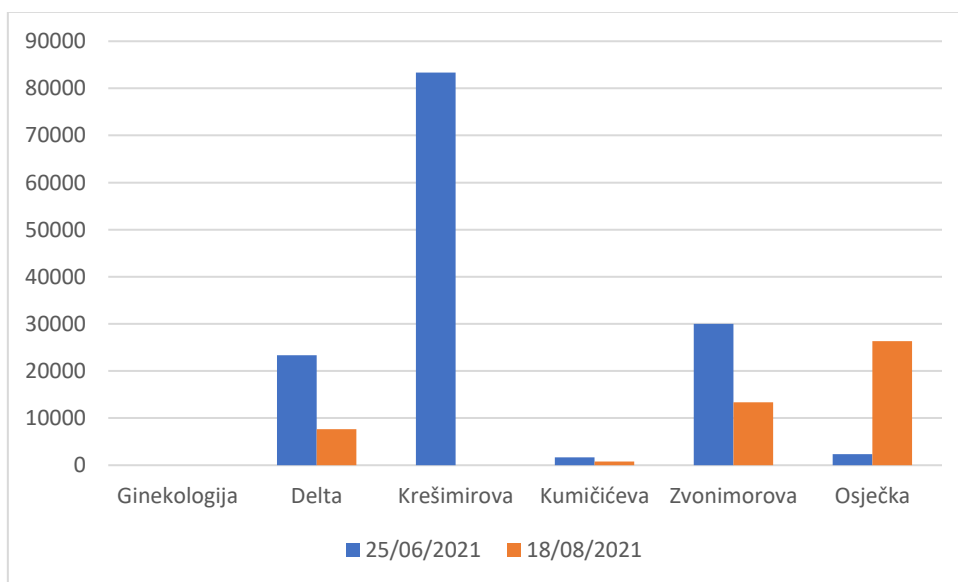
Kako bi se intenzitet fluorescencije za svaki uzorak preračunao u koncentraciju koristio se standard s točno određenim koncentracijama SARS-CoV-2 (4×10^4 kopija/ μL , 4×10^3 kopija/ μL , 4×10^2 kopija/ μL , 40 kopija/ μL i 4 kopija/ μL). Iz standardne, krivulje koju izrađuje program na osnovi koncentracije SARS-CoV-2 i intenziteta fluorescencije, izračunavaju se koncentracije virusa u svakom uzorku. Na slici 14 prikazana je standardna krivulja za izračun broja kopija SARS-CoV-2 / μL .



Target: N1 Slope: -3.519 R²: 0.994 Y-Inter: 42.209 Eff%: 92.402 Error: 0.107

Slika 14 - Standardna krivulja za N1 gen

U ovom radu obrađeno je ukupno pet lokacija (Delta, Krešimirova, Kumičićeva, Zvonimorova i Osječka) kroz dva termina uzorkovanja.



Slika 15 - Prikaz distribucije pozitiviteta SARS-CoV-2 prema lokacija uzorkovanja KOV

Rezultati na slici 15 prikazuju intezitet pozitiviteta svakog uzorka u broju kopija SARS-CoV-2/ μL prema lokacijama i terminu uzorkovanja. Uzorci na lokaciji ginekologija su u oba uzorkovanja bili negativni za razliku od svih ostalih uzoraka. Na lokalitetu Delta je 25.lipnja bila 23333,33 gc/ μL , a 18.kolovoza 7666,67 gc/ μL , što je 33% manje od prvog uzorkovanja. Uzorak na lokalitetu Krešimirova je 25.lipnja bio 83333,33 gc/ μL , dok je uzorak od 18.kolovoza bio negativan. Uzorci sa lokaliteta Kumičićeva su imali razliku od 46%, pa je 25.lipnja gc/ μL za taj uzorak bio 1666,67 gc/ μL , a 18.kolovoza 766,67 gc/ μL . Na lokalitetu Zvonimirova su oba uzorka bila pozitivna, pa je uzorak od 25.lipnja imao 3000,00 gc/ μL , a uzorak od 18.kolovoza 13333,33 gc/ μL , što čini razliku od 44%. Kod uzoraka na lokaciji Osječka došlo je do povećanja od 11 puta, pa je uzorak od 25.lipnja imao 2333,33 gc/ μL , a uzorak od 18.kolovoza 26333,33 gc/ μL .

5. RASPRAVA

Najvažniji ishodi ovog rada su dokazivanje prisutnosti i kvantifikacije SARS-CoV-2 virusa u komunalnim otpadnim vodama grada Rijeke na pet od šest ispitanih lokacija. Same lokacije unutar sustava su odabrane s obzirom na predviđeno opterećenje virusnim genomom s ciljem ispitivanja prisustva i proširenosti samog virusa. Delta kao glavni kolektor otpadnih voda Rijeke i okolice, Krešimirova ulica zbog blizine KBC Rijeka (Klinički bolnički centar), Ginekologija kao uzorak KOV iz COVID odjela koji se u trenutku uzorkovanja nalazio na Klinici za ginekologiju a ostale ulice su uzete s različitih položaja kako bi se ispitale otpadne vode sa šireg područja grada.

Valja napomenuti kako je cilj ovog rada bila uspostava i primjena metoda detekcije i kvantifikacije SARS-CoV-2, virusne RNK iz uzoraka komunalnih otpadnih voda te analiza qRT-PCR metodom, koja je u vrijeme početka ovog projekta bila praktički nepostojeća unutar Republike Hrvatske. Unatoč tome, metoda je uspješno uspostavljena te primijenjena na realnim uzorcima tijekom trajanja epidemije.

U uvjetima uspostave sustava, nerijetko se nailazi na određene prepreke. Tako je, primjerice bilo s lokacijom Ginekologija. Naime, na Ginekologiji je u vrijeme prikupljanja uzoraka postojao COVID odjel te je bilo za očekivati veće koncentracije genskog materijala SARS-CoV-2 virusa. Razlog dijametralno suprotnom rezultatu leži u tome što su svi pacijenti na tom odjelu bili u teškom stanju, stoga su upotrebljavali isključivo katetere i/ili pelene za odrasle, što se zapravo zbrinjava kao medicinski otpad te ne sudjeluje u sustavu komunalnih otpadnih voda. Na Delti koja praktički sabire čitav sustav komunalnih otpadnih voda grada Rijeke i okolice, zabilježena je niža koncentracija SARS-CoV-2 virusa. Uzrok tome bi mogao biti visok priljev oborina uz uobičajen dotok komunalnih otpadnih voda koje su vjerojatno dodatno "razrijedile uzorak". Za razliku od te dvije lokacije, pregledom

rezultata Krešimirove ulice daju se primijetiti znatno više koncentracije genskog materijala SARS-CoV-2 virusa, čemu je potencijalni uzrok neposredna blizina Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko goranske županije, gdje se provodio najveći broj testiranja na SARS-CoV-2 grada Rijeke i okolice tijekom cijelog razdoblja trajanja pandemije. Nižim koncentracijama SARS-CoV-2 virusa na lokaciji Kumičićeva je vjerojatno uzrok lokalno manji broj oboljelih. No, da bi se takve pretpostavke potvrdile potrebno je provesti sveobuhvatnije istraživanje s više termina uzorkovanja i doći do preciznijih podataka o broju oboljelih.

Iako je epidemiologija temeljena na otpadnim vodama jest relativno nov pristup praćenja prevalencije virusa u određenoj populaciji, tj. na određenom području može se dokazati korisnost iste u ranom otkrivanju ili upozoravanju na pojavu raznih zaraznih bolesti. Korištenjem epidemiologije otpadnih voda mogu se dobiti informacije o efikasnosti javnozdravstvenih mjera za vrijeme epidemije i samih javnozdravstvenih sustava (Zavoda za javno zdravstvo i slično).

Novija, srodna istraživanja potvrđuju takve pretpostavke ali istovremeno i ukazuju na brojne druge probleme. Naime, dobiveni rezultati nisu usporedivi između različitih gradova, odnosno nije jasno utvrđena definicija pozitivnog uzorka iz otpadnih voda koji bi trebao biti utemeljen na visokoj graničnoj vrijednosti virusnog opterećenja i uzastopnim danima pozitivnih uzoraka. Strani istraživači (Shah, Kumar, Cianella i sur.) također prepoznaju manjak metodologije u postojećoj literaturi. Točnije, da bi se napravila poveznica između WBE signala te broja oboljelih na nekom području u određenom vremenskom razdoblju, u idealnim bi uvjetima odnos između istih bio utemeljen na tjednom nadzoru otpadnih voda te tjednom broju testiranih PCR brisom nazofarinksa. Prema tome, iako WBE zaobilazi određene faktore poput većeg utroška vremena, rizika izloženosti, troškova i određenih problema klasične epidemiologije (kapaciteta testiranja,

simptomatskih testiranja i kašnjenja u hospitalizaciji) dalo bi se zaključiti kako WBE ne daje jasnu i preciznu procjenu o broju zaraženih u populaciji te se u budućnosti mora raditi na dosljednosti rezultata, razvijanju postupka uzorkovanja te razvijanju standardne metode detekcije i kvantifikacije. (Shah i sur., 2022)

Također, takav način nadzora se pokazao manje uspješnim u slabije razvijenim državama, odnosno područjima s nerazvijenom mrežom za odvodnju otpadnih voda (kanalizacije). Broj kopija genoma virusa po litri otpadnih voda je bio daleko viši u razvijenim zemljama te za interpretaciju rezultata, osim socio-ekonomskih uvjeta treba uzeti u obzir i dinamiku populacije, sanitarne uvjete, zemljopisnu lokaciju kao i klimatske uvjete. (Kumar i sur., 2022)

Nadalje, još uvijek je nejasno kako različite tehnike pred-tretmana mogu utjecati na učinkovitost detekcije PCR metodom. To su koraci u analizi otpadnih voda presudni za daljnji napredak odnosno razvijanje standardnih protokola kvantifikacije SARS-CoV-2. Kontrola kvalitete, testiranje varijabli i optimizacija metodologije zahtijevaju daljnji razvoj, a nužni su za osiguranje analitičke točnosti. (Cianella i sur., 2023)

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu obrađeni su podaci detekcije i kvantifikacije SARS-CoV-2 RNK virusa dobiveni uzorkovanjem otpadnih voda kroz dva dana s pet različitih lokacija. Na osnovu rezultata obrade da se zaključiti sljedeće:

1. Uspostavom metode za detekciju RNK u otpadnim vodama se postavlja dobra osnova za praćenje drugih emergentnih bolesti uzrokovanim virusima koji se izlučuju putem stolice i mokraće u kanalizaciju.
2. Izolacijom virusne RNK iz otpadnih voda se dokazuje da su u kanalizacijskom sustavu prisutni dijelovi genetskog materijala SARS-CoV-2 virusa čime se potvrđuje pretpostavka da zaražene osobe izlučuju virus fekalijama i ostalim ekskretima u kanalizaciju.
3. Dokazivanje prisutnosti virusne RNK ne dokazuje vijabilnost virusa.
4. Ispitivanje prisutnosti virusne RNK u otpadnim vodama može poslužiti za praćenje prevalencije virusa u određenoj populaciji kao i za rano otkrivanje i upozorenje na pojavu zaraznih bolesti.
5. U retrospekciji, praćenje trenda podataka iz otpadnih voda se moglo koristiti za ublažavanje i uvođenje mjera na području sliva otpadnih voda, kao i za dobivanje informacija o efikasnosti javnozdravstvenih mjera za vrijeme epidemije.

7. LITERATURA

- Ahmed, W., Bivins, A., Simpson, S. L., Bertsch, P. M., Ehret, J., Hosegood, I., Metcalfe, S. S., Smith, W. J. M., Thomas, K. V., Tynan, J., & Mueller, J. F. (2022). Wastewater surveillance demonstrates high predictive value for COVID-19 infection on board repatriation flights to Australia. *Environment international*, 158, 106938. (citirano 9.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106938>
- Asokan, G. V., Ramadhan, T., Ahmed, E., & Sanad, H. (2019). WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman medical journal*, 34(3), 184–193. (citirano: 8.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>
- BBC. (2003). *Alert over Hong Kongs super-flu*. BBC arhiva. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/2846243.stm>
- Bivins, A., Greaves, J., Fischer, R., Yinda, K. C., Ahmed, W., Kitajima, M., Munster, V. J., & Bibby, K. (2020). Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. *Environmental Science & Technology Letters*, acs.estlett.0c00730. (citirano: 15.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00730>
- Chan-Yeung, M., & Xu, R. H. (2003). SARS: epidemiology. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 8 Suppl(Suppl 1), S9–S14. (citirano: 8.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x>
- Cianella S., Gonzalez-Fernandez C., Gomez-Pastora J. (2023.) Recent progress on wastewater-based epidemiology for COVID-19 surveillance: A systematic review of analytical procedures and epidemiological modeling, *Science of The Total*

Environment, 878, 162953. (citirano: 19.6.2023.) Dostupno na:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162953>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). *SARS-COV-2 variants of concern as of -given date*. Službena web stranica ECDC-a. (citirano: 10.4.2023.) Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
- Jim Yardley. (2005). *After its aepidemic arrival, SARS vanishes*. Arhiva The New York Times-a. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na:
<https://www.nytimes.com/2005/05/15/health/after-its-epidemic-arrival-sars-vanishes.html>
- Kang M, Hua Z, Pan Y i sur. (2021). Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. *Water Research*, Volume 191, Article 116787. (citirano: 20.4.2023.)
- Kineska vlada i zakon (2003) *Kronike SARS epidemije*, 36. (citirano: 9.4.2023.)
- Kumar M., Jiang G., Thakur A., Chatterjee S., Bhattacharya T., Mohapatra S., Chaminda T., Tyagi V., Vithanage M., Bhattacharya P., Nghiem L., Sarkar D., Sonne C., Mahlknecht Jr. (2022). Lead time of early warning by wastewater surveillance for COVID-19: Geographical variations and impacting factors, *Chemical Engineering Journal*, 441, 135936. (citirano: 19.6.2023.) Dostupno na:
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135936>
- Leung, G. M., Hedley, A. J., Ho, L. M., Chau, P., Wong, I. O., Thach, T. Q., Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Fraser, C., Riley, S., Ferguson, N. M., Anderson, R. M., Tsang, T., Leung, P. Y., Wong, V., Chan, J. C., Tsui, E., Lo, S. V., & Lam, T. H. (2004). The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients. *Annals of internal medicine*, 141(9), 662–673. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-141-9-200411020-00006>

- Mao, K., Zhang, H., Pan, Y., & Yang, Z. (2021). Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. *Water research*, 191, 116787. (citirano: 20.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116787>
- Maryam, S., Ul Haq, I., Yahya, G., Ul Haq, M., Algammal, A. M., Saber, S., & Cavalu, S. (2023). COVID-19 surveillance in wastewater: An epidemiological tool for the monitoring of SARS-CoV-2. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 978643. (citirano: 24.4.2024.) Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.978643>
- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K., Yuen, K. Y., & SARS study group (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet (London, England)*, 361(9366), 1319–1325. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13077-2)
- Phil M. Choi, Ben J. Tschärke, Erica Donner, Jake W. O'Brien, Sharon C. Grant, Sarit L. Kaserzon, Rachel Mackie, Elissa O'Malley, Nicholas D. Crosbie, Kevin V. Thomas, Jochen F. Mueller, (2018). Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 453-469, 105. (citirano: 20.4.2023.)
- Povrenović D., Knežević M. (2013). Osnove tehnologije pročišćavanja otpadnih voda. Diplomski rad, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd. (citirano: 20.4.2023.)
- Sachs, J. D., Karim, S. S. A., Akinin, L., Allen, J., Brosbøl, K., Colombo, F., Barron, G. C., Espinosa, M. F., Gaspar, V., Gaviria, A., Haines, A., Hotez, P. J., Koundouri, P., Bascuñán, F. L., Lee, J. K., Pate, M. A., Ramos, G., Reddy, K. S., Serageldin, I., Thwaites, J., ... Michie, S. (2022). The Lancet Commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic. *Lancet (London, England)*, 400(10359), 1224–1280. (citirano: 11.4.2023.) Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01585-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01585-9)

- Shah S., Gwee S., Ng J., Lau N., Koh J., Pang J. (2022). Wastewater surveillance to infer COVID-19 transmission: A systematic review, *Science of The Total Environment* 804, 1500060. (citirano: 19.6.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150060>
- Skowronski, D. M., Astell, C., Brunham, R. C., Low, D. E., Petric, M., Roper, R. L., Talbot, P. J., Tam, T., & Babiuk, L. (2005). Severe acute respiratory syndrome (SARS): a year in review. *Annual review of medicine*, 56, 357–381. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.091103.134135>
- The New York Times. (2009). *China raises tally of cases and deaths in mystery illness*. Arhiva New York Times-a. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na: <https://www.nytimes.com/2003/03/27/world/china-raises-tally-of-cases-and-deaths-in-mystery-illness.html>
- Vasireddy, D., Vanaparthi, R., Mohan, G., Malayala, S. V., & Atluri, P. (2021). Review of COVID-19 Variants and COVID-19 Vaccine Efficacy: What the Clinician Should Know?. *Journal of clinical medicine research*, 13(6), 317–325. (citirano: 10.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.14740/jocmr4518>
- Whitaker, M., Elliott, J., Chadeau-Hyam, M., Riley, S., Darzi, A., Cooke, G., Ward, H., & Elliott, P. (2022). Persistent COVID-19 symptoms in a community study of 606,434 people in England. *Nature communications*, 13(1), 1957. (citirano: 10.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29521-z>
- WHO. (2018). *WHO remembers Dr Carlo Urbani as a hero who fought SARS*. Arhiva WHO-a. (citirano: 9.4.2023.) Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/28-03-2018-who-remembers-dr-carlo-urbani-as-a-hero-who-fought-sars>
- WHO. (2020). *Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-*

nCoV). Arhiva WHO-a. (citirano: 10.4.2023.) Dostupno na:

[https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))

- Yang, S., Dong, Q., Li, S., Cheng, Z., Kang, X., Ren, D., Xu, C., Zhou, X., Liang, P., Sun, L., Zhao, J., Jiao, Y., Han, T., Liu, Y., Qian, Y., Liu, Y., Huang, X., & Qu, J. (2022). Persistence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater after the end of the COVID-19 epidemics. *Journal of hazardous materials*, 429, 128358. (citirano: 11.4.2023.) Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128358>

ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

- Ime i prezime: Bruno Vučković
- Spol: M
- Datum rođenja: 14.02.1997. (Metković)
- Adresa: Mlinska 59, 20350 Metković
- Državljanstvo: Hrvat

Obrazovanje

- Srednja Škola Metković – smjer ekonomist (2012.-2016.)
- Zdravstveno Veleučilište u Zagrebu – Preddiplomski stručni studij Sanitarno inženjerstvo (2016.-2019.)
- Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci – Diplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo (2020.-2023.)

Studentske aktivnosti

- Pasivni sudionik - 2. međunarodni Kongres o sigurnosti u kvalitete hrane – Životni ciklus hrane (Opatija, 2018.)
- Aktivni sudionik – 1. međunarodna studentska GREEN konferencija u organizaciji Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera (Osijek, 2019.)
- Voditelj – Studentski projekt EKO ZVU grupe – „Istraživanje komaraca i krpelja na području Sljemena“ pod mentorstvom mr.sc. biologije Ane Klobučar (Zagreb, 2019.)
- Voditelj – Studentski projekt EKO ZVU grupe – „Upoznavanje s močvarnim područjima RH – Park prirode Lonjsko polje“
- Član studentskog zbora – Zdravstveno veleučilište u Zagrebu (Zagreb, 2017.-2019.)
- Studentski pravobranitelj – Zdravstveno veleučilište u Zagrebu (Zagreb, 2017.-2019.)
- Voditelj – EKO ZVU grupa Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu (Zagreb, 2017.-2019.)
- Radnik preko student servisa – Epidemiologija NZZJZPGZ (Rijeka, 2021.-2023.)
- Radnik preko student servisa – Mikrobiologija NZZJZPGZ (Rijeka, 2022.-2023.)

PRILOZI

Popis tablica

1. Tablica: Prikaz protokola za qPCR uređaj

Popis slika

1. Slika: Shematski prikaz predviđanja aktivnih slučajeva COVID19 putem analize otpadnih voda.
(Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666765722001612>)
2. Slika: Usporedba "golih" virusa i onih s ovojnicom.
(Izvor: <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/virus-structure/general-structural-characteristics-nucleic-acid-and-protein-enveloped-and-nonenveloped>)
3. Slika: COVID-19 specifičnost simptoma ovisno o varijanti. (Izvor: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-34244-2>)
4. Slika: Prikaz lokacija uzorkovanja (Izvor: <https://www.google.hr/maps>)
5. Slika: Lokacija A (uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Rijeke)
6. Slika: Zapisnik o provedenom uzorkovanju
7. Slika: Vakuumpumpa s mini kolonom
8. Slika: Otopine za uklanjanje inhibitora i ispiranje RNK
9. Slika: Protokol za RT-PCR Sars-CoV-2 iz otpadnih voda
10. Slika: Postupak pripremanja razrijeđenja za RT-PCR
11. Slika: Postavljanje pločice u qPCR uređaj
12. Slika: Prikaz sučelja programa QuantStudio™ Design and Analysis nakon završene RT-qPCR reakcije

13. Slika: Grafički prikaz rezultata qPCR-a za N1 gen

14. Slika: Standardna krivulja za N1 gen

15. Slika: Prikaz distribucije pozitiviteta SARS-CoV-2 prema lokacija uzorkovanja KOV