

MERJENJE SARS-CoV-2 V ODPADNIH VODAH

Mojca Milavec

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Nacionalni inštitut za biologijo

mojca.milavec@nib.si

Svetovni dan meroslovja – Merjenje za zdravje

20.5.2021



NACIONALNI INŠTITUT ZA **BIOLOGIJO**
NATIONAL INSTITUTE OF **BIOLOGY**

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, NIB

- Raziskave interakcij rastlin in povzročiteljev bolezni pri rastlinah → sistemsko biologijo ('omski' pristopi), od 2019 partner v dveh Evropskih referenčnih laboratorijih za zdravje rastlin; povzročitelji bolezni pri ljudeh, podpora pri razvoju genske terapije
- Področje molekularne biologije na Oddelku vzpostavljeno pred 20 leti
- Razvoj in optimizacija metod za analizo nukleinskih kislin - kvalitativne in kvantitativne analize nukleinskih kislin (verižna reakcija s polimerazo (**PCR**), sekvenciranje)
- Ekstrakcija nukleinskih kislin iz različnih vzorcev (rastline, voda, hrana, mikroorganizmi...)
- Znanje in izkušnje iz raziskav smo prenesli v aplikacije – določanje povzročiteljev bolezni pri rastlinah in določanje gensko spremenjenih organizmov (**ISO 17025**)



Od 2009 smo nosilec nacionalnega etalona: Množina snovi/Bioanaliza nukleinskih kislin

Meroslovje v biologiji

2000: V skladu z resolucijo Generalne konference za uteži in mere je bila ustanovljena Delovna skupina za biometrologijo

2001: Skupina se je preimenovala v Delovno skupino za **bio**analize in se pri Mednarodnem odboru za uteži in mere umestila pod Svetovalni odbor za množino snovi (meroslovje v kemiji) (CCQM)

2014: Delovna skupina za bioanalize se je razdelila na tri skupine (nukleinske kisline, proteini, celice), Svetovalni odbor za množino snovi se je preimenoval v Svetovalni odbor za množino snovi: Meroslovje v kemiji in **biologiji**

NIB v Delovni skupini za bioanalize (BAWG)/Delovni skupini za analize nuklinskih kislin (NAWG) sodeluje od leta 2009.

Mednarodno priznane merilne zmogljivosti

3 CMC-ji na področju določanja gensko spremenjenih organizmov

Matrix or material	Analyte or component	Dissemination range of measurement capability		Range of certified values in reference materials	
		DNA copy number ratio in %	Absolute expanded uncertainty in %	DNA copy number ratio in	Absolute expanded uncertainty in
raw (or not highly processed) maize seed material and grains	MON810/hmg	0.5 to 2.1	0.2 to 0.5		

Mechanism for measurement service delivery : Value assignment to customer supplied samples

Approved on 13 June 2013

Institute service identifier : FITO001

Referenčna metoda v bazi Skupnega odbora za sledljivost v laboratorijski medicini (JCTLM)

JCTLM database : Laboratory medicine and *in vitro* diagnostics



List of reference measurement methods/procedures for Nucleic acids

PDF description of measurement method/procedure contains limited information on methods/procedures. More complete information can be retrieved from the keyword search results for the reference measurement methods/procedures.

Analyte	Reference measurement method/procedure	Applicable matrice(s)	Measurement principle/technique	Reference(s)
Human cytomegalovirus (HCMV) DNA sequence	NIB reference method for Human cytomegalovirus quantification by dPCR	Purified gDNA in solution Water, buffer	Digital PCR	Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction, Pavsic J. et al., Anal Bioanal Chem. 2016, 408 , 67-75 Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification, Pavsic J. et al., Anal Bioanal Chem. 2016, 408 , 107-121 Inter-laboratory assessment of different digital PCR platforms for quantification of human cytomegalovirus DNA, Pavsic J. et al., Anal Bioanal Chem. 2017, 409 , 2601-2614 See Anal Bioanal Chem. 2017, 409 , 2601 for comparability assessment study
KRAS DNA wild type sequence and gene mutation	LGC reference method for KRAS G12D/WT in solution by digital PCR	water, buffer, carrier DNA	Digital PCR	Assessment of digital PCR as a primary reference measurement procedure to support advances in precision medicine, Whale et al., Clinical Chemistry , 2018, 64 (9), 1296-1307 See reference cited for comparability assessment study



The performance of human cytomegalovirus digital PCR Reference Measurement Procedure in seven External Quality Assessment schemes over four years

Mojca Milavec^a, Jernej Pavšič^a, Alexandra Bogožalec Košir^a, Gerwyn M. Jones^b, Denise M. O'Sullivan^b, Alison S. Devonshire^b, Fran Van Heuverswyn^{d,i}, Maria Karczmarczyk^{d,j}, Jannika Neeb^{e,k}, Annabell Plauth^e, Philippe Corbisier^d, Heinz Schimmel^d, Andreas Kummrow^e, Jörg Neukammer^{e,l}, Carole A. Foy^b, Martin Kammel^{f,g}, Hans-Peter Grunert^h, Heinz Zeichhardt^{f,g,h}, Jim F. Huggett^{b,c}

^a Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

^b National Measurement Laboratory (NML), LGC, Queens Road, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, United Kingdom

^c School of Biosciences & Medicine, Faculty of Health & Medical Science, University of Surrey, Guildford, United Kingdom

^d European Commission, Joint Research Centre (JRC), Geel, Belgium

^e Physikalisch Technische Bundesanstalt, Abbestr. 2-12, D-10587 Berlin, Germany

^f INSTAND, Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V., Ueberstr.20, D-40223 Düsseldorf, Germany

^g IQVD GmbH, Institut fuer Qualitätssicherung in der Virusdiagnostik, Potsdamer Chaussee 80, D-14129 Berlin, Germany

^h GBD Gesellschaft fuer Biotechnologische Diagnostik mbH, Berlin, Potsdamer Chaussee 80, D-14129 Berlin, Germany

ⁱ Flanders Vaccine, vzw, Agoralaan building A bis, B-3590 Diepenbeek, Belgium

^j Eurofins Food Testing UK Limited, i54 Business Park, Valiant Way, WV9 5GB, Wolverhampton, United Kingdom

^k Technische Universität Berlin, Faculty III Process Sciences, Institute of Biotechnology, Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin, Germany

^l Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute of Transfusion Medicine, 10117 Berlin, Germany



June
2017



IN STAND

Report on
External Quality Assessment Scheme
Group No. 365
Virus Genome Detection -
Cytomegalovirus

Prof. Dr. Heinz Zeichhardt

Dr. Martin Kammel

Issued by:
IN STAND
Gesellschaft zur Förderung
der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e.V.

Düsseldorf/Berlin, Germany, 05.09.2017

Virusni povzročitelji bolezni v odpadnih vodah

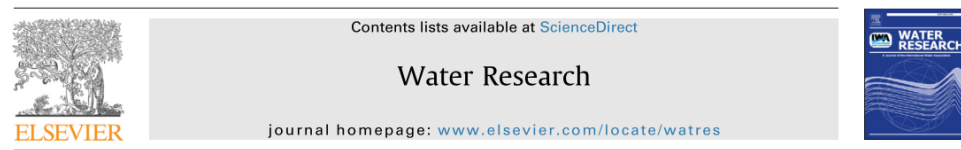
Rotavirusi, norovirusi, hepatitis A virus, enterovirusi, koronavirusi

Food Environ Virol
DOI 10.1007/s12560-015-9183-7

ORIGINAL PAPER

The Detection Rate of Enteric Viruses and *Clostridium difficile* in a Waste Water Treatment Plant Effluent

Andrej Steyer · Ion Gutiérrez-Aguirre · Nejc Rački · Sara Beigot Glaser ·
Barbara Brajer Humar · Marjeta Stražar · Igor Škrjanc · Mateja Poljšak-Prijatelj ·
Maja Ravnika · Maja Rupnik



Enhanced detection of pathogenic enteric viruses in coastal marine environment by concentration using methacrylate monolithic chromatographic supports paired with quantitative PCR

Mukundh N. Balasubramanian ^{a,*}, Nejc Rački ^b, José Gonçalves ^c, Katarina Kovač ^a,
Magda T. Žnidarič ^b, Valentina Turk ^c, Maja Ravnika ^b, Ion Gutiérrez-Aguirre ^b

^a BioSistemika LLC, Koprška 98, SI-1000, Ljubljana, Slovenia

^b Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of Biology, Večna Pot 111, SI-1000, Ljubljana, Slovenia

^c Marine Biology Station, National Institute of Biology, Fornace 41, SI-6330, Piran, Slovenia



Short communication

A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water

Katarina Kovač ^{a,*}, Ion Gutiérrez-Aguirre ^b, Marko Banjac ^c, Matjaž Peterka ^c, Mateja Poljšak-Prijatelj ^d,
Maja Ravnika ^b, Janet Zimšek Mijovski ^d, Anna Charlotte Schultz ^e, Peter Raspor ^{a,*}



On-site reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction detection of rotaviruses concentrated from environmental water samples using methacrylate monolithic supports

Ion Gutiérrez-Aguirre ^{a,*}, Andrej Steyer ^c, Marko Banjac ^b, Petra Kramberger ^b,
Mateja Poljšak-Prijatelj ^c, Maja Ravnika ^a



NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY

SARS-CoV-2 v odpadni vodi

V blatu okuženih oseb se pojavlja zgodaj po okužbi, lahko pred pojavom simptomov

Širjenje z odpadno vodo ne predstavlja pomembnega načina prenosa, virus zaznan večinoma v vtoku v čistilne naprave, ne pa tudi v iztoku

Koncentracije virusa v odpadni vodi korelirajo s prisotnostjo virusa v človeški populaciji (namesto pri posamezniku, zaznavamo virus v populaciji – komplementarna metoda)

SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics

Jordan Peccia, Alessandro Zulli, Doug E. Brackney, Nathan D. Grubaugh, Edward H. Kaplan, Arnau Casanovas-Massana, Albert I. Ko, Aryn A. Malik, Dennis Wang, Mike Wang, Daniel M. Weinberger, Saad B. Omer

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?]. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should not be used to guide clinical practice.

SHARE



Tests at wastewater treatment plants in France have revealed levels of coronavirus that rise and fall over time like clinical cases. FREDERICK FLORIN/AFP VIA GETTY IMAGES

Coronavirus found in Paris sewage points to early warning system

By Christa Lesté-Lasserre | Apr. 21, 2020, 2:10 PM

medRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR HEALTH SCIENCES



BMJ Yale

HOME |

Search

[Comment on this paper](#)

Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage

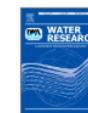
Gertjan Medema, Leo Heijnen, Goffe Elsing, Ronald Italiaander, Anke Brouwer

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?]. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should not be used to guide clinical practice.



Water Research
Volume 181, 15 August 2020, 115942



SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area

Walter Randazzo^{a, b}, Pilar Truchado^c, Enric Cuevas-Ferrando^b, Pedro Simón^d, Ana Allende^c, Gloria Sánchez^b

Science of the Total Environment 728 (2020) 138764



Contents lists available at ScienceDirect
Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



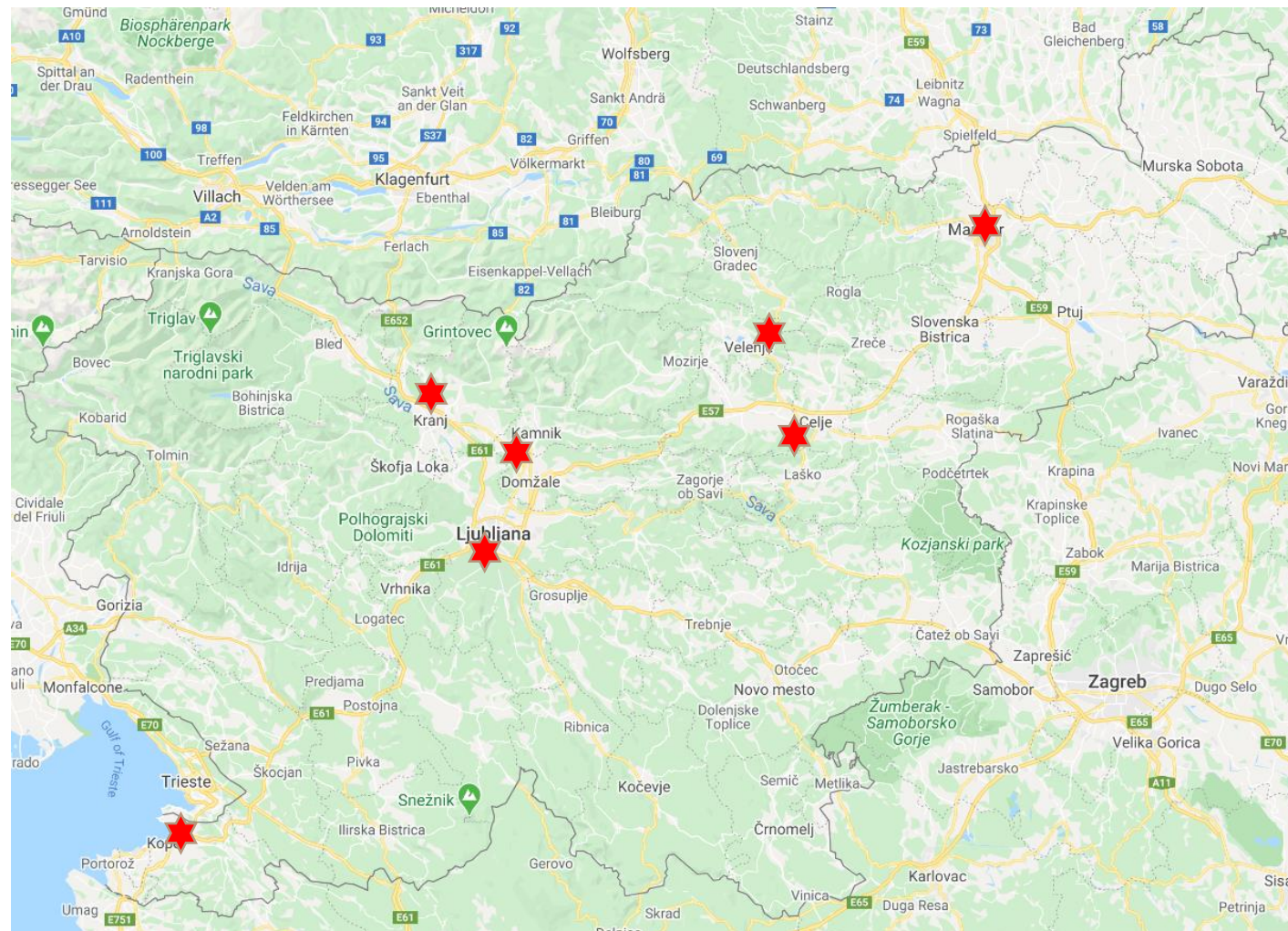
First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community

Warish Ahmed^{a, *}, Nicola Angel^b, Janette Edson^b, Kyle Bibby^c, Aaron Bivins^c, Jake W. O'Brien^d, Phil M. Choi^d, Masaaki Kitajima^e, Stuart L. Simpson^f, Jiaying Li^g, Ben Tschärke^h, Rory Verhagen^d, Wendy J.M. Smith^g, Julian Zaugg^b, Leanne Dierens^b, Philip Hugenoltz^b, Kevin V. Thomas^d, Jochen F. Mueller^d

Kako poteka analiza prisotnosti virusa?

Vzorčenje vode v čistilnih napravah 1-3 krat tedensko (Kranj, Ljubljana, Domžale-Kamnik, Šostanj, Celje, Maribor, Koper)

100 ml vtoka (24 urni kompozitni vzorec)



Kako poteka analiza prisotnosti virusa?

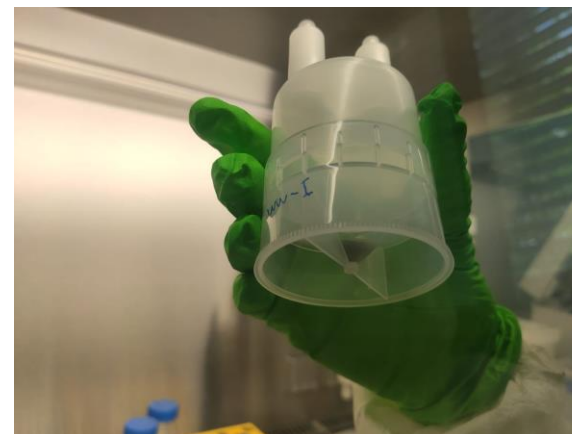
Koncentriranje vzorca poteka v laboratoriju za delo v 2. varnostnem razredu (biološka varnost)



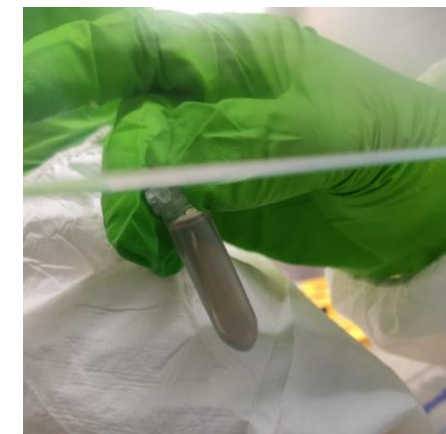
Centrifugiranje 50 mL
vzorca 30 minut



Prenos vzorca v Centrikon in
centrifugiranje 30 minut



Prenos vzorca iz Centrikona v epruveto (2 mL) s
kratkim centrifugiranjem (2 minuti)



Primerjali smo več načinov koncentriranja (tudi zaradi težav z dobavo materiala)

Kako poteka analiza prisotnosti virusa?

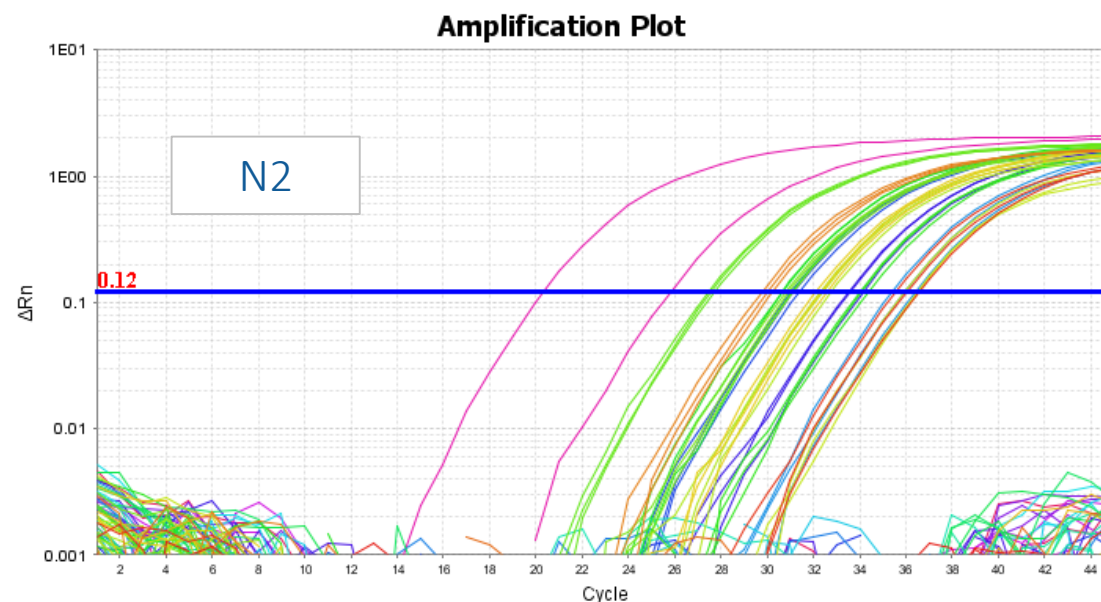
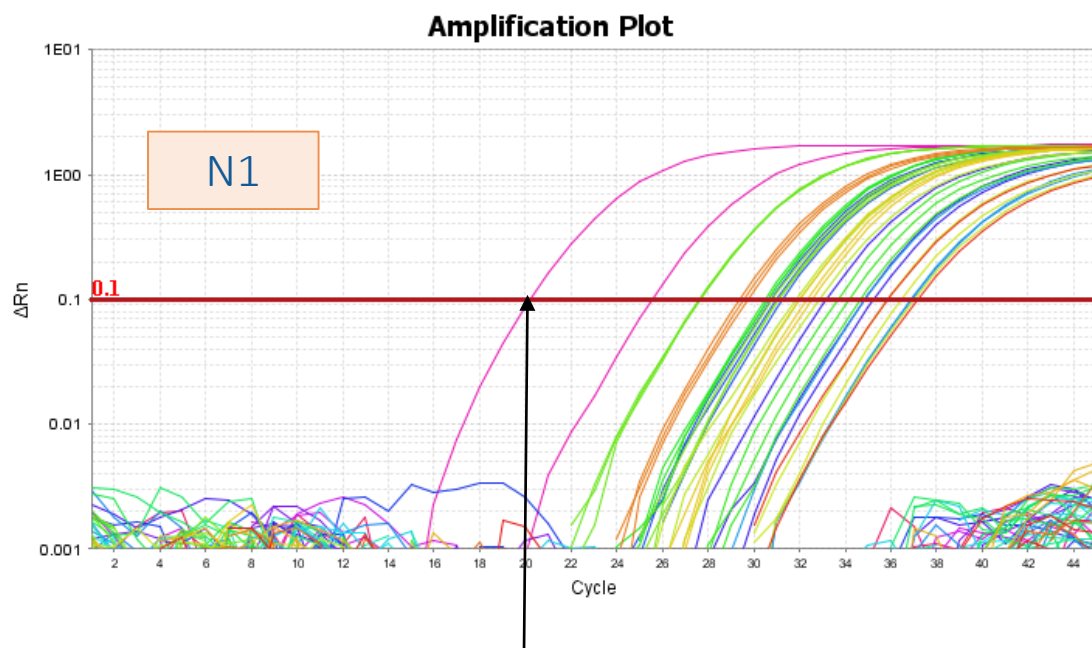
Ekstrakcija nukleinske kisline SARS-CoV-2 (RNA) iz koncentriranega vzorca s kompletom kemikalij



Dobimo 40 μ L vzorčka z ekstrahirano RNA

Kako poteka analiza prisotnosti virusa?

Določanje prisotnosti za SARS-CoV-2 z **RT-qPCR** na podlagi določanja prisotnosti za virus značilnih zaporedij nukleinske kisline (RNA); določamo prisotnost dveh tarčnih zaporedij gena N (test N1 in N2, oba CDC)



Cq vrednosti – točka, v kateri signal preseže prag

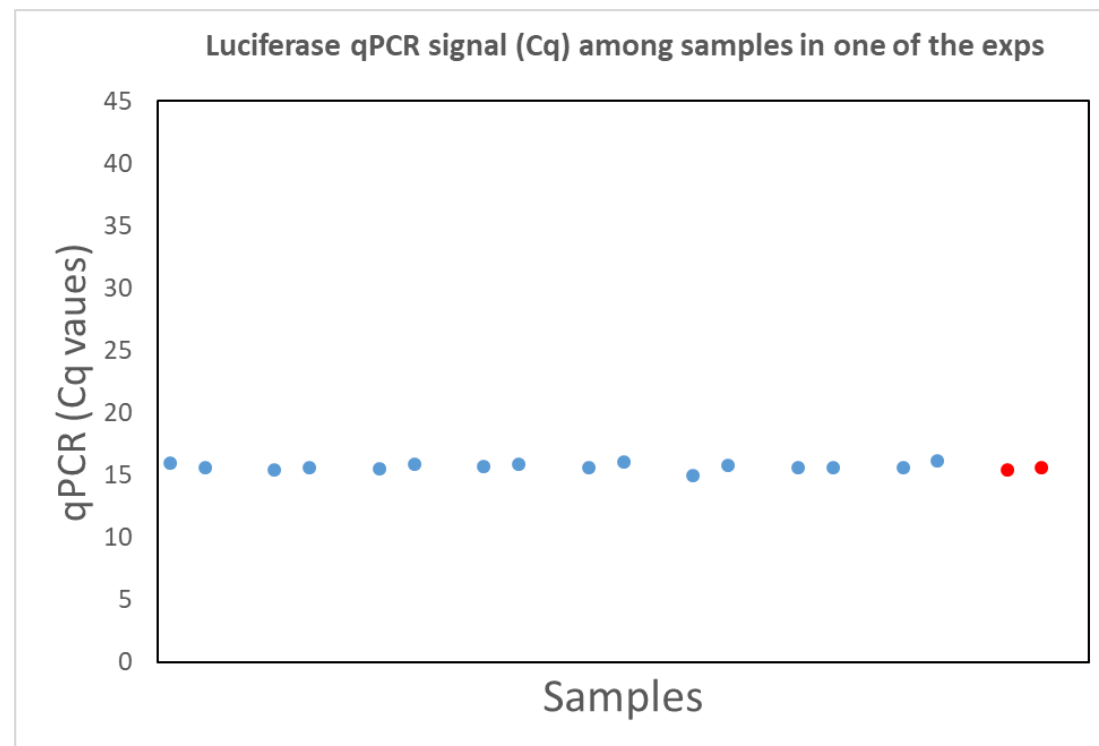
Kakšni so izzivi pri detekciji SARS-CoV-2 v odpadnih vodah?

Hitro spreminjajoč se matriks, lahko vsebuje snovi, ki vplivajo na analizo – inhibicija encima za PCR

To kontroliramo z dodajanjem zunanje kontrole (RNA za luciferazo) v vsak vzorec in v negativno kontrolo ekstrakcije (pufer). Vsak vzorec analiziramo neredčen in 10x redčen.

Vpliva na analizo ni:

- (1) če je Cq vrednost za zunanjo kontrolo v neredčenem vzorcu (**modro**) primerljiva s Cq vrednostjo v pufru (**rdeče**) in
- (2) če sta Cq vrednosti v neredčenem in 10x redčenem vzorcu v ustreznem razmerju.



Kakšni so izzivi pri detekciji SARS-CoV-2 v odpadnih vodah?

Vpliv padavin – redčenje odpadnih vod (redčenje vzorcev)

Uspešnost koncentriranja vzorca

Kakšni so izzivi pri detekciji SARS-CoV-2 v odpadnih vodah?

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2009, p. 7261–7267
0099-2240/09/\$12.00 doi:10.1128/AEM.00410-09
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

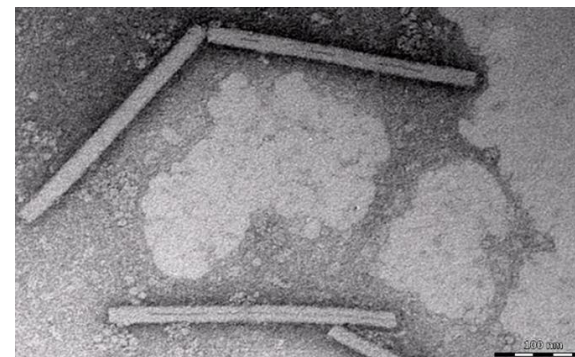
Vol. 75, No. 22

Pepper Mild Mottle Virus as an Indicator of Fecal Pollution[▽]

Karyna Rosario,¹§ Erin M. Symonds,¹§ Christopher Sinigalliano,² Jill Stewart,^{3,4} and Mya Breitbart^{1*}

College of Marine Science, University of South Florida, St. Petersburg,¹ and NOAA Atlantic Oceanographic and Meteorological Laboratory, Miami,² Florida; NOAA National Ocean Service, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, Charleston, South Carolina³; and Department of Environmental Sciences and Engineering, Gillings School of Global Public Health, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina⁴

Received 18 February 2009/Accepted 31 August 2009



Virus blage lisavosti paprike (PMMoV) je povzročitelj bolezni pri rastlinah iz rodu *Capsicum*. Ker je zelo stabilen, je v odpadnih vodah prisoten v velikih količinah.

Za PMMoV značilno zaporedje določamo v vzorcu pred in po koncentriranju. Iz C_q vrednosti pred koncentriranjem določamo morebiten vpliv padavin (glede na pričakovano C_q vrednost). Iz razlike med C_q vrednostmi pred in po koncentriranju ovrednotimo uspešnost koncentracije. Izmerjeno koncentracijo PMMoV uporabimo za normalizacijo vrednosti SARS-CoV-2.

Zagotavljanje zanesljivosti in primerljivosti rezultatov

- (1) Ustrezne kontrole in normalizacija
- (2) Ustrezna izbira kontrolnih/referenčnih materialov (RNA, cel virus)

SARS-CoV-2 RNA ekstrahirana iz vzorcev slovenskih pacientov



Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta

INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO

Sintetično pripravljene RNA kontrole Skupno raziskovalno središče Evropske komisije in NIST (ZDA)



Termično inaktivirani virusi

INSTAND-EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEMES
MANUAL
Version 08.04.2020



INSTAND

**Extra INSTAND EQAS –
Virus Genome Detection (340)
Coronavirus SARS-CoV-2**

performed in cooperation with
National Consultant Laboratory for Coronaviruses,
Institute of Virology, Charité – University Medicine Berlin,
Campus Charité Mitte, Prof. Dr. Christian Drosten,
Dr. Victor M. Corman, Dr. Daniela Niemeyer

Please note: The document
"Declaration Referring to Material Safety Data Sheet of the Manufacturer of the Samples for
INSTAND External Quality Assessment (EQAS) Schemes for Virus Diagnostics April 2020"
is available for download in the INSTAND EQAS Online system
(<https://ny-online.instandev.de/index.shtml?lang=en>) under the menu "safety information".
Please select the EQAS group 340.

Instructions for Test Performance
April 2020

INSTAND reg.ass., Society for Research Promotion of Quality Assurance in Medical Laboratories reg.ass.
www.instand-ev.de
in collaboration with
Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV)
Gesellschaft für Virologie e.V. (GVV)
Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM)

EQAS Adviser:
Prof. I.R. Dr. Heinz Zeichhardt
Professor of Virology
Charité – University Medicine Berlin

Assistant EQAS Adviser:
Dr. Martin Kammel
co INSTAND e.V.
Überstr. 20, D-40223 Düsseldorf, Germany
Tel.: +49-(0)30-81054-304; Fax: +49-(0)30-81054-303
Email: M.Kammel@qvvd.de

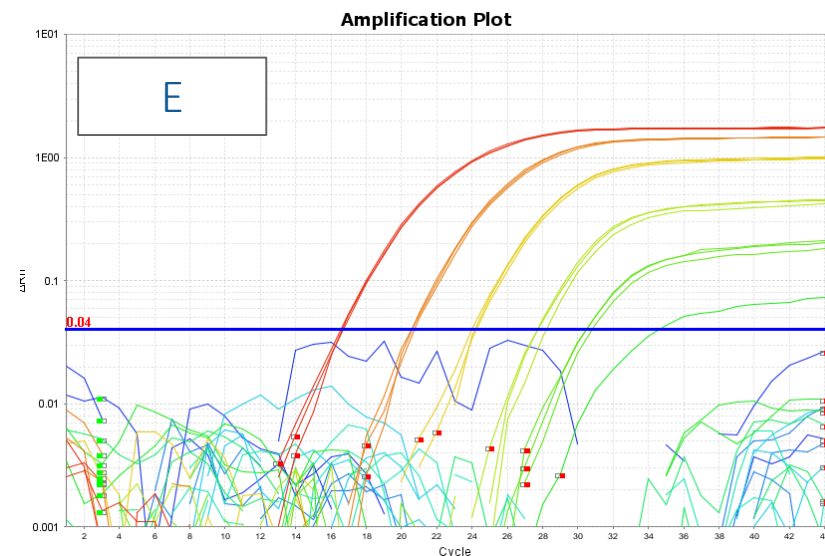
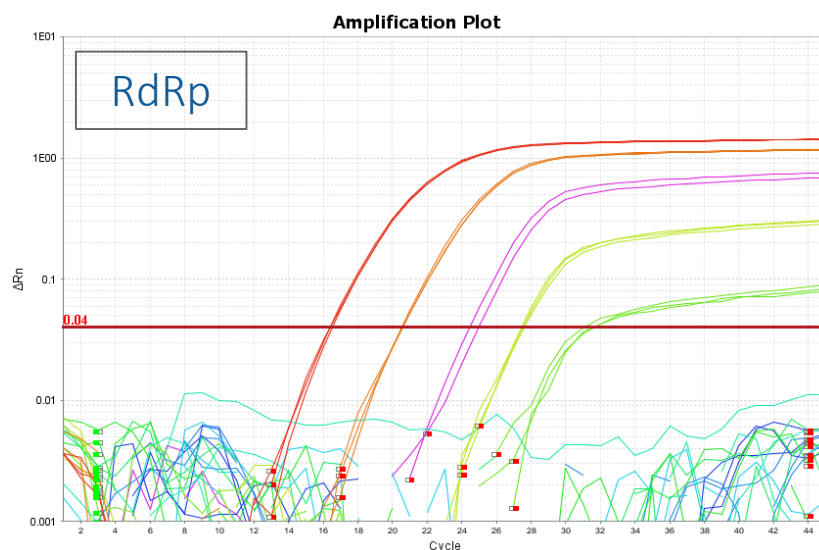
Correspondence address:
Prof. Dr. Heinz Zeichhardt
IQVQ GmbH
Institut für Qualitätssicherung
in der Virusdiagnostik
Potsdamer Chaussee 80, D-14129 Berlin, Germany
Tel.: +49-(0)30-81054-300; Fax: +49-(0)30-81054-303
Email: Heinz.Zeichhardt@qvvd.de

Manual EQAS Virology April 2020 EN 20200408.doc

Zagotavljanje zanesljivosti rezultatov

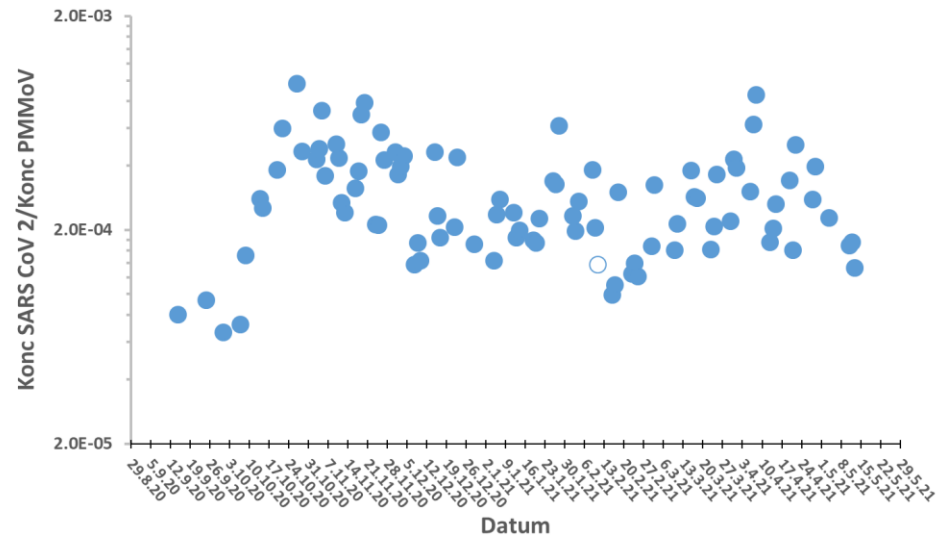
(3) Spremljanje pojavljanja mutacij (sprememb zaporedja nukleinske kisline) pri virusu

Možno tudi določanje prisotnosti drugih tarčnih zaporedij, npr. genov RdRP in E (oba Corman s sod., 2020)

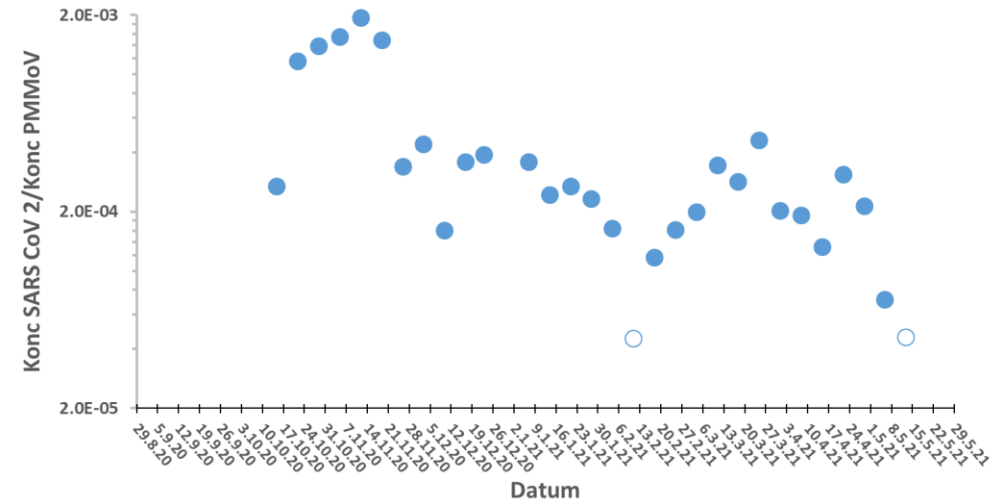


Rezultati

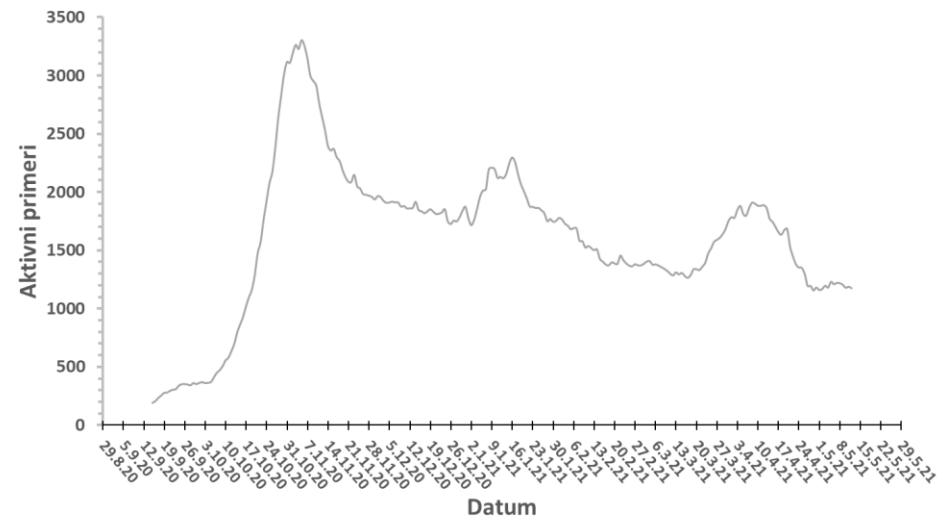
Ljubljana (normalizirana SARS CoV 2 RNA koncentracija v odpadni vodi)



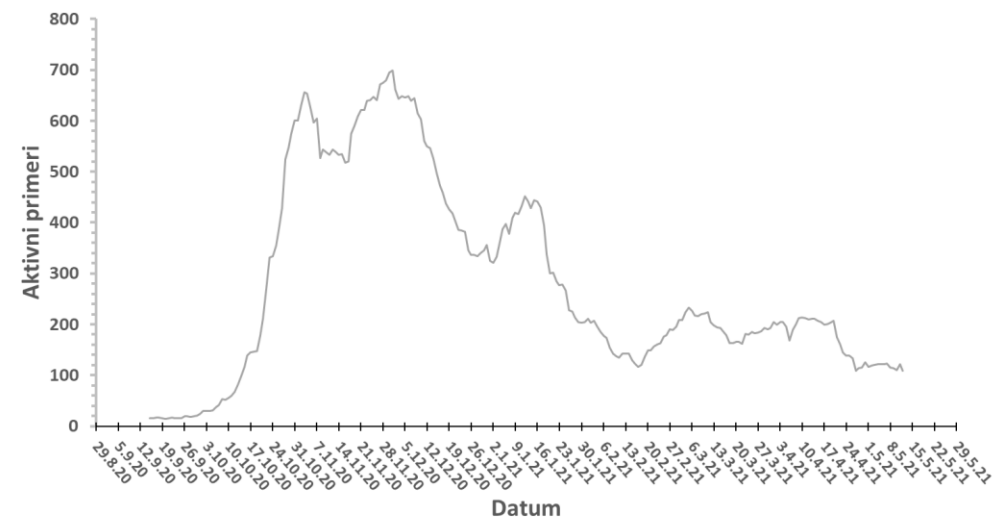
Velenje (normalizirana SARS CoV 2 RNA koncentracija v odpadni vodi)



Ljubljana (Aktivni primeri)



Velenje (Aktivni primeri)



Pilotni monitoring

Z vzpostavljanjem metode za analizo odpadnih vod smo začeli pred razglasitvijo epidemije.

Prve vzorce iz čistilnih naprav smo testno analizirali aprila 2020. Prisotnost SARS-CoV-2 smo zaznali izjemoma.

V septembru smo pričeli s pilotnim monitoringom na sedmih čistilnih napravah in pokazali, da je bil trend naraščanja SARS-CoV-2 v populaciji viden že v začetku oktobra.

Metodo je možno uporabiti za spremljanje poteka epidemije, učinkovitosti ukrepov in analizo prisotnosti SARS-CoV-2 v posameznih objektih kot so domovi za starejše, bolnice, šole in podjetja.

Rezultate redno posredujemo Strokovni skupini za zaježitev in obvladovanje epidemije COVID-19 in COVID-19 SLEDILNIKU.

Virus v odpadnih vodah

[Deli graf na](#)

Obdobje

2m

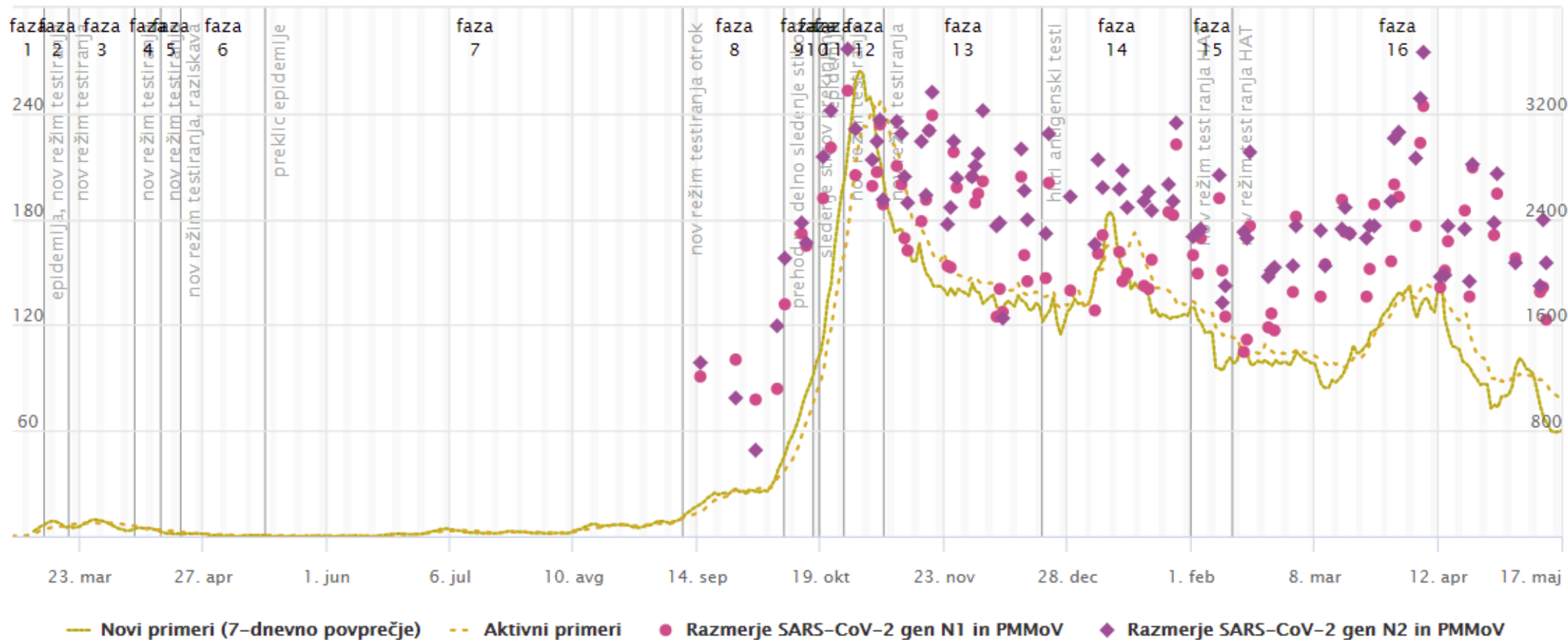
4m

Vse

04. 03. 2020

-

17. 05. 2021



vir podatkov: Nacionalni inštitut za biologijo, NIJZ

ČN Celje

ČN Domžale - Kamnik

ČN Koper

ČN Kranj

OČN Ljubljana

ČN Maribor

OČN Šaleške doline

Aktivni in potrjeni primeri vključujejo podatke iz naslednjih občin, ki uporabljajo to čistilno napravo (ČN):

- Ljubljana

Zahvala

Olivera Maksimovic Carvalho Ferreira

Živa Lengar

Irena Bajde

Zala Kogej

Katarina Bačnik

David Stanković

Nataša Mehle

Denis Kutnjak

Maja Ravnikar

Anže Županič

Ion Gutierrez Aguirre

Čistilne naprave Domžale-Kamnik, Ljubljana, Šostanj, Celje, Maribor, Koper, Kranj

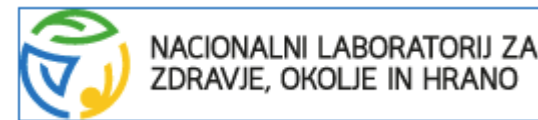
DSO Medvode

OŠ Dragomelj

ARRS Program-P4-0407: Okoljska in aplikativna virologija: virusi, prijatelji in sovražniki



Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta
INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO



NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY