



METODICKÝ POSTUP

**Metodický postup analýzy odpadních vod
na přítomnost specifických oblastí genomu
viru SARS-CoV-2**

**Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.
Mgr. Jakub Hrdý
Mgr. Magdaléna Krásna
Mgr. Kateřina Sovová, Ph.D.
Ing. Lucia Gharwalová
RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.**

Metodický postup 141/2022

Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2

Autoři

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D., Mgr. Jakub Hrdý, Mgr. Magdaléna Krásna,
Mgr. Kateřina Sovová, Ph.D., Ing. Lucia Gharwalová, RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.

Uvedený metodický postup je výstupem projektu Ministerstva vnitra VI04000017 (Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace). Zveřejňování tohoto postupu či jeho částí podléhá omezením vyplývajícím z požadavků MV ČR a MZ ČR.

ISBN 978-80-7672-021-3

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Obsah

I) CÍL METODIKY

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1	Popis postupu analýzy odpadních vod a jejich kontrolních bodů	3
1.1	Kontrola odběru vzorku využitím stanovení indikátorů fekálního znečištění	4
1.2	Kontrola procesu zpracování vzorku (zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin) s využitím umělé kontaminace vzorku	5
1.3.	Detekce specifických oblastí genomu SARS-CoV-2	5
2	Předmět a působnost	8
2.1	Podstata zkoušky	8
2.2	Přístrojové vybavení a zařízení laboratoře	8
2.3	Chemikálie a roztoky	9
2.3.1	Polyetylen glykol (PEG) a chlorid sodný (NaCl)	9
2.3.2	Fosfátový pufr (PBS)	9
2.3.3	Etanol	9
2.3.4	Souprava k izolaci nukleových kyselin	9
2.3.5	Carrier RNA	9
2.3.6	Inhibitor RNáz	9
2.3.7	Příprava kvantifikačního standardu a RNA IAC	9
2.3.8	Specifické oligonukleotidy (primery a sondy)	10
2.3.9	Souprava pro reverzní transkripci	10
2.3.10	Nukleotidy	10
2.3.11	Voda pro PCR	10
2.3.12	Reakční směs pro nekompetitivní qPCR	10
2.3.13	Uracil-DNA-glykosyláza (UDG)	10
2.4	Postup zkoušky	11
2.4.1	Bezpečnostní opatření	11
2.4.2	Okolní podmínky zkoušky	11
2.4.3	Množství vzorku	11
2.4.4	Slepý pokus	11
2.4.5	Replikáty	12
2.4.6	Postup zakoncentrování virových částic ze vzorků odpadní vody	12
2.4.7	Izolace nukleových kyselin	12
2.4.8	Protokol reverzní transkripce	14
2.4.9	Protokol PCR	15
3	Výpočet a vyjádření výsledku	17
3.1	Hodnocení výstupu	17
3.1.1	Kvalitativní hodnocení	17
3.1.2	Kvantitativní hodnocení	17
4	Validace	18
4.1	Specifita	18
4.2	Optimalizace reakčních podmínek	19
4.3	Charakteristika metodického postupu a systému RT-qPCR k detekci specifických oblastí genomu SARS-CoV-2	19
4.3.1	Citlivost/limit detekce (LOD), opakovatelnost účinnost metodického postupu	19
5	Operativní řízení jakosti	20
III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ		
IV) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY		
V) SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY		

PŘEDMLUVA

Epidemiologický přístup k odpadním vodám byl vyvinut a zdokonalován vědci v oblasti životního prostředí před téměř 20 lety. Tento přístup byl často používán ke stanovení populační spotřeby chemikálií, zejména nelegálních drog, napříč různými komunitami i v průběhu času. Lze jej však také využít k včasnému odhalení potenciálních rizik epidemického či pandemického výskytu patogenních agens. O této možnosti svědčí začlenění monitoringu odpadních vod a tak environmetálního dohledu nad výskytem polioviru do strategického plánu Světové zdravotnické organizace (WHO) ke globální eradikaci dětské obrny. Využití tohoto přístupu se nabízí i v rámci současné epidemické situace týkající se onemocnění covid-19, kdy kromě profylaxe před expozicí nebo terapeutické léčby je nejdůležitějším nástrojem schopnost rychle identifikovat infikované jedince (O'Brien et al., 2019; Mlejnkova et al., 2020).

I) CÍL METODIKY

Cílem metodiky je zajistit validní analýzu každého jednoho vzorku odpadní vody na přítomnost specifických oblastí genomu původce onemocnění covid-19, viru SARS-CoV-2, s použitím RT-qPCR a následující kvantifikaci virové nálože (resp. genomových ekvivalentů) v definovaném objemu vzorku. Metodický postup zahrnuje definovaný systém kontrol celého procesu analýzy (odběr vzorku, izolace/zakoncentrování virových částic, izolace nukleových kyselin a RT-qPCR), který ověří nejen řádný průběh odběru vzorku, ale také umožní stanovit účinnost celého analytického postupu a tak přesněji kvantifikovat množství sledovaných virů (resp. genomových ekvivalentů) v každém vyšetřeném vzorku.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Popis postupu analýzy odpadních vod a jejich kontrolních bodů

Vzhledem k problematičnosti kultivace některých virů na buněčných kulturách jsou metody detekce virových agens založeny na moderních molekulárních metodách, z nichž nejpoužívanější je polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR). Tato reakce umožňuje nejen detekci, ale také kvantifikaci virové nálože v různých typech matric. U virových agens, jejichž genom je tvořen RNA (např. SARS-CoV-2), je před tento krok nutno zahrnut reverzní transkripci (RT), tzn. přepis specifických oblastí genomu (RNA) sledovaných virů do formy cDNA, která je následně použita jako matrice do reakce qPCR (RT-qPCR).

Řádný průběh qPCR/RT-qPCR reakcí vyžaduje úpravu analyzovaných vzorků, tzn. zejména izolaci nukleových kyselin. Postupy přímé izolace nukleových kyselin s následnou detekcí sledovaných agens jsou jasně definovány a zavedeny pro klinické vzorky. U vzorků prostředí, jako jsou např. i odpadní vody, existuje předpoklad nižší virové nálože. Proto je vhodné k vlastní analýze použít větší množství vzorku a před izolaci nukleových kyselin provést krok umožňující zakoncentrování virových částic. Tímto přístupem vzniká metodicky náročnější proces, který je tak náchylnější k chybovosti. Z tohoto důvodu, tak aby byly zajištěny validní výsledky, by měl být každý krok analýzy přísně kontrolován. Ačkoli je kontrola analytického postupu u klinických vzorků pouze doporučena, v případě sledování významných zástupců

virů způsobujících alimentární onemocnění (noroviry a virus hepatitidy A) je v potravinových maticích a prostředí přesně stanovena metodami ISO 15216-1:2017 a ISO 15216-2:2019.

Vzhledem k výše uvedenému vypracovaný metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 obsahuje kontrolní body celé analýzy, které umožňují získat řádné a validní výsledky. Tyto body zahrnují:

- 1) kontrolu odběru vzorků odpadních vod, včetně jejich transportu při vhodných podmínkách (teplota a čas) do analytických laboratoří (kapitola 1.1 Kontrola odběru vzorku využitím stanovení indikátorů fekálního znečištění, podrobněji viz **Příloha č. 1**).
- 2) kontrolu úpravy odpadních vod, tzn. zakoncentrování virových částic z definovaného objemu vzorku a následující izolaci nukleových kyselin. Tato externí kontrola analýzy umožňuje také určit účinnost celého postupu, čímž je zaručena přesnější kvantifikace SARS-CoV-2 (resp. jeho genomových ekvivalentů) ve sledovaných vzorcích (kapitola 1.2 Kontrola procesu zpracování vzorku (zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin) s využitím umělé kontaminace vzorku, podrobněji viz **Příloha č. 2**).
- 3) kontrolu vlastního průběhu detekčního a kvantifikačního kroku SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) ve sledovaných vzorcích s použitím RT-qPCR (kapitola 1.3. Detekce specifických oblastí genomu SARS-CoV-2).

1.1 Kontrola odběru vzorku využitím stanovení indikátorů fekálního znečištění

Virová agens jsou často detekována ve vodě, která splňuje kritéria určená na základě bakteriologických rozborů. Z tohoto důvodu je nutno zvolit vhodnější indikátory fekálního znečištění, které lépe korespondují s výskytem patogenních virových agens. Proto za účelem kontroly řádného odběru vzorků odpadních vod a jejich následného transportu do analytických laboratoří je zavedena detekce humánních adenovirů, které kritéria indikátorů fekálního znečištění s přihlédnutím na výskyt dalších virových agens lépe splňují (Farkas et al., 2020).

Jako detekční cíl k průkazu humánních adenovirů byla zvolena oblast genu pro protein hexonu. Aby bylo možné detekovat co nejvíce různých sérotypů humánních adenovirů včetně sérotypu 40 a 41 byly vybrány dvě sady primerů a sond: hex2 v rozsahu genomu 18892-18976 bp (GenBank reference AY339865.1; délka výsledného amplikonu je 85 bp) a hex3 v rozsahu genomu 18296-18379 bp (GenBank reference AY487947.1; délka výsledného amplikonu je 84 bp). Metoda qPCR má zavedenu interní amplifikační kontrolu (IAC) k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice reakce. Postup qPCR k průkazu humánních adenovirů ve vzorcích odpadních vod je podrobněji popsán v **Příloze č. 1**.*

* **Příloha č. 1** je na vyžádání k dispozici u Mgr. Petry Vašíčkové, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno, e-mail: petra.vasickova@vri.cz, tel.+420 777 786 756 nebo hlavní řešitelky projektu BV RNDr. Hany Mlejnkové, Ph.D., Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M., Podbabská 2582, 160 00 Praha 6-Dejvice, e-mail: hana.mlejnkova@vuv.cz, tel. +420 724 583 662.

1.2 Kontrola procesu zpracování vzorku (zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin) s využitím umělé kontaminace vzorku

V případě analýzy vzorků na přítomnost virů, jejichž genom je tvořen RNA, lze kontrolu procesu analýzy vzorku řešit několika způsoby; umělou kontaminací vzorku specifickou molekulou RNA nebo plazmidovou DNA. Molekula RNA je vysoce citlivá k působení všudypřítomných RNáz, což může vést k podhodnocení účinnosti analytického procesu. Oproti tomu kontaminace vzorku plazmidovou DNA, která je daleko stabilnější/odolnější než RNA, může vést k chybnému stanovení vyšší účinnosti izolace. Z těchto důvodů je jednou z nejvhodnějších možností kontroly použití jiného viru, který má podobné strukturální vlastnosti jako cílový virus (ISO 15216-1:2017; ISO 15216-2:2019). Vzhledem k bezpečnosti laboratorních postupů by tento virus zároveň měl být pro člověka nepatogenní a neměl by tak představovat hrozbu pro okolí. Proto byl k tomuto účelu zvolen virus transmisivní gastroenteritidy prasat (TGEV), který je společně se SARS-CoV-2 klasifikován do čeledi *Caliciviridae*, existuje zde předpoklad jejich podobných strukturálních vlastností a pro člověka je nepatogenní.

Detekce specifické části genomu TGEV je cílena na oblast genu S (oblast mezi 370 -515 nukleotidem otevřeného čtecího rámce genu S) s délkou výsledného amplikonu 145 bp. Do každé reakce je přidána IAC, která upozorní na falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti inhibitorů ovlivňujících průběh reakce. Jedná se tedy o duplexní RT-qPCR. Kvantifikace probíhá podle kalibrační křivky desetinásobných ředění gradientu *in vitro* připravených molekul RNA. Umělá kontaminace každého jednoho vzorku definovaným množstvím TGEV (5×10^6 TGEV částic) následně umožní stanovit účinnost celého postupu a tak přesnější kvantifikaci genomových ekvivalentů SARS-CoV-2 v daných vzorcích. Postup stanovení a kvantifikace TGEV ve vzorku odpadní vody je podrobněji popsán v **Příloze č. 2.***

* **Příloha č. 2** je na vyžádání k dispozici u Mgr. Petry Vašíčkové, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno, e-mail: petra.vasickova@vri.cz, tel.+420 777 786 756 nebo hlavní řešitelky projektu BV RNDr. Hany Mlejnkové, Ph.D., Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M., Podbabská 2582, 160 00 Praha 6-Dejvice, e-mail: hana.mlejnkova@vuv.cz, tel. +420 724 583 662.

1.3 Detekce specifických oblastí genomu SARS-CoV-2

Vzhledem ke genetické variabilitě virů, jejichž genom je tvořen RNA (SARS-CoV-2 nevyjímaje), byly detekční cíle k průkazu SARS-CoV-2 cíleny na několik specifických oblastí genomu tohoto viru. K průkazu specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 metodou RT-qPCR je nově použita kombinace tří sad specifických oligonukleotidů (primery a sonda). Podklad dvou sad těchto oligonukleotidů vychází z již publikovaných systémů (Bustin et al., 2020), při návrhu jejich modifikací (degenerací) byly zohledněny známé mutace tohoto viru. Další sada oligonukleotidů byla, s přihlédnutím na její vhodnost k použití k analýze vzorků prostředí, navržena *de novo*. Dvě sady specifických oligonukleotidů jsou cíleny na gen N, pozice v genomu 28 939 - 29 029 nt a 28 351 - 28 463 nt (GenBank reference NC_045512.2). Třetí sada je zaměřena na oblast kódující nestrukturální protein nsp12, pozice v genomu 14 975 - 15 071 nt (GenBank reference NC_004718.3). Veškeré primery a sondy byly ověřeny/navrženy pomocí programu Primer3 (Rozen et al., 1998). Kvantifikace SARS-CoV-2

(resp. genomových ekvivalentů) je prováděna na základě *in vitro* připravených RNA standardů. *

Do každé RT-qPCR reakce je přidána IAC, která slouží k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice RT-qPCR reakce. K přípravě IAC ve formě RNA byla jako templátová DNA použita část sekvence genu *StTS1* (AF483209) pocházející z brambor (*Solanum tuberosum*). K této části genu byla připojena vazebná místa pro hybridní primery nep/F57. Část sekvence těchto primerů byla odvozena z genu pro endochitinázu (GQ338261) láčkovky (*Nepenthes*), část z genu F57 (X70277) *Mycobacterium paratuberculosis*. Takto připravený konstrukt je zcela uměle vytvořená a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IAC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matici. Délka výsledného ampliconu je 141 bp. *

* Umělé konstrukty (in vitro transkripty) použité jako kvantifikační standard/pozitivní kontrola a interní amplifikační kontrola (IAC) jsou na vyžádání k dispozici u Mgr. Petry Vašíčkové, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudecova 70, Brno, 621 00, e-mail: petra.vasicikova@vri.cz, tel.+420 777 786 756.

Název	Sekvence	Cílová oblast	Velikost ampikonu
SARS-CoV-2_Ndeg_F	5'-GCTKCTWGACAGATTGAAC-3'	N	88 bp
SARS-CoV-2_Ndeg_R	5'-ARCAGATTTCTTARTGACAGTTTG-3'		
SARS-CoV-2_Ndeg_P1	5'-FAM-ATKTYTGGTWAAKGCCAACACAACA-3'		
SARS-CoV-2_Ndeg_P2	5'-FAM-TYTGGTWAATGCCAACACAACAAGG-BHQ1-3'		
SARS-CoV-2_N-HM_F	5'-TAACCAGAATGGAGRACRCA-3'		
SARS-CoV-2_N-HM_R	5'-KTMYTCCCTTGCCATGYTGAG-3'	N	112 bp
SARS-CoV-2_N-HM_P	5'-FAM-AAACARCGYCGRCCCAAGGTTA-BHQ1-3'		
SARS-CoV-2_Nsp12_F	5'-CATCCCTACTATAACTCAAAATGAA-3'		
SARS-CoV-2_Nsp12_R	5'-GTCATAGTACTACAGATAGAGACAC-3'	nsp12	96 bp
SARS-CoV-2_Nsp12_P	5'-HEX-TGCAAAAGATAGAGCTCGACCCGT-BHQ1-3'		
IAC_F	5'-AGAGGACCGGATATTCGAC-3'	IAC	141 bp
IAC_R	5'-AGGTAGTCCGAGGAAAACCTCTAAAC-3'		
IAC_P	5'-Cy5-AGGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTGGA-BHQ-3'		

2 Předmět a působnost

Metodický postup je závazný ke stanovení specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 ve vzorcích odpadních vod a k následné kvantifikaci SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v definovaném objemu vzorku. Tento postup má zavedený systém kontrol celého procesu analýzy každého jednoho vzorku, který umožňuje validní analýzu a zároveň přesnější kvantifikaci SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v definovaných vzorcích.

2.1 Podstata zkoušky

Jedná se o metodický postup určený ke stanovení přítomnosti specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 ve vzorcích odpadních vod použitím RT-qPCR. Postup zahrnuje několik na sebe navazujících kroků 1) zakoncentrování virových částic z řádně odebraného vzorku odpadní vody, 2) izolaci nukleových kyselin, 3) vlastní detekci sledovaných agens (kontrola odběru a transportu vzorku, kontrola procesu zpracování vzorku a vlastní detekci specifických oblastí genomu SARS-CoV-2) a kvantifikaci SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v definovaném objemu vzorku.

2.2 Přístrojové vybavení a zařízení laboratoře

- Chlazená centrifuga - parametry 10 000 g, objemy 500 nebo 250 ml
- Příslušné centrifugační zkumavky o objemu 500 ml nebo 250 ml
- Sterilní mikrozkušavky o objemu 0,2; 1,5 (doporučeno DNA low-binding tubes) a 2 ml (doručeno se šroubovacím víčkem)
- Sada pipet:
 - s rozsahem nastavitelným od 1000 – 5000 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 100 – 1000 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 5 – 50 µl (s chybou do 5%)
 - s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10 µl (s chybou do 5%)
 - doporučena automatická pipeta s rozsahem od 100 – 300 µl (s chybou do 5%)
 - doporučena 8-kanálová pipeta s rozsahem od 1 – 10 µl (s chybou do 5%)
- Špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
- Chladnička
- Vortex
- Mraznička (-20/-70 °C)
- Laboratorní váhy
- Centrifuga MiniSpin
- Centrifuga s adaptérem na 96-jamkové destičky
- Termocycler (reverzní transkripce)
- Termocycler k provedení real time PCR (qPCR)

2.3 Chemikálie a roztoky

2.3.1 Polyetylen glykol (PEG) a chlorid sodný (NaCl)

Pro zakoncentrování virových částic ze vzorků odpadních vod je použit polyetylen glykol 6000 (PEG 6000) a chlorid sodný (NaCl). Na vzorek o objemu 500 ml je doporučeno použít navážku 40 g PEG 6000 a 8,8 g NaCl. Chemikálie lze skladovat při laboratorní teplotě po dobu uvedenou dodavatelem.

2.3.2 Fosfátový pufr (PBS)

Fosfátový pufr (PBS) je připraven z 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ a 1000 ml destilované vody. Následně je nutno upravit pH na 7,2 (1N HCl). Roztok je možno skladovat při teplotě 15-25 °C po dobu max. 6 měsíců.

2.3.3 Etanol

V uvedené metodice se používá výhradně bezvodý etanol, p.a., min. 99,8% (molecular biology grade), který je možno skladovat při laboratorní teplotě po dobu 1 roku.

2.3.4 Souprava k izolaci nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin je prováděna komerční soupravou QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen; <https://www.ibiotech.cz/produkt/qiaamp-viral-rna-mini-kit>). Postup je založen na lýzi virových částic, vysrážení vysokou koncentrací chaotropních solí a imobilizaci nukleových kyselin na koloně. Purifikované nukleové kyseliny jsou následně eluovány do „RNáza free“ vody s přidavkem Inhibitoru RNáz (výsledná koncentrace 200U/ml vody). Izolační soupravu je možné skladovat při teplotě 15-25 °C max. po dobu 1 roku.

2.3.5 Carrier RNA

Pro zamezení ztrát při nízkých koncentracích cílové RNA se používá tzv. nosičová (angl. carrier) RNA (Ambion, USA). Tato RNA se používá v koncentraci 50 ng/μl k přípravě (naředění) kvantifikačního gradientu a RNA IAC. Chemikálii je možno skladovat při teplotě cca -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců. Je nutno připravit tzv. poměrné vzorky a z důvodu degradace RNA zabránit opakovanému rozmrazování a zamrazování chemikálie.

2.3.6 Inhibitor RNáz

V reverzní transkripci je použit inhibitor enzymů, které štěpí molekuly RNA, Ribonuclease Inhibitor (Porcine liver; 40 U/μl; New England BioLabs). Chemikálii je možno skladovat při teplotě cca -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců.

2.3.7 Příprava kvantifikačního standardu a RNA IAC

Kvantifikační standard je připraven z 20 μl dodaných *in vitro* transkriptů specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 desítkovým ředěním v rozmezí koncentrací 1×10⁶ až 1×10¹ kopií/μl, ředění je prováděno v „RNáza free“ vodě s přidavkem carrier RNA 50 ng/μl a inhibitoru RNáz (výsledná koncentrace 0,8 U/μl). Do reverzní transkripce je použito 5 μl z každého ředění, tzn. 5×10⁶ až 5×10¹ kopií na reakci RT-qPCR. Z důvodu degradace RNA je nutno

takto připravené RNA gradienty okamžitě použít v experimentu a není vhodné je dále skladovat či opětovně zamrazovat.

IAC RNA je používána v koncentraci 1 fg/μl. RNA IAC je nutno skladovat při teplotě cca $-70\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$ a před provedením reverzní transkripce rozmrazit. RNA IAC nesmí být opětovně rozmrazována a zamrazována.

2.3.8 Specifické oligonukleotidy (primery a sondy)

Primery a sondy se dodávají v lyofilizovaném stavu od firmy Generi Biotech (Česká republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. Primery a sondy uloženy v mrazničce při teplotě $-20\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$.

2.3.9 Souprava pro reverzní transkripci

K reverzní transkripci (přepisu RNA do formy cDNA) je použita PrimeScript™ Reverse Transcriptase, (200 U/μl, Takara, Japonsko). Reverzní transkriptázu je nutno skladovat při teplotě cca -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců. Kvůli ztrátě účinnosti je nutno zabránit opakovanému rozmrazování a zamrazování enzymu.

2.3.10 Nukleotidy

Při přípravě reakčních směsí reverzní transkripce se používají volné nukleotidy, dNTPs (10 mM, Serva). Chemikálii je možno skladovat při teplotě cca -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců a opakovaně zamrazovat a rozmrazovat.

2.3.11 Voda pro PCR

Pro ředění všech komponent qPCR reakce se používá voda LightCycler 480 Probes Master H₂O, PCR-grade (Roche). PCR voda je součástí balení Master Mixu. Při delším skladování by měla být uchovávána při teplotě cca -20 °C .

2.3.12 Reakční směs pro nekompetitivní qPCR

LightCycler 480 Probes Master (Roche), který je použit k přípravě qPCR reakcí, je nutno skladovat při teplotě cca -20 °C s minimalizací opakovaného zamrazování a rozmrazování.

2.3.13 Uracil-DNA-glykosyláza (UDG)

K zamezení možných kontaminací PCR produkty každá reakce qPCR obsahuje Uracil-DNA-glykosylázu (UNG; Roche). Chemikálii je možno skladovat při teplotě cca -20 °C po dobu nejdéle 6 měsíců a opakovaně zamrazovat a rozmrazovat.

2.4 Postup zkoušky

2.4.1 Bezpečnostní opatření

Provedení metody vyžaduje ochranné pomůcky během prvotní úpravy vzorků odpadní vody (zakoncentrování virových částic) v podobě respirátorů FFP3, jednorázových plášťů a ochranných rukavic. Celý postup zakoncentrování virových částic až po jejich inaktivaci je nutno provádět v biohazardním boxu třídy II.

2.4.2 Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody nevyžaduje kontrolu žádných limitních podmínek.

2.4.3 Množství vzorku

Metodický postup je optimalizován na 500 ml odpadní vody. Do reverzní transkripce je použito 5 µl izolované RNA a do qPCR je použito 5 µl cDNA.

2.4.4 Slepý pokus

2.4.4.1 Negativní kontrola zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin

Jako negativní kontrola zakoncentrování virových částic a izolace RNA (NIC) je v ekvivalentním množství místo vzorku použita čistá voda. Jedna NIC musí být použita v každé izolaci RNA.

2.4.4.2 Negativní kontrola RT-qPCR

Jako negativní kontrola RT-qPCR je do reverzní transkripce přidána voda v ekvivalentním množství, produkt je dále použit v qPCR. Jeden slepý vzorek musí být použit při každém reverzně transkripčním experimentu. Jako negativní kontrola qPCR je v ekvivalentním množství do reakce přidána voda. Jeden slepý vzorek musí být použit při každém qPCR experimentu.

2.4.4.3 Kontrola odběru vzorku a jeho transportu do laboratoře

Jako kontrola řádného odběru vzorku a vhodných podmínek jeho transportu do laboratoře je použita detekce indikátorů fekálního znečištění, humánních adenovirů, podrobněji viz **Příloha č. 1.**

2.4.4.4 Pozitivní kontrola zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin

Jako pozitivní kontrola celého postupu zpracování vzorku (zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin) slouží roztok TGEV o definované koncentraci, který je přidán ke každému vzorku před zahájením procesu jeho zpracování (kromě negativní kontroly zakoncentrování virových částic a izolace nukleových kyselin), podrobněji viz **Příloha č. 2.**

2.4.4.5 Pozitivní kontrola RT-qPCR

Pozitivní kontrola je do RT-qPCR dávána v každém experimentu. Jako pozitivní kontrola slouží RNA gradient (naředěný desítkovým ředěním), který je používán zároveň ke kvantifikaci SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v definovaném objemu vzorku.

2.4.5 Replikáty

Každý vzorek je analyzován nejméně v duplikátu.

2.4.6 Postup zakoncentrování virových částic ze vzorků odpadní vody

- Ke vzorku vody o objemu cca 500 ml přidat 5 μ l externí kontroly procesu zpracování vzorku (TGEV); vzorek možno nechat v odběrové nádobě
- Přidat navážku PEG 6000 (40 g) a NaCl (8,8 g)
- Vzorek řádně protřepat (až do úplného rozpuštění přidané směsi)
- Inkubace vzorků při chladničkové teplotě (± 4 °C) cca 12 - 16 hod (do druhého dne)
- Vzorek opatrně protřepat a $\frac{1}{2}$ vzorku nalít do 250 ml centrifugační zkumavky, zbytek vzorku umístit do chladničky
- Vzorek odstředit při cca 10 000 $\times$ g/30 min/4 °C
- Opatrně slít supernatant
- Do centrifugační zkumavky nalít zbytek vzorku
- Vzorek odstředit při cca 10 000 $\times$ g/30 min/4 °C
- Opatrně slít supernatant
- Vzorek odstředit při cca 10 000 $\times$ g/5 min/4 °C
- Pipetou opatrně odebrat supernatant
- Ke vzorku (peletě) přidat 2 ml PBS
- Řádně resuspendovat peletu (možné vortexovat)
- Odstředit při cca 3 000 $\times$ g/cca 15 min/cca 4 °C
- Pipetou odebrat 2 ml supernatantu
- V případě izolace nukleových kyselin provedené do 24 hod lze supernatant umístit do chladničky
- V případě izolace nukleových kyselin provedené až další dny zamrazit na -70 °C $\pm$ 4 °C; takto je vhodné dlouhodobě skladovat i zbytek supernatantu po izolaci nukleových kyselin

2.4.7 Izolace nukleových kyselin

2.4.7.1 Příprava materiálu před izolací nukleových kyselin

- Připravit směs vody a inhibitoru RNáz smícháním 1 ml RNáza free vody a 5 μ l (40 U/ μ l) inhibitoru, poměrné vzorky je možno skladovat při teplotě cca -20 °C po dobu max. 1 rok.
- Při prvním použití izolační soupravy (QIAamp Viral RNA Mini Kit)
 - k 310 μ g lyofilizované carrier RNA přidat 310 μ l AVE pufru nebo k 1550 μ g carrier RNA přidat 1550 ml AVE pufru (c 1 μ g/ μ l; součást izolační soupravy),

pipetou promíchat a po 5,6 µl rozplnit do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek. Zkumavky možno zamrazit při -20 °C a následně použít dle potřeby

- k pufru AW1 (součást izolační soupravy) přidat patričné množství etanolu (molecular biology grade)
- k pufru AW2 (součást izolační soupravy) přidat patričné množství etanolu (molecular biology grade)
- Pokud jsou v pufru AVL (součást izolační soupravy) vysráženy soli - zahřát na cca 80 °C/max. 5 min

2.4.7.2 Izolace nukleových kyselin

- Do zkumavek s 5,6 µl AVE pufru přidat 560 µl AVL pufru
- Přidat 140 µl vzorku (odebírat „čistou část“ vzorku)
- Vortex cca 15 s
- Inkubace cca 10 min/15-25 °C
- Krátce odstředit
- Přidat 560 µl etanolu (molecular biology grade, 96-100%)
- Vortex cca 15 s
- Krátce odstředit
- Na kolonku napipetovat 630 µl lyzovaného vzorku
- Odstředit při cca 8 000 rpm/1 min
- Kolonku umístit do nové sběrné zkumavky
- Na kolonku přidat zbytek lyzátu
- Odstředit při cca 8 000 rpm/1 min
- Kolonku umístit do nové sběrné zkumavky
- Přidat 500 µl AW1 pufru
- Odstředit při cca 8 000 rpm/1 min
- Kolonku umístit do nové sběrné zkumavky
- Přidat 500 µl AW2 pufru
- Odstředit při cca 14 000 rpm/3 min
- Kolonku umístit do nové sběrné zkumavky
- Odstředit při cca 14 000 rpm/2 min; membránka musí být plně vysušena
- Kolonku umístit do sterilní zkumavky (DNA low-binding; 1,5 ml)
- Přímou na membránku přidat 50 µl RNase-free H₂O s přísávkem inhibitoru RNáz
- Inkubace cca 1 min/15-25 °C
- Odstředit 8 000 rpm/1 min
- Přímou na membránku přidat 50 µl RNase-free H₂O s přísávkem inhibitoru RNáz
- Inkubace cca 1 min/15-25 °C
- Odstředit cca 8 000 rpm/1 min

V případě analýzy provedené do 24 hod eluát umístit do chladničky (2-8 °C), v případě analýzy provedené až další dny eluát zamrazit na -70 °C ± 4 °C.

2.4.8 Protokol reverzní transkripce

2.4.8.1 Příprava pracovních roztoků specifických oligonukleotidů

Primery jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl.

K omezení možností kontaminací jsou tyto zásobní roztoky použity k přípravě tzv. pracovních roztoků, které slouží k následující přípravě reakčních směsí.

Složka	Zásobní roztok (μl)	Voda (μl)	Koncentrace (pmol/μl)
SARS-CoV-2 Ndeg R	50	450	10
SARS-CoV-2 N-HM R	50	450	10
SARS-CoV-2 Nsp12 R	50	450	10
IAC R	50	450	10

2.4.8.2 Příprava reakčních směsí a provedení reverzní transkripce (přepisu RNA SARS-CoV-2 do cDNA)

Na chlazeném stojánku připravit reakční směs I o následujícím složení

Složka	1x (μl)	Konečná koncentrace	100 reakcí (μl)
dNTP mix (10 nmol/μl)	1,0	0,5 nmol/μl	100
SARS-CoV-2 Ndeg R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
SARS-CoV-2 N-HM R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
SARS-CoV-2 Nsp12 R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
IAC R (10 pmol/μl)	0,2	0,1 pmol/μl	20
IAC RNA (1 fg/μl)	1,0	50 fg/μl	100
RNase-free voda	2,2		
Celkový objem	5		

- Reakční směs I promíchat
- Rozplnit po 5 μl do stripů či jiných vhodných zkumavek (v této fázi je možno zkumavky popsat a uskladnit při -70 °C ± 4 °C po dobu nejdéle 6 měsíců)
- Přidat 5 μl RNA
- Krátce stočit
- Inkubace při 65 °C/5 min (cycler)
- Zkumavky ochladit na ledu (cca 5 min)
- Krátce stočit
- Přidat 10 μl reakční směsi II (konečný objem reakce 20 μl)

Složka	1 × (μl)	Konečná koncentrace
RNase-free voda	5,0	
Primescript reaction buffer	4,0	
PrimeScript enzyme (200 U/μl)	0,5	5 U/μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Konečný objem reakční směsi	10,0	

- Jemně promíchat
- Krátce stočit
- Protokol reakce (cycler): 50 °C/60 min
75 °C/15 min
10 °C/for ever

Připravená cDNA je následně použita jako templát do qPCR, následně je možno ji skladovat při -20 °C ± 4 °C.

2.4.9 Protokol PCR

2.4.9.1 Příprava pracovních roztoků specifických oligonukleotidů

Primery a sondy jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. K omezení možností kontaminací jsou tyto zásobní roztoky použity k přípravě tzv. pracovních roztoků, které slouží k jednodušší přípravě reakčních směsí.

Popis zkumavky	Složka	Zásobní roztok (μl)	Voda (μl)	Koncentrace (pmol/μl)
Sondy SARS-CoV-2 N	SARS-CoV-2 Ndeg_P1	50	350	10
	SARS-CoV-2 Ndeg_P2	50		10
	SARS-CoV-2 N-HM_P	50		10
Sonda SARS-CoV-2 nsp12	SARS-CoV-2_Nsp12_P	50	450	10
Sonda IAC	IAC_P	50	450	10
Primery SARS-CoV-2 N	SARS-CoV-2_Ndeg_F	50	300	10
	SARS-CoV-2_Ndeg_R	50		10
	SARS-CoV-2_N-HM_F	50		10
	SARS-CoV-2_N-HM_R	50		10
Primery SARS-CoV-2 nsp12	SARS-CoV-2_Nsp12_F	50	400	10
	SARS-CoV-2_Nsp12_R	50		10
Primery IAC	IAC_F	50	400	10
	IAC_R	50		10

2.4.9.2 Příprava reakční směsi qPCR

Reakční směs lze připravit ve větším objemu dle následující tabulky, její poměrné vzorky lze uskladnit při $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nejdéle 6 měsíců a opakovaně rozmrazovat a zamrazovat, max. však 5×.

Složka	1 reakce (μl)	100 reakcí (μl)	Konečná koncentrace
LightCycler 480 Probes Master 2×	10	1000	1×
Primery SARS-CoV-2 N (10 pmol/μl)	0,7	70	0,35 pmol/μl
Primery SARS-CoV-2 nsp12 (10 pmol/μl)	0,7	70	0,35 pmol/μl
Primery IAC (10 pmol/μl)	0,3	30	0,15 pmol/μl
Sondy SARS-CoV-2 N (10 pmol/μl)	0,2	20	0,1 pmol/μl
Sonda SARS-CoV-2 nsp12 (10 pmol/μl)	0,2	20	0,1 pmol/μl
Sonda IAC (10 pmol/μl)	0,2	20	0,1 pmol/μl
UNG (1 U/μl)	0,2	20	0,01 U/μl
PCR voda	2,5	250	
Celkový objem	15		

2.4.9.3 Postup přípravy qPCR reakce

- Poměrný vzorek reakční směsi nechat samovolně rozpustit a promíchat
- Rozplnit 15 μl reakční směsi do 96-jamkové destičky či jiných, patřičných zkumavek
- Přidat 5 μl cDNA podle následujícího v pořadí: 1) analyzované vzorky (vždy analyzovat v duplikátu), 2) kvantifikační standard, 3) negativní kontrola izolace nukleových kyselin, 4) negativní kontrola RT, 5) negativní kontrola qPCR
- Přelepit 96-jamkové destičku speciální krycí fólií či zavřít patřičné zkumavky
- Odstředit při cca 2 000 g/2 min
- Vložit 96-jamkovou destičku/zkumavky do přístroje (např. LightCycler 480) a spustit program dle následujícího protokolu qPCR

2.4.9.4 Protokol qPCR (nastavení pro LightCycler 480, Roche)

Krok qPCR		Teplota/čas	Ramp Rate	Aquisition mode
Úvodní denaturace		95 °C/10 min	4,4° C/s	
Denaturace	45 cyklů	95 °C/10 s	4,4 °C/s	
Annealing		55 °C/30 s	2,2 °C/s	Single
Extenze		72 °C/10 s		
Chlazení		40 °C/10 s	2,2 °C/s	

Analysis mode: Quantification

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe

3 Výpočet a vyjádření výsledku

3.1 Hodnocení výstupu

3.1.1 Kvalitativní hodnocení

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky:

Fluorescence SARS-CoV-2 (Kanál FAM nebo HEX)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
Pozitivní	Pozitivní	RNA SARS-CoV-2 pozitivní*
Pozitivní	Negativní	RNA SARS-CoV-2 pozitivní*
Negativní	Pozitivní	RNA SARS-CoV-2 negativní
Negativní	Negativní	Inhibice RT-qPCR

Pokud je vzorek inhibován, je nutné izolovanou RNA 5× a 10× naředit, případně zopakovat izolaci nukleových kyselin z uskladněného poměrného vzorku.

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je pozitivní alespoň v jednom opakování.

IAC – interní amplifikační kontrola.

*Pokud jsou hodnoty $C_q > 40$ vzorek je považován za negativní.

3.1.2 Kvantitativní hodnocení

Určení množství SARS-CoV-2 se provádí pomocí metody absolutní kvantifikace na základě kalibrační křivky (kanál HEX).

3.1.2.1 Stanovení množství SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v analyzovaném vzorku

Určení množství SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v 500 ml odpadní vody se provádí podle následujícího vzorce:

$$\text{SARS-CoV-2} = ((x / 5) \times y) \times 14,29 \times (100 / \text{účinnost izolace TGEV}^*)$$

x – počet kopií cíle v reakci (stanoveno RT-qPCR)

y – množství, do kterého je eluována izolovaná nukleová kyselina (udáváno v μl), v popsané metodice je tato hodnota 100

* - hodnota účinnosti analytického postupu v % (viz **Příloha č. 2**)

3.1.2.4 Příklad výpočtu množství SARS-CoV-2 ve vzorku odpadní vody (stanovení virové nálože)

Dle RT-qPCR metody absolutní kvantifikace na základě kalibrační křivky bylo ve vzorku odpadní vody stanoveno množství $5,23 \times 10^2$ SARS-CoV-2 a $7,42 \times 10^3$ TGEV. Zakoncentrování vzorku odpadní vody je prováděno ze vstupního množství 500 ml, toto

množství je zredukováno na 2 ml eluátu, ze kterého je do vlastní izolace nukleových kyselin použito 140 µl, eluce izolované nukleové kyseliny je prováděna do 100 µl, do RT-qPCR je dáváno 5 µl nukleové kyseliny. Ke vzorku bylo uměle (jako kontrola izolace analytického postupu) přidáno $5,00 \times 10^6$ částic TGEV (podrobně popsáno viz **Příloha č. 2**).

Stanovení množství TGEV v analyzovaném vzorku

- $TGEV = (x / 5) \times y$
- $TGEV = (7,42 \times 10^3 / 5) \times 100 \times 14,29$
- $TGEV = 2,12 \times 10^6$

Stanovení účinnosti celého analytického postupu

- **účinnost procesu (%) = stanovené množství TGEV ve vzorku / $5 \times 10^6 \times 100$**
- **účinnost procesu (%) = $2,12 \times 10^6 / 5 \times 10^6 \times 100$**
- **účinnost procesu (%) = 42,41 %**

Stanovení genomových ekvivalentů SARS-CoV-2 v 500 ml vzorku odpadní vody

- $SARS-CoV-2 = ((x / 5) \times y) \times 14,29 \times (100 / \text{účinnost izolace TGEV})$
- $SARS-CoV-2 = ((5,23 \times 10^2 / 5) \times 100) \times 14,29 (100 / 42,41)$
- $SARS-CoV-2 = 3,52 \times 10^5$

4 Validate

Validace systému RT-qPCR k detekci specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 byla provedena dle doporučení uvedených v Raymaekers et al., 2009.

4.1 Specifita

Navržené sekvence, cílových virových agens byly porovnány pomocí algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Všechny uvedené oligonukleotidy mají 100% homologii se specifickými oblastmi genomu SARS-CoV-2 či uvedených kontrol (humánních adenovirů, TGEV, IAC). Současně nebyla nalezena žádná křížová reakce s jinými druhy virů či bakterií. Použití hydrolyzačních sond jako druhého specifického oligonukleotidu dodatečně potvrzuje identitu detekčního cíle.

Systém RT-qPCR k detekci specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 byl testován na příbuzných izolátech koronavirů a izolátech způsobujících respirační nemoci u lidí a zvířat: Alphacoronavirus 1 (CAPM V-346, TGEV), Canine coronavirus (CAPM V-485), Avian coronavirus (CAPM V-440), Betacoronavirus 1 (Bovine coronavirus CAPM V 326), Porcine hemagglutinating Encephalomyelitis virus (CAPM V-316), Human adenovirus 2 (CAPM V-

665), Human respiratory syncytial virus (NCPV, Catalogue No. 0012031v), Human rhinovirus (NCPV, Catalogue No 930), Influenza A (NCPV, Catalogue No 878), Influenza B (NCPV, Catalogue No 797). Viry byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů (CAPM), případně z National Collection of Pathogenic Viruses (NCPV,UK).

4.2 Optimalizace reakčních podmínek

Optimalizace metodického postupu byla provedena s ohledem na vhodnou citlivost a časovou náročnost a cenovou dostupnost celého procesu analýzy odpadních vod. Koncentrace jednotlivých primerů a sond byla zvolena tak, aby poskytovala co nejnižší hodnoty C_q , nejvyšší hodnoty ΔR_n a nedocházelo k amplifikaci jednoho cíle na úkor druhého. Koncentrace IAC byla optimalizována tak, aby byly přednostně amplifikovány a detekovány cílové sekvence. Tvorba primer-dimerů a nespecifických produktů byla zkontrolována pomocí meltingové analýzy. Výsledné produkty byly ověřeny sekvenováním.

4.3 Charakteristika metodického postupu a systému RT-qPCR k detekci specifických oblastí genomu SARS-CoV-2

Analytické meze byly stanoveny podle Bustin et al., 2009.

4.3.1 Citlivost/limit detekce (LOD), opakovatelnost a účinnost metodického postupu

Limit detekce (LOD) je určen jako nejnižší koncentrace analytu, kterou lze pomocí dané metodiky detekovat s 95% mírou pravděpodobnosti.

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

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

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

^c Směrodatná odchylka.

LOD celého metodického postupu byl určen na 1 250 virových částic (resp. genomových ekvivalentů) v celkovém objemu 500 ml odpadní vody, tzn. 2,5 virových částic (resp. genomových ekvivalentů) v 1 ml odpadní vody. Účinnost metodického postupu byla stanovena při umělé kontaminaci vzorku odpadní vody 5 000 000 virovými částicemi (kvantifikace dle RT-qPCR) na 59,43 %.

4.3.2 Kruhový test

Vzorky na kruhový test byly připraveny Laboratoří hygieny půdy a odpadů, Státní zdravotní ústav Praha, jejíž pracovníci následně provedli hodnocení výsledků kruhového testu.

Vzorky odpadních vod byly uměle kontaminovány definovaným množstvím SARS-CoV-2 a v chlazeném stavu týž den transportovány do zúčastněných laboratoří. V laboratoři Virologie potravin a prostředí (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i) byly uměle kontaminované vzorky analyzovány dle výše uvedeného postupu. Druhými účastníky kruhového testu byly Zkušební laboratoře Ústavu biochemie a mikrobiologie (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; VŠCHT). Tyto laboratoře použily k analýzám vzorků jejich vlastní standardní operační postupy (SOP).

Z hodnocení kruhového testu je patrné, že výsledky analýz, které byly provedeny výše uvedenou metodikou, dosahují vyhovujícího z-skóre: $|z| \leq 2$ a poskytují podobné výsledky se SOP VŠCHT (viz **Příloha č. 3, Zpráva k MPZ detekce SARS-CoV-2 v odpadních vodách**).

5 Operativní řízení jakosti

Je řešeno:

- 1) pomocí systému pozitivních a negativních kontrol
- 2) kontrolou řádnosti odběru a transportu analyzovaných vzorků
- 3) kontrolou procesu zpracování vzorků
- 4) interní amplifikační kontrolou (IAC)

III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tento metodický postup je inovativní v kombinaci systému použitých kontrol odběru vzorků odpadních vod, procesu zpracování těchto vzorků a tří nezávislých detekčních cílů v genomu viru SARS-CoV-2. Popsaným přístupem je ověřen celý proces analýzy vzorků, od jejich odběru až po samotnou detekci cílových agens. Zavedení IAC současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledky v důsledku přítomných inhibitorů RT-qPCR reakce. Tento postup tak umožňuje spolehlivou a validní analýzu každého jednoho vzorku odpadní vody a následující kvantifikaci SARS-CoV-2 (resp. genomových ekvivalentů) v něm.

Předložená metodika byla vyvinuta s ohledem na požadavky MZ ČR a umožňuje komplexní přístup ke stanovení možné přítomnosti specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 ve vzorcích odpadních vod a jejich následující kvantifikaci.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena k rychlé detekci a kvantifikaci specifických oblastí genomu SARS-CoV-2 v definovaném objemu vzorku odpadní vody. Uplatnění postupu je cíleno na použití

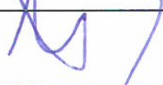
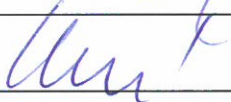
v systému včasného varování nástupu epidemie a sledování výskytu SARS-CoV-2 v populaci ČR nebo v monitorované lokalitě.

V) SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Bustin et al. CoV2-ID, a MIQE-compliant sub-20-min 5-plex RT-PCR assay targeting SARS-CoV-2 for the diagnosis of COVID-19. *Sci Rep*, 2020; 10: 22214.
- Bustin et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*, 2009, 55, 611-622.
- Farkas et al. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Research*, 2020, 181, 115926
- ISO 15216-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification.
- ISO 15216-2:2019. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection
- Mlejnkova et al. Preliminary Study of Sars-Cov-2 Occurrence in Wastewater in the Czech Republic. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(15), 5508.
- O'Brien et al. A water-focused one-health approach for early detection and prevention of viral outbreaks. *One Health*, 2019, 7, 100094.
- Raymaekers et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal*, 2009, 23, 145-151.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3, (1998), http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

PROTOKOL O SCHVÁLENÍ (CERTIFIKACI) METODIKY

Číslo jednací	sp. zn. MZDR 799/2022/OVZ
Číslo nebo jiné označení udělené certifikace přidělené vnějším certifikačním / akreditačním orgánem (pokud bylo přiděleno)	—
Název metodiky	Metodický postup analýzy odpadních vod na přítomnost specifických oblastí genomu viru SARS-CoV-2
Interní identifikační označení metodiky	
Místo uložení metodiky	VÚV TGM, v. v. i., Podbabská 30/2582, 160 00 Praha 6 (knihovna, hl. řešitel) VÚVeL, v. v. i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno (knihovna, řešitel) Ministerstvo zdravotnictví České republiky, Palackého náměstí 375/4, 128 01 Praha 2 (odborný garant)
Ekonomické parametry metodiky (ekonomické parametry charakterizující metodiku - např. roční zvýšení objemu výroby, zisku, export atd., resp. komentář k ekonomickým aspektům metodiky)	—
Orgán státní správy/certifikační / akreditační orgán, který metodiku schválil a doporučil pro využití v praxi - úplný název a sídlo (případně stát)	Ministerstvo zdravotnictví České republiky, Palackého náměstí 375/4, 128 01 Praha 2
Datum schválení (certifikace / akreditace) metodiky (datum, kdy bylo vydáno osvědčení o schválení metodiky resp. rozhodnutí o certifikaci / akreditaci metodiky)	
Identifikace dvou nezávislých oponentních posudků (datum zpracování, zpracovatel)	
Popis metodiky v českém jazyce	Cílem metodiky je zajistit validní analýzu každého jednoho vzorku odpadní vody na přítomnost specifických oblastí genomu původce onemocnění COVID-19, viru SARS-CoV-2, s použitím RT-qPCR a následující kvantifikaci virové nálože (resp. genomových ekvivalentů) v definovaném objemu vzorku.
Popis metodiky v anglickém jazyce	The aim of this methodology is to ensure a valid analysis of each wastewater sample for the presence of specific regions of the genome of the COVID-19 pathogen, SARS-CoV-2 virus, using RT-qPCR and subsequent quantification of viral load (or genome equivalents) in a defined sample volume.
Uživatel metodiky (název, adresa, jméno pracovníka, e-mail, telefon)	Ministerstvo zdravotnictví České republiky, Palackého náměstí 375/4, 128 01 Praha 2 Mgr. Zuzana Brotánková, zuzana.brotankova@mzcr.cz , +420 224 972 905

	Mgr. Ondřej Fries, ondrej.fries@mzcr.cz , +420 224 972 952	
Datum uzavření smlouvy o využití výsledku s uživatelem metodiky	-	
Odborný garant - podpis / datum		
Vedoucí oddělení - podpis / datum Mgr. Ondřej Fries, 11. 1. 2022		
Ředitel odboru - podpis / datum MUDr. Jan Marounek, MBA, 11. 1. 2022		
Náměstek sekce - podpis / datum MUDr. Pavla Svrčinová, Ph.D., 11. 1. 2022		



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

Centrum laboratorních činností
Laboratoř hygieny půdy a odpadů
Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
tel.: 267082456
E-mail: ladislava.mateju@szu.cz

Zpráva k MPZ detekce SARS-CoV-2 v odpadních vodách

Zadavatel: Název zadavatele: SZÚ
Kontaktní osoba: Ing. Ladislava Matějů
Adresa: Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
IČO: - tel./fax.: 267 082 456

Náše číslo. jednací:	-
Vaše číslo. jednací:	123I7034
Expertizní číslo:	-
Datum vydání:	9. 8. 2021

Zpráva obsahuje výsledky mezilaboratorního porovnávání množství virových částic SARS-CoV-2 v uměle spikovaných vzorcích odpadní vody ze dne 19. 7. 2021. Vzorky byly uměle kontaminovány dne 19. 7. 2021 a týž den byly dodány do zúčastněných laboratoří k analýzám.

Popis vzorků dodaných k analýzám:

MP1 BrA, umělá kontaminace 20 μ l Br (britská mutace) do 500 ml odpadní vody
MP2 BrB, umělá kontaminace 2 μ l Br (britská mutace) do 500 ml odpadní vody
MP3 BrC, umělá kontaminace 0,2 μ l Br (britská mutace) do 500 ml odpadní vody
MP4 SmA, umělá kontaminace 20 μ l směsi mutací do 500 ml odpadní vody
MP5 SmB, umělá kontaminace 2 μ l směsi mutací do 500 ml odpadní vody
MP6 SmC, umělá kontaminace 0,2 μ l směsi mutací do 500 ml odpadní vody
MP7 nátok do ČOV ze dne 16. 7. 2021
MP8 voda z vodovodu

Výsledky analýz počtu virových částic v 500 ml:

Zkouška	Výsledek (počet virových částic v 500 ml)			Medián naměřených hodnot	σ	z-skóre		
	VÚVeL SOP 108/A	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.1	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.2			VÚVeL SOP 108/A	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.1	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.2
MP1	2,92E+06	3,30E+06	2,77E+06	2,92E+06	2,75E+05	0,00	1,40	0,54
MP2	2,25E+05	3,31E+05	3,07E+05	3,07E+05	5,55E+04	1,48	0,42	0,00
MP3	4,73E+04	1,07E+04	8,94E+03	1,07E+04	2,16E+04	1,69	0,00	0,08
MP4	1,29E+06	1,38E+06	1,29E+06	1,29E+06	5,17E+04	0,00	1,69	0,08
MP5	1,71E+05	7,63E+04	4,13E+04	7,63E+04	6,71E+04	1,41	0,00	0,52
MP6	1,08E+04	8,25E+03	3,35E+03	8,25E+03	3,79E+03	0,67	0,00	1,29
MP7	9,21E+02	0,00E+00	9,35E+02	9,21E+02	5,36E+02	0,00	1,72	0,03
MP8	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00	0,00	0,00



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

Centrum laboratorních činností
Laboratoř hygieny půdy a odpadů
Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
tel.: 267082456
E-mail: ladislava.mateju@szu.cz

Zpráva k MPZ detekce SARS-CoV-2 v odpadních vodách

Výsledky analýz počtu virových částic v 1 ml:

Zkouška	Výsledek (počet virových částic v 1 ml)			Medián naměřených hodnot	σ	z-skóre		
	VÚVeL SOP 108/A	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.1	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.2			VÚVeL SOP 108/A	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.1	VŠCHT SOP 5/ protokol 8.2
MP1	5,84E+03	6,61E+03	5,54E+03	5,84E+03	5,50E+02	0,00	1,40	0,54
MP2	4,49E+02	6,61E+02	6,15E+02	6,15E+02	1,12E+02	1,49	0,41	0,00
MP3	9,46E+01	2,10E+01	1,80E+01	2,10E+01	4,34E+01	1,70	0,00	0,07
MP4	2,57E+03	2,76E+03	2,57E+03	2,57E+03	1,06E+02	0,02	1,72	0,00
MP5	3,41E+02	1,53E+02	8,30E+01	1,53E+02	1,33E+02	1,41	0,00	0,52
MP6	2,17E+01	1,70E+01	7,00E+00	1,70E+01	7,51E+00	0,63	0,00	1,33
MP7	1,84E+00	0,00E+00	2,00E+00	1,84E+00	1,11E+00	0,00	1,66	0,14
MP8	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00	0,00	0,00

Výpočet z-skóre podle rovnice $z = \frac{|x_i - x^*|}{\sigma}$, kde
 x_i je naměřená hodnota
 x^* je medián naměřených hodnot
 σ je směrodatná odchylka naměřených hodnot

Hodnocení:

$|z| \leq 2$ vyhovující

$2 < |z| < 3$ sporný

$|z| \geq 3$ nevyhovující.

Všechny výsledky analýz dosahují vyhovujícího z-skóre.

Vypracovala: Ing. Ladislava Matějů, Ing. Marta Kořínková

Konec zprávy.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz