



Euroopa Liit
Euroopa
Regionaalarengu Fond



Eesti
tuleviku heaks

Teadmispõhise poliitikakujundamise toetamine: RITA tegevus 2

Covid-19 leviku hindamine piirkonna elanike seas reoveepuhastist võetud reovee proovide alusel

Study on the Covid-19 prevalence based on waste water analysis

Alguskuupäev

1.04.2020

Lõppkuupäev

15.12.2020

Raporti autorid: Tanel Tenson, Veljo Kisand, Helen Tammert, Kristel Panksep

SISUKORD

Sissejuhatus	3
1. Metoodika valik	4
2. Kogutud proovide ülevaade	6
3. Reovee proovide sisuline analüüs ja järeldused	8
Kokkuvõte	11
Viited	12
LISA 1. SARS-CoV-2 arvukuse määramise protokoll	13

Sissejuhatus

Mitmed inimese kehasse sisenevad ained ning haigustekitajad (või nendest pärinev bioloogiline materjal) väljuvad lõpuks väljaheidete kaudu ja satuvad reovette. Reoveest saame jälgida näiteks narkootikumide kasutamist. Samuti saame seirata nakkushaiguste levikut. Juba mõnda aega on seiratud üle maailma polioviirust. Reovee analüüside põhjal võime jälgida ka antibiootikumiresistentsuse levikut. Kohe pärast koroonaviiruse laiemat levikut algust püüti maailmas viirust tuvastada ka reoveest. Esimesed analüüsid näitasid, et viirus on reovees leitav mitu nädalat enne seda kui meditsiinisüsteem nakatunuid tuvastab [1].

Aprillis alustasime SARS-CoV-2 määramise meetodika sobivuse uuringut Eesti tingimustes. Kuna SARS-CoV-2 nakkuse peamine kolle oli sellel ajal Saaremaal, siis suunasime esimesed proovivõttud sinna. Võrdluseks võtsime proove mandrilt.

Töö eesmärk oli reovee proovide kaudu hinnata SARS-CoV-2 nakatunute tegelikku arvu, levikut ja trende (viiruse võimalikku taandumist kui ka viiruse võimaliku teise laine levikut) terves kogukonnas, mida konkreetne reoveepuhasti teenindab.

Töö tulemused peaksid olema aluseks seire jätkamise ja laiendamise vajalikkuse üle otsustamisel.

1. Metoodika valik

Metoodika valikul on esimeseks küsimuseks proovivõtu strateegia. Suurematest puhastitest on võimalik võtta 24 tunni keskmistatud proov, mis peaks andma kõige ülevaatlikuma tulemuse. Samas on oluline seirata ka riskikohti nagu hooldekodud, haiglad, ühiselamud ja vanglad. Nendest asutustest saab kogumiskaevust võtta punktproovi. Seda siiski vaid juhul kui süsteemis asub sobivas kohas kogumiskaev. Projekti käigus kontsentreerisime keskmistatud proovidele, kuid uurisime ka punktproovide kasutamise võimalusi.

Järgmiseks küsimuseks on proovi kontsentreerimine. Laias laastus saab selleks kasutada kahte lähenemist: kas materjali sadestamist või kontsentreerimist membraanfiltril. Meie tulemused näitasid, et oluliselt parema tulemuse annab kontsentreerimine filtril. Seda nii nukleiinhappe saagikuse kui edasist analüüsi pidurdavate komponentide eemaldamise vaatepunktist. Samas tuleb arvestada sellise metoodilise lähenemise kitsaskohtadega. Membraanfiltritega olid maailmas olulised tarneraskused ja kevadisi proove saime analüüsida alles juulis. Samuti nõuab membraanfiltrite kasutamine tugevat aparatuurset baasi (mitmete tsentrifuugide olemasolu). See sai kitsaskohaks sügisel kui proovide mahud oluliselt suurenesid. Siiski, arvestades olulist eelist kvaliteedis, otsustasime membraanfiltrite kasuks. Nii on otsustatud ka enamuses teistes riikides, kus SARS-CoV-2 viiruse seiret reoveest läbi viiakse.

Viiruse detekteerimiseks kasutame kvantitatiivset PCRi. Kvantitatiivse PCRi põhist metoodikat kasutatakse SARS-CoV-2 tuvastamiseks ninaneelust. See on praeguseks selgelt kõige paremini tõendatud metoodiline lähenemine. Kvantitatiivne PCR põhineb viirusgenoomi mõne regiooni paljundamisel, mille efektiivsuse järgi on võimalik hinnata viiruse hulka. Kuna metoodika on kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkusega, siis praegusel hetkel alternatiive sellele sisuliselt ei ole. Viiruse kontsentratsiooni (arvukuse) määramise protokoll on lisatud (LISA 1). Selle metoodika puhul saab analüüsiks kasutada viirusgenoomi erinevaid regioone. Erinevad viirusgenoomi osad võivad olla analüüsitavad erineva efektiivsusega. See tuleneb erinevate nukleotiidjärjestuste erinevustest füüsikalis-keemilistes omadustes. Leidsime, et kõige usaldusväärsema tulemuse annab regiooni N3 analüüs. See regioon kodeerib viiruse nukleokapsiidivalgu C-terminaalset osa. N3 regiooni analüüs andis kõige parema tundlikkuse ja spetsiifilisuse. Samadele tulemustele on jõutud ka teistes riikides. Ühest proovist tegime kuni juulini kolm paralleelreaktsiooni. Täheleandisime, et just väiksemate signaalide puhul esineb paralleelanalüüsides vahel suur varieeruvus. Seetõttu suurendasime alates augustist paralleelreaktsioonide arvu kuueni, et saada usaldusväärsemat tulemust.

Seire kohta erinevates riikides avaldatakse infot jooksavalt [10], kuid see andmebaas tihtipeale ei hõlma riike, kus tulemusi ei ole publitseeritud. Rahvatervise eesmärgil tehtava seire andmed on tihtipeale kättesaadavad ainult kohalikes keeltes.

Võrreldes teiste Euroopa riikidega on meie keskmistatud proovide kogumise strateegia sarnane. Kõige tihedam proovivõtt toimub Hollandis, kus analüüsitakse ülepäeviti riigi rohkem kui 300 puhastit [2, 3]. Paljudes riikides, näiteks Soomes [4] ja Ungaris [5] toimub suuremate asulate puhastites iganädalane proovivõtt ja analüüs. Reoveepõhises koroonaseires on väga aktiivsed ka Itaalia ja Hispaania. Nendes riikides algasid uuringud regionaalsete initsiatiividena ja seejärel püütakse lokaalseid algatusi ühendada ning ehitada ülesse üleriiklikke süsteeme. Seire efektiivsuse tõhustamiseks on oluline ka liikuda puhastitest ülesvoolu ning analüüsida eraldi linnaosaid ja ka üksikuid kriitilisi objekte (vanadekodud, vanglad jne.). Viinis minnakse analüüsiga linnaosade tasemele, kuid üldiselt Euroopas ei ole sellist lähenemist eriti arendatud. Aga näiteks USAs on punktproovide abil tuvastatud üliõpilaste ühiselamuid, kus leidub

nakatunuid [6].

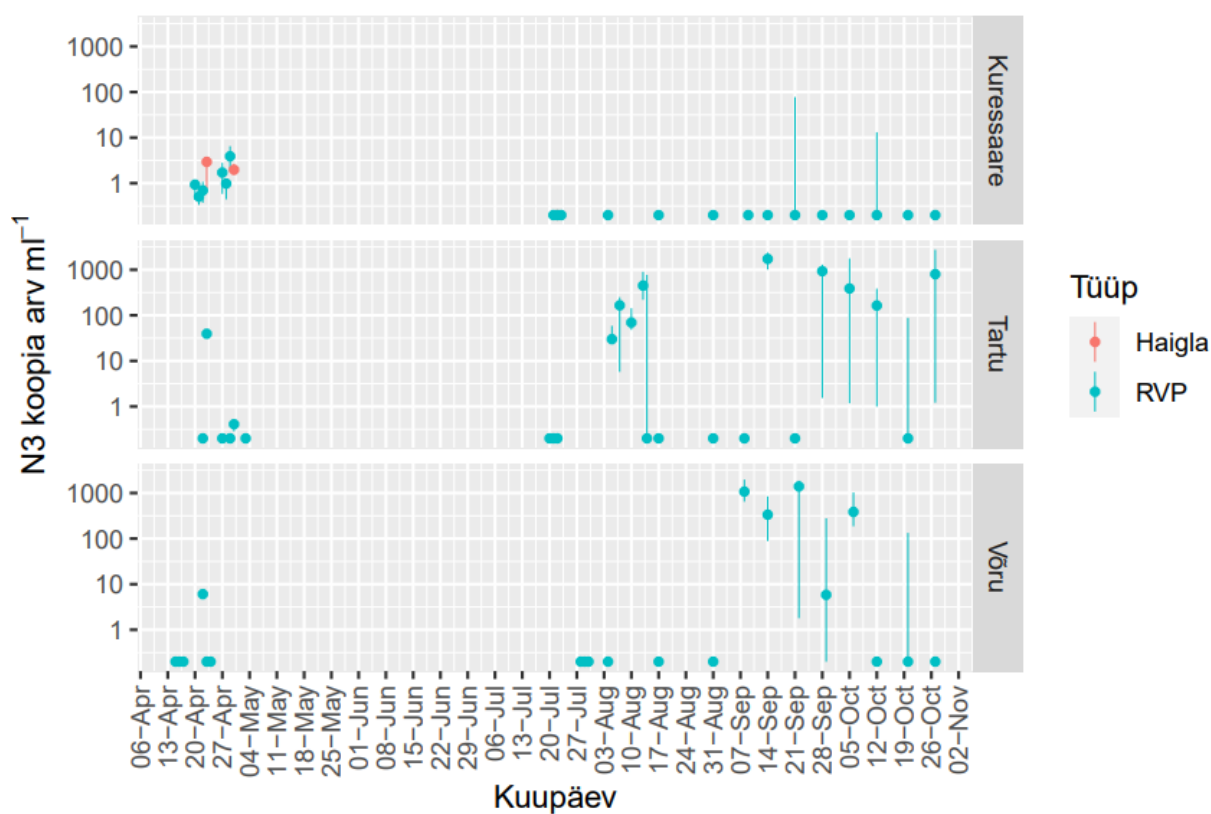
Reoveesüsteemi tuleb lisaks inimese kehast pärit materjalile ka tööstuslikku päritolu reovett ning sademevett. Nakatunute arvu hindamiseks on vaja täpsemalt hinnata otseselt inimeselt pärit materjali osakaalu. Maailmas on pakutud selleks välja erinevaid markereid. Meie arvates oleks kõige mõistlikum kasutada soolekepikese (*Escherichia coli*) arvukust, kuna selle määramiseks on standardmetoodikat rutiinselt rakendavad laborid juba olemas. Selle lähenemise edukust plaanime testida edaspidi.

Praegusel hetkel on viirusmaterjali kontsentreerimise ja analüüsi osas jõutud sarnase metoodikani üle maailma (kontsentreerimine mebraanfiltril + kvantitatiivne PCR) [7], [8]. Samas tuleb arvestada, et metoodikate arendus toimub pidevalt üle maailma ning protsessidel tuleb silma peal hoida, olles valmis tehnoloogilisi uuendusi rakendama [9].

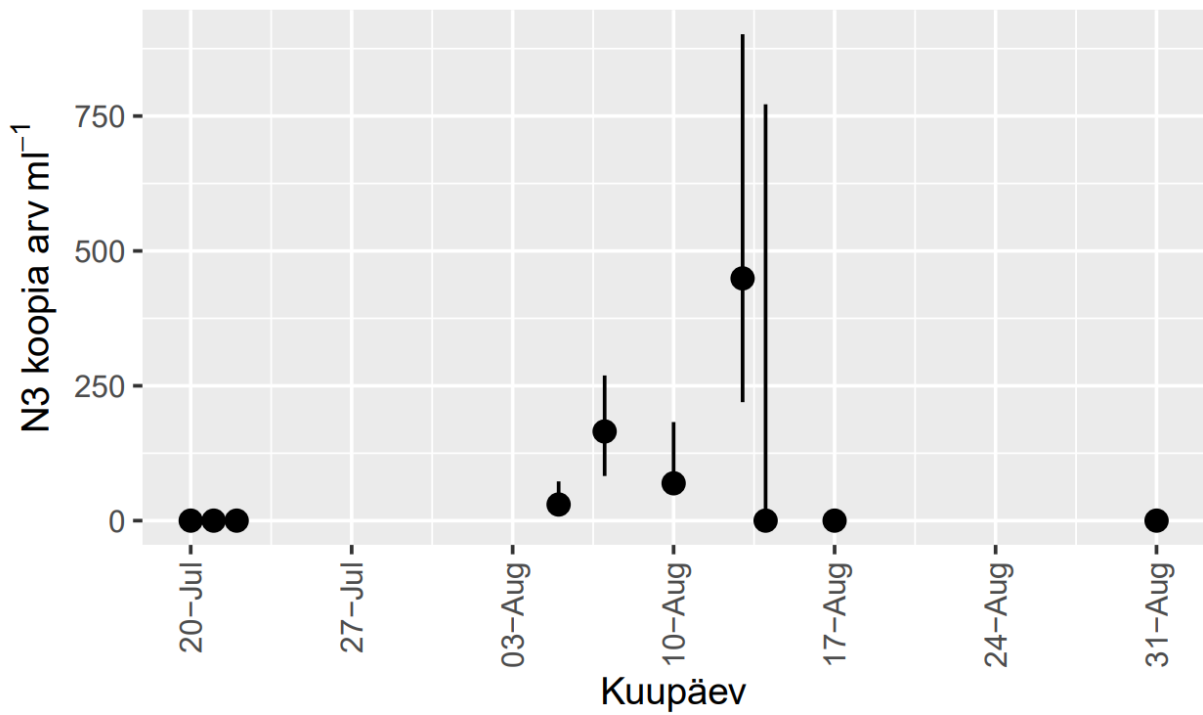
2. Kogutud proovide ülevaade

Proove koguti Kuresaare, Tartu ja Võru reoveepuhastitest. Need olid kõik 24 tunni keskmistatud proovid. Esimesed proovivõturingid toimusid aprillis ning süstemaatilise proovivõtt juulist kuni oktoobrini (Joonis 1). Selline süstemaatiline analüüs tähendas enamasti proovide võttu kord nädalas, kuid Tartu ööklubide puhangu ajal tihendasime proovivõttu Tartus oluliselt (Joonis 2).

Punktproove koguti Kuresaare haigla kogumiskaevust aprillis.



Joonis 1. SARS-CoV-2 viiruse kontsentratsioon proovides. Sinisega (RVP – reovee puhasti) on tähistatud 24 tunni keskmistatud proovid ja punasega haigla reovee punktproovid. Andmete esitamisel on kasutatud log₁₀ skaalat, punkt tähistab mediaanväärtust ning "vurrud" hajuvuse kvartiile.



Joonis 2. SARS-CoV-2 viiruse kontsentratsioon Tartu suvistes proovides. Andmete esitamisel on kasutatud log₁₀ skaalat, punkt tähistab mediaanväärtust ning "vurrud" hajuvuse kvartiile.

3. Reovee proovide sisuline analüüs ja järeldused

Analüüside tulemusi vaadates näeme selget seost viiruse olemasolu kohta reovees ja haiguspuhangute vahel. Tuvastasime, et perioodidel kui nakatunuid ei tuvastatud, ei leitud ka reoveest viirust. See näitab, et valepositiivsete analüüside osakaal on väga väike. Nakatunute olemasolu korral on viirus detekteeritav ka reoveest. Paraku on selge kvantitatiivse seose leidmine osutunud raskeks või võimatuks (Joonis 3). Põhjuseid võib siin olla mitmeid. Esiteks on selge, et nakatunud eritavad viirust erinevalt olenevalt nakkuse faasist [11]. Samuti mõjutavad tulemust nakatunu parameetrid. Näiteks on leitud, et lapse väljaheites võib olla viirust rohkem kui täiskasvanul [12]. Kui nakatunuid on vähe, siis mõjutavad reovee viiruslike leide juhuslikud kõikumised.

Nakatunute arvu kohta andmete leidmine on osutunud samuti raskeks. Terviseamet on avaldanud andmeid maakonniti ja selle andmestiku põhjal ei ole võimalik teha kindlaks palju on nakatunuid konkreetse puhasti teeninduspiirkonnas. Samuti tuleb pidada silmas, et inimese tegelik elukoht ei vasta alati sissekirjutusele ja üldjuhul inimene ei viibi terve päeva oma elukohas. Tartu puhul tuleb arvestada ka haiglaga, kuhu nakatunuid tuuakse ravile laiemast regioonist. Heas koostöös Terviseametiga oleme neid probleeme lahendanud. Siiski osutus andmete saamine oodatust keerulisemaks. Puhasti teeninduspiirkonnas asumist saaksime määrata nakatunu konkreetse aadressi järgi, aga andmekaitse nõuete kohaselt ei saa Terviseamet meile sellist infot väljastada. Võimalik on väljastada infot tänava täpsusega. Aga see nõuab Terviseameti andmehalduse spetsialistidelt olulist lisatööd. Pandeemia kiire leviku tingimustes ei ole alati olnud võimalik seda tööd kiiresti teha kuna vaja on viia läbi prioriteetsemaid analüüse. Vaatamata raskustele oleme kogunud infot nakatunute arvude kohta konkreetsete puhastite teeninduspiirkondades.

Kahjuks praeguste andmete põhjal ei ole võimalik hinnata nakatunute arvu konkreetse reoveepuhasti teeninduspiirkonnas. Viiruse kontsentratsioon annab nakatumise olukorrale ainult väga üldise hinnangu. Siiski näitab viiruse puudumine 24 tunni keskmistatud proovides suure tõenäosusega, et nakatunuid ei ole. Seoses nõrkade korrelatsioonidega pakume välja viiruse hulka analüüsida pigem laiade suurusjärgudena:

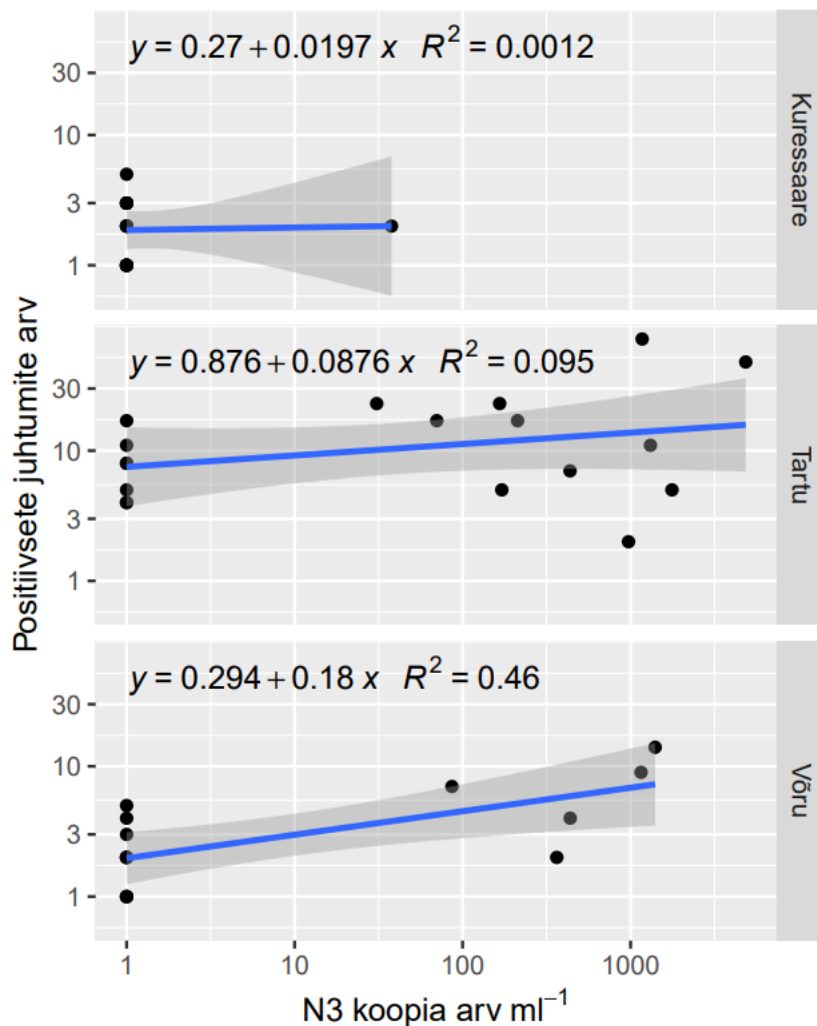
- kui reovees on 0 viirust milliliitris, suure tõenäosusega viirusekandjaid selles piirkonnas ei ole;
- <100 viirust milliliitris on viide sellele, et viiruskandjad on piirkonnas vähe;
- 100 - 2000 viirust milliliitris, Eesti kontekstis mõõdukas viiruskandjate hulk;
- > 2000 viiruseni viitab laiemale levikule.

Selline suurusjärgudes jaotamine nõuab valideerimist edaspidi, kasutades selleks oluliselt suuremat andmehulka.

Kui kevadel publitseeriti, et viirust võib reovees tuvastada juba nädalaid enne nakatunute leidmist, siis sügiseks see hinnang taandus 5 – 7 päevale [13]; Ülevaade [14]. Sellele muutusele on lihtne seletus: mida rohkem me inimesi testime, seda suurema tõenäosusega tuvastame ka nakatunud. Kevadest sügiseni on testimise tulemus oluliselt suurenenud ja see kahandab ka reoveeseire eelhoiatuse mõju. Siiski on oodatav, et reovee põhjal saame jälgida viiruse varjatud

levikut.

SARS-CoV-2 viiruse seiret rakendatakse mitmetes riikides. Protsessi koordineerivad rahvusvahelised organisatsioonid nagu WHO [15] ja Euroopas Joint Research Center. Teiste riikide andmete põhjal on praeguseks selge, et SARS-CoV-2 viiruslik leid reoveest ei võimalda täpselt hinnata nakatunute arvu. Samas viiruste hulga tõus või langus võib olla usaldusväärseks hinnanguks nakkuse tõusule, langusele või stabiliseerumisele.



Joonis 3. Seos SARS-CoV-2 kontsentratsiooni ja nakatunute arvu vahel.

Augusti tihedad proovivõttud Tartust andsid ka olulise uue ja esialgselt võibolla mitte planeeritud rakendamisvõimaluse saadud tulemustele. Nimelt ei ole ainuke küsimus viiruse leviku võimalik suurenemine, vaid ka viiruse leviku taandumise kinnitamine. Pärast Tartu ööklubide lainet võisime tõesti kinnitada, et viiruse levik on madalal tasemel. Ja see omakorda aitas otsustada, kas suure osavõtjate ja pealtvaatajate arvuga rallisid korraldada või mitte.

Oleme tuvastanud SARS-CoV-2 viirust Kuressaare haigla punktproovidest aprillis. Seega võiks arvata, et reovee punktproovidel põhinev meetodika võimaldab riskirühma kuuluvate asutuste seiret. Samas tuleb arvestada, et punktproovide puhul on tulemused varieeruvad kui keskmistatud proovidel. Oluline on, kas nakatunud inimene/inimesed käisid WC-s sel perioodil,

mida parajasti analüüsitakse. Üldiselt arvame, et võime usaldada punktproovide positiivset signaali, aga negatiivne signaal ei tähenda alati nakatunute puudumist. Kuna sai selgeks, et punktproovide alusel nakatunute arvu hindamine oleks väga ebatäpne, Kuressaare haiglast peale aprilli rohkem proove ei võetud.

Kui reoveeseire põhieesmärgiks on nakkushaiguste leviku pidurdamine, siis on ülimalt oluline koostöö Terviseametiga, kelle vastutada on nakkushaiguste kontrolli all hoidmine. Meievaheline koostöö on 2020. aasta sügisel edukalt käivitunud.

Kokkuvõte

Oluline on pidada silmas, et antud töös kogutud andmestik on väga väike ja ei anna alust kindlate järelduste tegemiseks. Samas on kogutud andmed paljulubavad seire edasiseks arendamiseks. Kõige täpsema hinnangu nakkuse levikule annab viiruse analüüs 24 tunni keskmistatud proovides.

Töö tulemusena saab järeldada, et hetkel puuduvad täpsemad meetodid, mis võimaldaksid reovee kaudu hinnata nakatunute täpset arvu. Küll aga pakuti töö raames välja vahemikud, mis võimaldavad nakatunute hulka prognoosida:

- kui reovees on 0 viirust milliliitris, suure tõenäosusega viirusekandjaid selles piirkonnas ei ole;
- <100 viirust milliliitris on viide sellele, et viiruskandjad on piirkonnas vähe;
- 100 - 2000 viirust milliliitris, Eesti kontekstis mõõdukas viiruskandjate hulk;
- > 2000 viiruseni viitab laiemale levikule.

Kokkuvõtteks saab järeldada, et reoveeproovide tulemused on usaldusväärsed hindamiseks seda, kas haiguse levik mõnes piirkonnas on taandumas või mitte.

Viited

1. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.estlett.0c00357>
2. <https://www.waternewseurope.com/netherlands-covid-19-sewage-measurements-difficult-to-interpret/>
3. <https://www.kwrwater.nl/en/actueel/covid-19-publicaties/>
4. <https://thl.fi/en/web/thlfi-en/-/the-presence-of-coronavirus-in-waste-water-may-be-a-warning-of-increased-infections-the-number-of-waste-water-findings-increased-in-august>
5. <https://rmx.news/article/article/hungary-begins-coronavirus-testing-of-wastewater>
6. <https://www.npr.org/2020/10/26/925831847/colleges-turn-to-wastewater-testing-in-an-effort-to-flush-out-the-coronavirus?t=1609417783221>
7. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972036469X?via%3Dihub>
8. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.18.20234039v1.full>
9. <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/10/2680/htm>
10. <https://www.covid19wbec.org/>
11. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.15.20117747v2.full.pdf>
12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32276848/>
13. <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0684-z>
14. <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0690-1>
15. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333670/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-EnvironmentalSampling-2020.1-eng.pdf?ua=1

LISA 1. SARS-CoV-2 arvukuse määramise protokoll

Viirusliku RNA kontsentreerimine ja puhastamine

1. Täida 3x 50 ml Falconit prooviga milles on 5 ml 5% fenooli lahus 100% etanoolis.
2. Tsentrifuegida proov 4600g juures 30 minutit.
3. Filtreerida supernatant läbi 0.22 um Sterivex filtri.
4. Kontsentreerida filtreeritud proov 50 ml kaupa (3 x) Centricon Plus-70 kolonnil (10kDa), selleks tsentrifuegida 3500g >2-3 tundi, kontsentraadi (~100 -600 µl) kätte saamiseks fuugi kolonni tagurpidi 1000g 2 minutit.
5. Ekstraheeri RNA RNeasy kiti protokoll järgi, tulemuseks on 100 µl RNA lahust.

RNA koguse määramine RT-qPCR abil

SARS-CoV-2 viirusosakeste arvukuse hindamiseks reovees loodi esmalt qPCR standard (kindla RNA kontsentratsiooniga kaliiberlahus, kus on teada geenikoopiate arv ühe mikrolitri kohta). Standardkõvera tegemiseks valmistati kaliiberlahusest 10x lahjendused, mida kasutati võrdleva Ct (lävendtsükkel) analüüsi tarbeks. Standardina kasutati SARS-CoV-2 3542 tüve. Standardkõver väljendab viirusosakeste arvukuse ja lävendtsükli vahelist seost.

RT-qPCR reaktsioon viidi läbi 10 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 2 µl 5x ja 0.25 µl 40x qPCR mixi (vastavalt: SBD One-step Probe CoV mix ja SBD One-step SOLIScript CoV mix), 0,2 µl SARS-CoV-II spetsiifilisi N3F, N3R praimereid ning 0,2 µl TaqMan® N3P SARS-CoV-II järejstusspetsiifilist fluorestsentsmärgisega sondi (lõppkontsentratsioon kõigil 200 nM), 3 µl proovi RNA-d aj 4,15 µl deioniseeritud vett (vee puhastamiseks kasutati süsteemi Milli-Q, Merck). Kõik reaktsioonid viid läbi kuues korduses. Igal RT-qPCR plaadil analüüsiti lisaks uuritavatele reoveeproovidele 7 qPCR standardit ja 3 negatiivset kontrollproovi. Negatiivses kontrollproovis kasutati proovi RNA asemel deioniseeritud vett (vee puhastamiseks kasutati süsteemi Milli-Q, Merck). RT-qPCR reaktsioonid viidi läbi Roche LightCycler 480 instrumendil, kasutades 384 plaadi platvormi.

RT-qPCR programm

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
<i>Pöördtranskriptsioon</i>	55 °C	30 min	1
<i>Esialgne aktiveerimine</i>	95 °C	10 sek	1
<i>PCR reaktsioon,</i> <i>mis sisaldab:</i>			45
Denatureerimine	95 °C	10 sek	
Anniilimine ja elongatsioon	55 °C	30 sek	
<i>Inkubatsioon</i>	4 °C	20 sek	1