

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του φορτίου SARS-CoV-2 στα αστικά λύματα της Θεσσαλονίκης ως δείκτης του επιπέδου διασποράς του ιού στον πληθυσμό της πόλης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ ΕΡΓΟΥ

Νικόλαος Γ. Παπαϊωάννου,
Πρύτανης ΑΠΘ



ΜΕΛΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΟΜΑΔΑΣ

Τμήμα Χημείας:
Θεόδωρος Καραπάντσιος
Μαργαρίτης Κώστογλου
Ουρανία Οικονομίδου

Τμήμα Κτηνιατρικής:
Χρυσόστομος Δόβας
Σεραφεΐμ Χαϊντούτης
Ταξιάρχης Χασαλεύρης
Ευαγγελία Μούτου

Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών:
Μαρία Πεταλά
Βασίλειος Τσιρίδης
Φωτεινή Σακαβέλη
Χριστίνα Μπέτα

Τμήμα Ιατρικής:
Εμμανουήλ Ροηλίδης
Άννα Παπά
Συμεών Μεταλλίδης

Τμήμα Μηχανικών
Χωροταξίας και Ανάπτυξης:
Ευστράτιος Στυλιανίδης

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΡΘΡΟΥ

01



Ερευνητές στο Εργαστήριο Τεχνικής και Σχεδιασμού Περιβάλλοντος του τμήματος Πολιτικών Μηχανικών ΑΠΘ στο οποίο γίνεται η προεπεξεργασία και ο αρχικός χαρακτηρισμός των δειγμάτων λυμάτων της Θεσσαλονίκης

AUTH

RC 19

Research

Covid-19

Εισαγωγικά στοιχεία

Η ανακήρυξη —από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), στις 11 Μαρτίου 2020— της νόσου COVID-19 (που προκαλείται από τον ιό SARS-CoV-2) σε πανδημία κατέδειξε την επείγουσα ανάγκη για την πλήρη εκτίμηση, αξιολόγηση και κατανόηση της ιογενούς αυτής λοίμωξης.

Οι πρώτες περιπτώσεις λοιμώξεων SARS-CoV-2 καταγράφηκαν στην πόλη Wuhan της Κίνας, στα τέλη του 2019. Λίγο αργότερα, οι γενετικές αναλύσεις αποκάλυψαν πως ο ιός αυτός είναι μέλος της οικογένειας Coronaviridae (κορωνοϊών), η οποία περιλαμβάνει RNA ιούς, ως επί το πλείστον παθογόνους για τα ζώα αλλά και τον άνθρωπο.

Αν και σε γενικές γραμμές η λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 χαρακτηρίζεται ως ήπια, τα ιδιαίτερος υψηλά επίπεδα μεταδοτικότητας του ιού προκαλούν ανησυχία. Μέχρι τη στιγμή που γράφονταν αυτές οι γραμμές ο ιός SARS-CoV-2 είχε μολύνει πάνω 177 εκατομμύρια ανθρώπους σε ολόκληρο τον κόσμο και είχε προκαλέσει πάνω από 3,8 εκατομμύρια θανάτους, τη στιγμή που το 2002 ο ιός SARS-CoV-1 μόλυνε περίπου 8.000 άτομα και προκάλεσε λιγότερους από 900 θανάτους παγκοσμίως (Liu et al., 2020). Έτσι, η ανάγκη για την άμεση παρακολούθηση της εξάπλωσης του ιού SARS-CoV-2 στον παγκόσμιο πληθυσμό, με όλα τα διαθέσιμα εργαλεία, υπήρξε επιτακτική.

Στην Ελλάδα, το πρώτο επιβεβαιωμένο κρούσμα COVID-19 καταγράφηκε στην πόλη της Θεσσαλονίκης στις 26 Φεβρουαρίου 2020. Έκτοτε ο κρατικός μηχανισμός κλήθηκε να αντιμετωπίσει κύματα της πανδημίας με διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά το καθένα, με όπλα την ενίσχυση των δομών και προσωπικού του ΕΣΥ, καθώς και την εφαρμογή μέτρων προστασίας της δημόσιας υγείας και αυστηρών και μεγάλων σε χρονική διάρκεια περιορισμών σε κοινωνικές και οικονομικές δραστηριότητες. Έως τώρα, έχουν καταγραφεί πάνω από 416.000 κρούσματα του ιού στη χώρα, με τους θανάτους να ξεπερνούν τους 12.400.

Η ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού SARS-CoV-2 στα αστικά λύματα, ως μια εναλλακτική μέθοδος για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πανδημίας στον πληθυσμό

Η πλέον καθιερωμένη πρακτική για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πανδημίας παγκοσμίως είναι η διενέργεια ατομικών μοριακών ελέγχων στον πληθυσμό και η περιγραφή της υπάρχουσας κλινικής εικόνας από τον συνδυασμό του αριθμού κρουσμάτων ανά συνολικό αριθμό μοριακών ελέγχων, με τους αντίστοιχους αριθμούς εισαγωγών στις ΜΕΘ και θανάτων. Πέραν αυτής, όμως, στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία καταγράφονται ερευνητικά εγχειρήματα για την παρακολούθηση της διάδοσης του ιού σε μεγάλους πληθυσμούς μέσω της ανίχνευσης του γενετικού υλικού του ιού SARS-CoV-2 στα αστικά λύματα μεγάλων πόλεων (Ahmed et al., 2020; La Rosa et al., 2020; Lodder and de Roda Husman, 2020; Medema et al., 2020b; Randazzo et al., 2020; Rimoldi et al., 2020). Αρχικά, ανιχνεύτηκε μεγάλη αφθονία αντιγράφων του γενετικού υλικού του SARS-CoV-2 στα λύματα που προέρχονταν από τις τουαλέτες νοσοκομείου στη Wuhan (Liu Yuan et al., 2020). Η μελέτη των Medema et al., (2020a) αναφέρει την παρουσία γενετικού υλικού SARS-CoV-2 στα λύματα του αεροδρομίου Schiphol του Άμστερνταμ, στο Tilburg και στην εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων στο Kaatsheuvel στην Ολλανδία, όπου και εντοπίστηκε το πρώτο επιβεβαιωμένο κρούσμα COVID-19 στη χώρα (Medema et al., 2020b). Ακολούθησαν αρκετές εργασίες με αντικείμενο την ανίχνευση του ιού στα λύματα μιας περιοχής και τις δυνατότητες αξιολόγησης των πληροφοριών που λαμβάνονται από τέτοιου είδους αναλύσεις.

Στα αποχετευτικά δίκτυα των πόλεων καταλήγουν ανθρωπογενή απόβλητα, όπως ούρα, σάλιο, ιδρώτας, αίμα, αναπνευστικές εκκρίσεις, απόνερα από το πλύσιμο του σώματος και των ρούχων, περιττώματα, ακαθαρσίες κ.λπ. Όλα τα παραπάνω περιέχουν ανθρώπινο βιολογικό υλικό, στο οποίο εντοπίζεται και το γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2, από κατοίκους που είτε νοσούν είτε είναι ασυμπτωματικοί φορείς του ιού. Με βάση την πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία τα λύματα δεν αναμένεται να περιέχουν λοιμογόνα σωματίδια του ιού (ισωμάτια) αλλά υπολείμματά του, που είναι μεν μη μολυσματικά και, συνεπώς, μη ικανά να συμμετέχουν στη μετάδοση της νόσου, αποτελούν, όμως, ικανά στοιχεία ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού ιικού φορτίου. Έτσι, ενώ το περίβλημα του κορωνοϊού αποδομείται—σε επαφή με τα οξέα του στομάχου, τα απορρυπαντικά και τους διαλύτες στα αποχετευτικά δίκτυα— με αποτέλεσμα ο ιός να αδρανοποιείται αναφορικά με τη μετάδοσή του, το ιικό γονιδίωμα παραμένει ανιχνεύσιμο στα αστικά λύματα (Foladori et al., 2020).

Το μετρούμενο ιικό φορτίο σε δείγματα αστικών λυμάτων προέρχεται από τις βιολογικές εκκρίσεις των ασθενών με κορωνοϊό αλλά και των ασυμπτωματικών φορέων του ιού που καταλήγουν στο αποχετευτικό δίκτυο. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης των δειγμάτων προκύπτει μέσα σε λίγες ώρες μετά τη δειγματοληψία. Συνεπώς, η μέτρηση της συγκέντρωσης του γονιδιώματος του ιού στα λύματα δικαίως θεωρείται ένας εμπειρικός, ποσοτικός δείκτης του επιπέδου διασποράς του ιού σε ολόκληρη την κοινότητα και σε σχεδόν πραγματικό χρόνο. Αντιθέτως, οι ενδείξεις των μοριακών

ελέγχων κορωνοϊού που πραγματοποιούνται σε ατομικό επίπεδο προσφέρουν μόνο ένα μέρος της συνολικής επιδημιολογικής εικόνας, καθώς αντιπροσωπεύουν κατά κύριο λόγο τους ασθενείς που νοσούν και υποβάλλονται σε εργαστηριακή επιβεβαίωση (παρά το σημαντικό οικονομικό κόστος), καθώς και τους ασυμπτωματικούς φορείς του ιού που ήρθαν σε επαφή με επιβεβαιωμένο κρούσμα και αποφασίζουν, έτσι, να ελεγχθούν. Ένα μικρό ποσοστό των ημερήσιων θετικών κρουσμάτων προέρχεται από ελέγχους που διενεργούνται στοχευμένα στο προσωπικό μεγάλων εταιριών, εργοστασίων, αεροδρομίων κ.λπ. ή σε κάποια πιθανή εστία μετάδοσης κορωνοϊού, όπως γηροκομεία, δομές φιλοξενίας προσφύγων και άλλα. Σύμφωνα με δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες, ο αριθμός των ασυμπτωματικών φορέων του ιού είναι μέχρι και δεκάδες φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των ασθενών που εκδηλώνουν συμπτώματα (Havers et al., 2020; Saththasivam et al., 2021). Αν συνυπολογίσει κανείς πως η συχνότητα διενέργειας μοριακών ελέγχων ποικίλει και χρονικά (λιγότερα τεστ τα Σαββατοκύριακα) αλλά και γεωγραφικά (περισσότερα τεστ σε περιοχές με πιο ευκατάστατο πληθυσμό), καθώς επίσης πως ο μοριακός έλεγχος μας δίνει την κλινική εικόνα των ασθενών ετεροχρονισμένα (οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα περίπου 5-7 ημέρες αφότου μολυνθούν), είναι φανερό πως τα μοριακά τεστ από μόνα τους δε δύνανται να αποτυπώσουν τη συνολική εικόνα της διασποράς του ιού στον πληθυσμό.

Οι μετρήσεις του ιού στα λύματα δεν υποκαθιστούν την επιτήρηση με βάση τους μοριακούς ελέγχους στην κοινότητα. Η γνώση της συγκέντρωσης του ιού στα λύματα αποτελεί σημαντικό όπλο έγκαιρης διάγνωσης για την αντιμετώπιση της πανδημίας, το οποίο δρα συμπληρωματικά με αυτό των μοριακών ελέγχων και της εκτίμησης των εισαγωγών στα νοσοκομεία. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ανάλογα με τη νοοτροπία ενός πληθυσμού απέναντι σε ιατρικά προβλήματα και σε συνάρτηση με τις διαθέσιμες ιατρικές και εργαστηριακές υποδομές, τα λύματα μπορούν να δώσουν πληροφορία από 2 έως και 15 ημέρες νωρίτερα από την επιδημιολογική επιτήρηση που αφορά τα κρούσματα COVID-19, και ακόμη νωρίτερα σε σχέση με τις εισαγωγές στα νοσοκομεία, εισαγωγές στις ΜΕΘ και τους ημερήσιους θανάτους (D'Aoust et al., 2021; Nemudryi et al., 2020; Róka et al., 2021; Wurtzer et al., 2020). Ο χρόνος αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς με την έγκαιρη λήψη των κατάλληλων μέτρων από την Πολιτεία μπορεί να προληφθεί μια πιθανή έξαρση της διασποράς του ιού, πριν υπάρξει αύξηση των κρουσμάτων.

Η ερευνητική συνεργασία ΑΠΘ-ΕΥΑΘ για τη μέτρηση του ιικού φορτίου SARS-CoV-2 στα αστικά λύματα της Θεσσαλονίκης

Τον Μάρτιο 2020 συγκροτήθηκε υπό τον συντονισμό του Πρύτανη ΑΠΘ, καθ. Ν. Παπαϊωάννου, η Ομάδα Επιδημιολογίας Λυμάτων του ΑΠΘ με επιστήμονες διαφόρων ειδικοτήτων και σκοπό την ανάπτυξη μιας ολιστικής διαδικασίας για την ανίχνευση της παρουσίας του κορωνοϊού αλλά και την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου στα αστικά υγρά απόβλητα της Θεσσαλονίκης. Αντίθετα με τη συνήθη πρακτική να γίνονται αναλύσεις από μεμονωμένα εργαστήρια για την ανίχνευση του ιού στα λύματα,

η ομάδα του ΑΠΘ καινοτόμησε με την οριζόντια διεπιστημονική προσέγγιση του προβλήματος. Έτσι, εκτός από τους μοριακούς βιολόγους και ιολόγους για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του ιού, ιατρική ομάδα λοιμωξιολόγων συνδράμει στην κλινική συσχέτιση και αποτίμηση των μετρήσεων. Επιπλέον, υπάρχει ομάδα μηχανικών τεχνικής περιβάλλοντος για την αρχική επεξεργασία των δειγμάτων και πραγματοποίηση σειράς μετρήσεων περιβαλλοντικών παραμέτρων, καθώς και ομάδα χημικών για την πραγματοποίηση χημικών αναλύσεων με σκοπό να εκτιμηθούν πιθανές παρεμποδίσεις ή αλλοιώσεις στην ανιχνεύσιμη ποσότητα του ιού από άλλα διαλυμένα ή διεσπαρμένα υλικά στα λύματα. Επιπρόσθετα, την ομάδα συμπληρώνουν συνάδελφοι ειδικοί στην ανάπτυξη θεωρητικών φυσικοχημικών μοντέλων για τον εξορθολογισμό των μετρήσεων με βάση τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των λυμάτων. Την ομάδα επιδημιολογίας λυμάτων του ΑΠΘ στελέχωσαν κατά διαστήματα επιστήμονες από διαφορετικά εργαστήρια και κλινικές των Τμημάτων Ιατρικής (Ε. Ροηλίδης, Α. Παπά, Σ. Μεταλλίδης), Χημείας (Θ. Καραπάντσιος, Μ. Κώστογλου), Κτηνιατρικής (Ν. Παπαϊωάννου, Χ. Δόβας), Πολιτικών Μηχανικών (Μ. Πεταλά), Φαρμακευτικής (Θ. Σκλαβιάδης), Βιολογίας (Μ. Αρσενάκης, Δ. Ντάφου), και Μηχανικών Χωροταξίας και Ανάπτυξης (Σ. Στυλιανίδης) του ΑΠΘ.

Η ομάδα του ΑΠΘ πρόσφερε σε άμεση χρήση διαθέσιμο επιστημονικό εξοπλισμό και τεχνογνωσία, προμηθεύτηκε τα απαραίτητα βιολογικά και χημικά αναλώσιμα και διέθεσε τον χρόνο από έναν σημαντικό αριθμό εξειδικευμένων ερευνητών και επιστημόνων για τις αναλύσεις των αστικών λυμάτων της Θεσσαλονίκης. Δεδομένου ότι στην αρχή της πανδημίας μοναδικό μέσο για την παρακολούθηση της διασποράς του ιού στον πληθυσμό ήταν η διενέργεια των υψηλού κόστους μοριακών τεστ (RT-PCR), στόχος της έρευνας ήταν η δυνατότητα συμπληρωματικής παρακολούθησης της διασποράς του ιού με έναν τρόπο ανεξάρτητο της συχνότητας προσέλευσης των πολιτών για έλεγχο, ώστε να υπάρχει μια πιο ρεαλιστική εικόνα της συνολικής επιδημιολογικής κατάστασης στην πόλη. Όπως εξηγεί ο πρύτανης του ΑΠΘ καθηγητής Νίκος Παπαϊωάννου: «Πρόκειται για ένα εργαλείο περιβαλλοντικής επιτήρησης και έγκαιρης διάγνωσης της διασποράς του ιού που τέθηκε στη διάθεση της Πολιτείας, ώστε να της παρέχει μία αξιόπιστη και σε πραγματικό χρόνο εικόνα για την επιδημιολογική κατάσταση και τις τάσεις που διαμορφώνονται. Κοινωνοί των αποτελεσμάτων γίνονται τόσο ο ΕΟΔΥ όσο και η επιστημονική επιτροπή που έχει συστήσει το υπουργείο Υγείας.»

Η προσπάθεια δεν θα μπορούσε να υλοποιηθεί χωρίς τη συνεργασία του ΑΠΘ με την Εταιρεία Ύδρευσης και Αποχέτευσης Θεσσαλονίκης (ΕΥΑΘ). Η συμβολή της ΕΥΑΘ στην παρούσα έρευνα ήταν καθοριστικής σημασίας, καθώς αφενός διεκπεραιώνει τη δειγματοληψία των λυμάτων και αφετέρου διαθέτει εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό για τον ποιοτικό τους χαρακτηρισμό. Η ΕΥΑΘ Α.Ε. διαθέτει ένα αξιόλογο τμήμα έρευνας, που εδώ και χρόνια δραστηριοποιείται σε μία σειρά ευρωπαϊκών και εθνικών ερευνητικών προγραμμάτων, σε ό,τι αφορά στον έλεγχο ποιότητας του νερού και τη διαχείριση των λυμάτων. Ο Πρόεδρος της ΕΥΑΘ Α.Ε. και καθηγητής στο Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών ΑΠΘ κος Άγις Παπαδόπουλος υπογραμμίζει τη σημασία αυτής της συνεργασίας: «Η προστασία των κατοίκων του πολεοδομικού συγκροτήματος της Θεσσαλονίκης αποτελεί πρωταρχική ευθύνη της εταιρίας. Η ποιότητα των λυμάτων

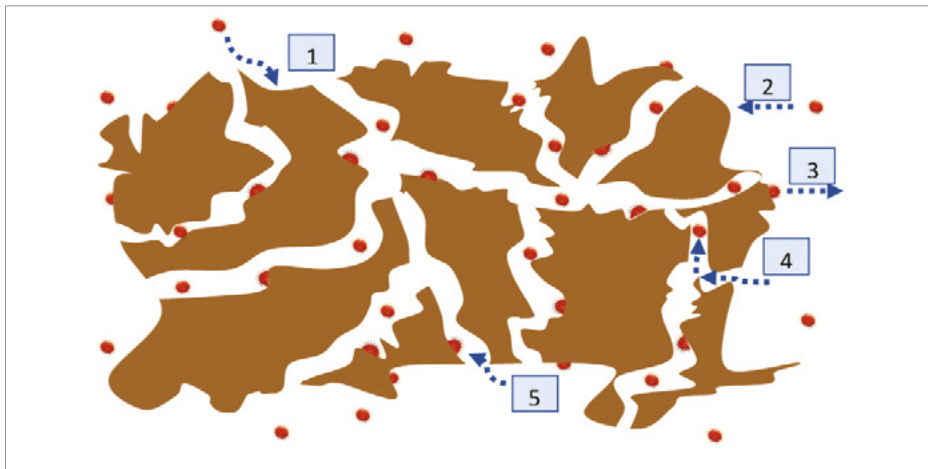
επηρεάζει τη λειτουργικότητα των εγκαταστάσεων επεξεργασίας του βιολογικού καθαρισμού και, συνεπώς, την ποιότητα του νερού που καταλήγει στον Θερμαϊκό κόλπο».

Το πρόβλημα αξιοπιστίας στις ποσοτικές μετρήσεις ιικού φορτίου στα λύματα

Είναι γνωστό στη διεθνή βιβλιογραφία ότι η αξιοπιστία των ποσοτικών μετρήσεων ιικού φορτίου στα λύματα επηρεάζεται από τη μεταβλητότητα της ποιότητας των λυμάτων. Σε αντίθεση με τις ανθρώπινες εκκρίσεις που έχουν αρκετά παρόμοια σύσταση, τα λύματα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από ημέρα σε ημέρα, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Για παράδειγμα, η ποσότητα και η κατανομή μεγέθους των αιωρούμενων στερεών σωματιδίων που βρίσκονται σε διασπορά μέσα στα λύματα αλλά και το οργανικό φορτίο των λυμάτων μπορεί να εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με την προέλευση, τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες, τις καιρικές συνθήκες (βροχές, θερμοκρασία κ.λπ.) και, επιπλέον, επηρεάζονται σημαντικά από προβλήματα που εμφανίζονται στα δίκτυα απορροής και αποχέτευσης, όπως διαρροές και υπερχειλίσσεις.

Τα θραύσματα του ιού που βρίσκονται διεσπαρμένα στα λύματα έχουν διαστάσεις της τάξης των δεκάδων νανομέτρων. Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή επιφανειακή ενεργότητα (καθοριστικής σημασίας ιδιότητα για την επιβίωση και εξάπλωση του ιού) και αλληλεπιδρούν έντονα με το περιβάλλον τους. Εξαιτίας αυτών των δυο ιδιοτήτων, τα θραύσματα του ιού διεισδύουν και προσροφώνται με ευκολία στα πορώδη στερεά υλικά (κόπρانا, φερτές ύλες κ.λπ.) που βρίσκονται διεσπαρμένα σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα λύματα (Εικ. 1), με αποτέλεσμα μεγάλο μέρος του ιικού φορτίου στα λύματα να μην είναι μετρήσιμο από τις υπάρχουσες μεθόδους (τεχνολογία RT-qPCR) παρά τα βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα ανάκτησης που χρησιμοποιούνται κατά την προετοιμασία των δειγμάτων (Ahmed et al., 2020; La Rosa et al., 2020; Randazzo et al., 2020).

Επιπλέον, τα λύματα εμπεριέχουν οργανικό φορτίο, διαλυμένες ή διεσπαρμένες χημικές ενώσεις, που είτε λειτουργούν ανταγωνιστικά είτε συνεργιστικά με τα θραύ-



Εικ. 1. Σχηματική αναπαράσταση πιθανών μηχανισμών αλληλεπίδρασης σωματιδίων ιού με τα πορώδη αιωρούμενα στερεά σωματίδια που περιέχονται στα λύματα. 1: μεταφορά μάζας (μεταφορά και διάχυση) από την υγρή φάση των λυμάτων, 2: προσρόφηση, 3: εκρόφηση, 4: διάχυση πόρων και 5: διάχυση επιφανείας.

σματα του ιού, ως προς την κατάληψη των θέσεων προσρόφησης στην επιφάνεια των στερεών υλικών. Άλλα χαρακτηριστικά των λυμάτων, όπως το διαλυμένο οξυγόνο, η αλατότητα, η παρουσία τασενεργών ουσιών κ.λπ. μπορούν όχι μόνο να επηρεάσουν την προσρόφηση, αλλά και να υπαγορεύσουν παράπλευρες βιοχημικές δράσεις, οι οποίες με τη σειρά τους αλλοιώνουν το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα ισοσμάτια εντός των λυμάτων. Η παροχή και το φορτίο των στερεών σωματιδίων στα λύματα, η περιεκτικότητα των λυμάτων σε οργανικό φορτίο αλλά και χαρακτηριστικά, όπως το διαλυμένο οξυγόνο και η αλατότητα των λυμάτων, εμφανίζουν έντονη μεταβλητότητα στον χρόνο. Συνεπώς, για τον ορθό υπολογισμό της συγκέντρωσης του ιικού φορτίου στα λύματα απαιτείται ο εξορθολογισμός των μετρήσεων ιικού φορτίου συνεκτιμώντας όλα τα παραπάνω μεταβλητά χαρακτηριστικά. Διαφορετικά, οι μετρήσεις εμπεριέχουν σημαντικό σφάλμα και δεν είναι αξιόπιστες για επιδημιολογική επιτήρηση στα λύματα.

Οι διαφορετικοί και αλληλοεξαρτώμενοι βαθμοί ελευθερίας που υπάρχουν στο πρόβλημα της προσρόφησης του ιού στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια εξηγούν την αδυναμία των έως τώρα ερευνητικών πρακτικών να ποσοτικοποιήσουν με ακρίβεια τη συγκέντρωση του ιού στα αστικά λύματα. Τα περισσότερα αποτελέσματα στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται, κυρίως, σε ποιοτικές μετρήσεις ανίχνευσης του ιικού φορτίου (παρουσία/απουσία ιού). Υπάρχουν, ωστόσο, και ερευνητικές προσπάθειες που επιχειρούν την εξαγωγή της αντίστοιχης ποσοτικής πληροφορίας (Ahmed et al., 2020). Δυστυχώς, οι περισσότερες προσπάθειες κάνουν την παραδοχή ότι το ιικό φορτίο δεν αλλοιώνεται μέσα στο αποχετευτικό δίκτυο, αν και σε αρκετές από αυτές σχολιάζεται ποιοτικά η πιθανή επίδραση των χαρακτηριστικών των λυμάτων. Άλλες πάλι εργασίες αναγνωρίζουν την επίδραση των λυμάτων, αλλά υποθέτουν ότι αυτή μένει προσεγγιστικά σταθερή και, επομένως, δεν επηρεάζει τη μεταβλητότητα των μετρήσεων ιικού φορτίου (Saththasivam et al., 2021). Τέλος, υπάρχουν και ορισμένες εργασίες όπου επιχειρείται μια απλοϊκή αναγωγή ποσοτικών μετρήσεων ιικού φορτίου σε αριθμό μολυσμένων ατόμων, χρησιμοποιώντας τα λιγοστά δεδομένα της βιβλιογραφίας αναφορικά με τον ρυθμό έκκρισης ιικού φορτίου από ασθενείς και χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ότι το ιικό φορτίο των ασθενών μπορεί να ποικίλει τάξεις μεγέθους, τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ των ημερών κατά τη διάρκεια της νόσου του ίδιου ασθενή (Hasan et al., 2021; Medema et al., 2020b).

Καινοτομία της ομάδας επιδημιολογίας λυμάτων του ΑΠΘ στην επίτευξη αξιοπιστίας στις ποσοτικές μετρήσεις ιικού φορτίου στα λύματα: Εξορθολογισμός των μετρήσεων με βάση φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λυμάτων

Η ομάδα επιδημιολογίας λυμάτων του ΑΠΘ αντιλήφθηκε ήδη από την άνοιξη 2020 το πρόβλημα αξιοπιστίας των μετρήσεων ιικού φορτίου και την ανάγκη εξορθολογισμού με βάση τα χαρακτηριστικά των λυμάτων. Δυστυχώς, δεν υπήρχε ούτε μια δημοσιευμένη εργασία στη διεθνή βιβλιογραφία, που να πρόσφερε κάποια λύση στο πρόβλημα, εκτός από γενικές παρατηρήσεις και ποιοτικές εκτιμήσεις της επίδρασης των λυμάτων

στη δραστηριότητα των ιών. Μέχρι εκείνη τη στιγμή τη βιβλιογραφία απασχολούσε η αδρανοποίηση των ιών στα λύματα από απορρυπαντικά και διαλύτες, ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η επικινδυνότητα των εκροών και όχι αν θραύσματα του ιού μπορούν να προσροφηθούν ισχυρά σε αιωρούμενα στερεά σωματίδια, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ανακτηθούν και να μετρηθούν. Η ερευνητική ομάδα του ΑΠΘ καινοτόμησε, όσον αφορά στον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης του ιού SARS-CoV-2 στα λύματα της Θεσσαλονίκης, με την ανάπτυξη ενός φυσικοχημικού μοντέλου για τον εξορθολογισμό των μετρήσεων ιικού φορτίου (Petala et al., 2021).

Το μοντέλο αυτό εξετάζει τη δυναμική της προσρόφησης του γονιδιωματικού υλικού του ιού στα αιωρούμενα στερεά υλικά των λυμάτων. Το μοντέλο έχει σχεδιαστεί με πολλές εναλλακτικές λύσεις μεταβλητού βαθμού πολυπλοκότητας και περιέχει συναρτήσεις του χρόνου και της χωρικής θέσης εισαγωγής ιικού φορτίου στο αποχετευτικό σύστημα της πόλης. Επίσης, εμπεριέχει 24 διαφορετικές περιβαλλοντικές ιδιότητες των λυμάτων (παροχή, φορτίο στερεών, περιεκτικότητα οργανικού φορτίου κ.ά.), οι οποίες δύνανται να επηρεάζουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων συγκέντρωσης του ιού στα λύματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν πρόκειται για ένα στατιστικό μοντέλο πολυπαραμετρικής ανάλυσης, όπου οι συντελεστές δεν έχουν φυσικό περιεχόμενο, αλλά για ένα αυστηρό μαθηματικό μοντέλο περιγραφής των φυσικοχημικών φαινομένων, που συμβαίνουν κατά τη ροή ιικού φορτίου εντός του αποχετευτικού δικτύου. Κατά τον εξορθολογισμό, οι μετρήσεις διορθώνονται με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λυμάτων που μπορεί να μεταβάλλονται, τόσο χρονικά όσο και χωρικά. Έτσι, οι εξορθολογισμένες μετρήσεις είναι πλέον αξιόπιστες και αξιοποιήσιμες. Ο εξορθολογισμός των μετρήσεων φαίνεται να αυξάνει κατά μια τάξη μεγέθους την ακρίβεια στον προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Σε περιόδους βροχής, για παράδειγμα, όπου η παροχή νερού και η λάσπη που καταλήγει στα λύματα είναι μεγάλη, ο εξορθολογισμός οδηγεί σε διορθωμένες τιμές συγκέντρωσης, που αποκλίνουν έως και 5 φορές από τις αρχικές. Η ομάδα επιδημιολογίας του ΑΠΘ προχώρησε περαιτέρω και στη χωρική μελέτη προσρόφησης του ιού SARS-CoV-2 κατά μήκος των δικτύων αποχέτευσης, με ανάπτυξη και εφαρμογή κατάλληλου μαθηματικού μοντέλου, υλοποιώντας ανάλυση ευαισθησίας και παραμετρική μελέτη χρησιμοποιώντας δεδομένα του δικτύου αποχέτευσης του πολεοδομικού συγκροτήματος της Θεσσαλονίκης (Kostoglou et al. 2021).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η ακρίβεια του εξορθολογισμού των μετρήσεων απαιτεί ακριβείς μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των λυμάτων. Για τον λόγο αυτόν, η ομάδα του ΑΠΘ με την υποστήριξη της ΕΥΑΘ προχωράει στην εγκατάσταση στην είσοδο της Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων μείζονος περιοχής Θεσσαλονίκης (ΕΕΛΘ) ενός εξελιγμένου πολυαισθητήρα για την επί τόπου και σε πραγματικό χρόνο μέτρηση διάφορων ευαίσθητων φυσικοχημικών παραμέτρων των αστικών λυμάτων, αποφεύγοντας έτσι αλλοιώσεις στο μεσοδιάστημα από τη λήψη του δείγματος έως και τη μεταφορά του στο εργαστήριο. Το εξειδικευμένο αυτό όργανο θα μεταδίδει την πληροφορία με τηλεμετρία στα εργαστήρια του ΑΠΘ και της ΕΥΑΘ.

Οι απαιτούμενες γνώσεις και η εμπειρία για την εφαρμογή του περιβαλλοντικού εξορθολογισμού των μετρήσεων αποκτήθηκαν κατά την εκπόνηση δύο μεγάλων

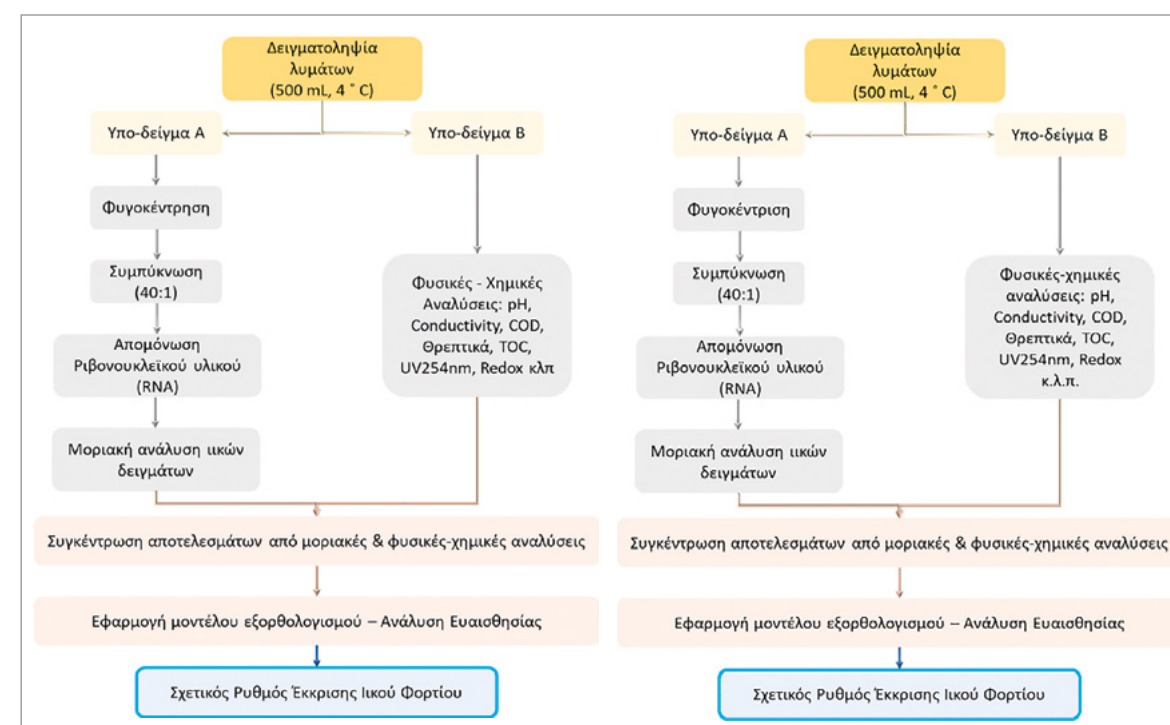
ερευνητικών έργων, συνολικής διάρκειας 4 ετών, που αφορούσαν την παρακολούθηση της ποιότητας του πόσιμου νερού και των υγρών απόβλητων στον Διεθνή Διαστημικό Σταθμό (ISS) (Petala et al., 2020, Petala et al., 2017). Η συστηματική πειραματική μελέτη στο πλαίσιο αυτών των δύο έργων αποκάλυψε ότι η παρουσία αιωρούμενων και διαλυμένων ουσιών στο νερό και στα λύματα επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των βιοκτόνων ουσιών και προκαλεί παρεμποδίσεις στην ανίχνευση του βιολογικού φορτίου.

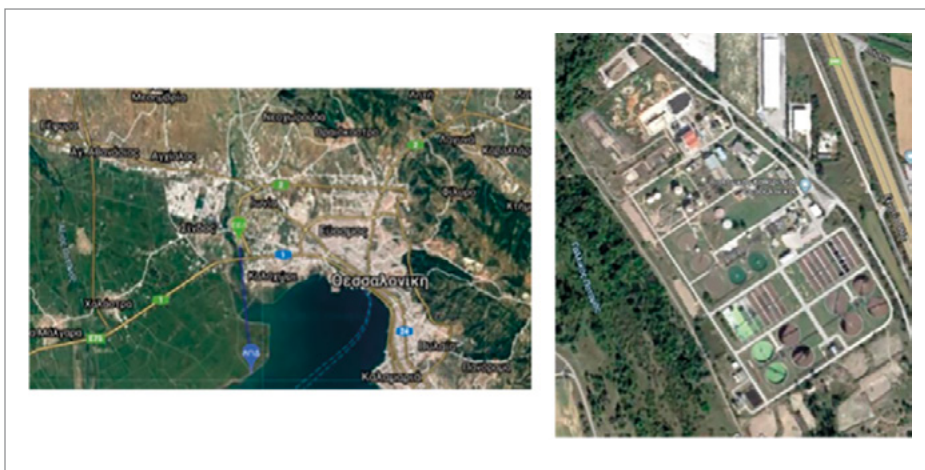
Τα στάδια της τεχνικής που ανέπτυξε το ΑΠΘ για μετρήσεις κορωνοϊού στα λύματα

Η μέθοδος που ακολουθεί η ερευνητική ομάδα του ΑΠΘ για τη μέτρηση της συγκέντρωσης κορωνοϊού στα αστικά λύματα της Θεσσαλονίκης αποτελείται από πέντε στάδια (Εικ. 2).

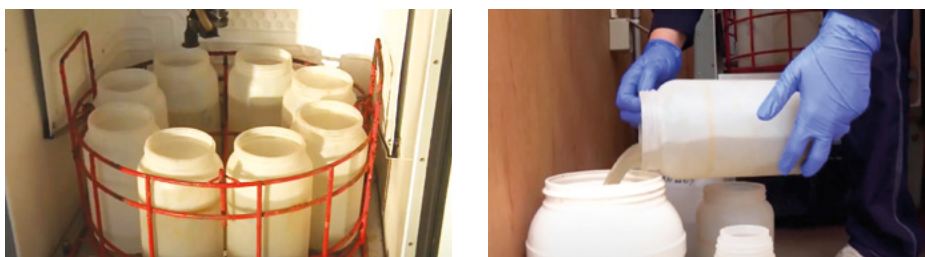
Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη δειγματοληψία των λυμάτων. Η δειγματοληψία γίνεται στην είσοδο της Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων μείζονος περιοχής Θεσσαλονίκης (ΕΕΛΘ) (Εικ. 3) στη Σίνδο, βάσει των πρωτοκόλλων ISO 5667-10:2020 (2020) (ISO 5667-10:2020, 2020) και σε πλήρη συμμόρφωση προς τις οδηγίες του CDC (CDC, 2020). Στην είσοδο της ΕΕΛΘ καταγράφεται η ημερήσια παροχή λυμάτων και στο εργαστήριο διενεργούνται ορισμένες φυσικές-χημικές αναλύσεις. Στην ΕΕΛΘ καταλήγει το μεγαλύτερο μέρος των αστικών λυμάτων της πόλης της Θεσσαλονίκης. Σε ξηρή περίοδο, δέχεται κατά μέσο όρο περίπου 150.000-160.000 m³ λυμάτων ανά ημέρα.

Εικ. 2. Συνοπτική παρουσίαση της μεθοδολογίας ανάλυσης των δειγμάτων αστικών λυμάτων για την παρουσία SARS-CoV-2 και την ποσοτικοποίηση του γονιδιώματος του ιού.





Εικ. 3. Χώρος Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων της Θεσσαλονίκης (ΕΕΛΘ).

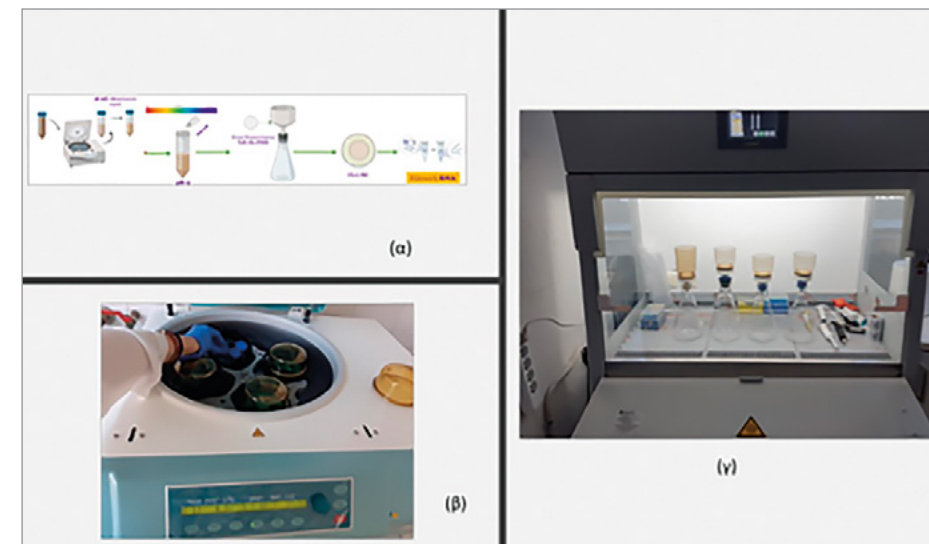


Εικ. 4. Λήψη σύνθετου δείγματος στην ΕΕΛΘ.



Το σημείο δειγματοληψίας βρίσκεται στην είσοδο της ΕΕΛΘ, έπειτα από τα στάδια της εσχάρωσης και της αμμοσυλλογής. Αυτόματος δειγματολήπτης χρησιμοποιείται για τη λήψη σύνθετου δείγματος (Εικ. 4), αποτέλεσμα της ανάμιξης πολλών στιγμιαίων δειγμάτων για 24 ώρες και σε θερμοκρασία 4°C. Το σύνθετο δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό της ημέρας, καθώς η ανάδευση εξομαλύνει τις διακυμάνσεις στη σύσταση και την παραγόμενη ποσότητα των λυμάτων.

Εικ. 5. Διαδικασία προεπεξεργασίας/ συμπίκνωσης δειγμάτων με φίλτρα ηλεκτρωνητικής μεμβράνης (α), φυγοκέντριση δειγμάτων (β) και διήθηση δειγμάτων διαμέσου μεμβράνης σε θάλαμο νηματικής ροής (γ).

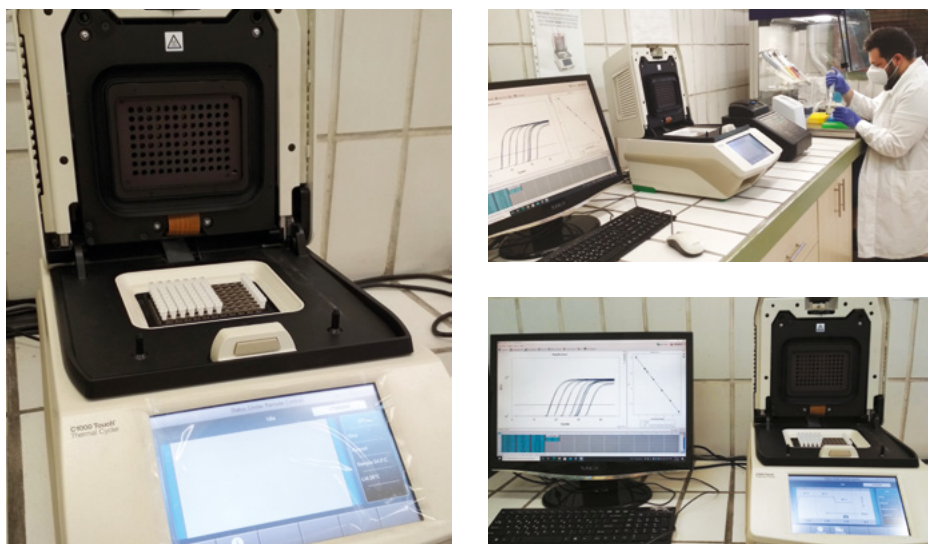


Στο δεύτερο στάδιο, τα δείγματα μεταφέρονται στο εργαστήριο Τεχνικής και Σχεδιασμού Περιβάλλοντος του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών του ΑΠΘ, όπου και πραγματοποιείται η προκατεργασία τους (Εικ. 5). Από τον αρχικό όγκο του κάθε δείγματος (μισό λίτρο) λαμβάνεται ένα υπό-δείγμα, ώστε να μετρηθούν 24 διαφορετικές περιβαλλοντικές παράμετροι. Στη συνέχεια, τα αιωρούμενα στερεά απομακρύνονται από τα δείγματα μέσω φυγοκέντρισης. Το υπερκείμενο υγρό διηθείται και υποβάλλεται σε ειδική επεξεργασία με σκοπό τη συμπίκνωση και, εν συνεχεία, αδρανοποίηση ιών και βακτηρίων.

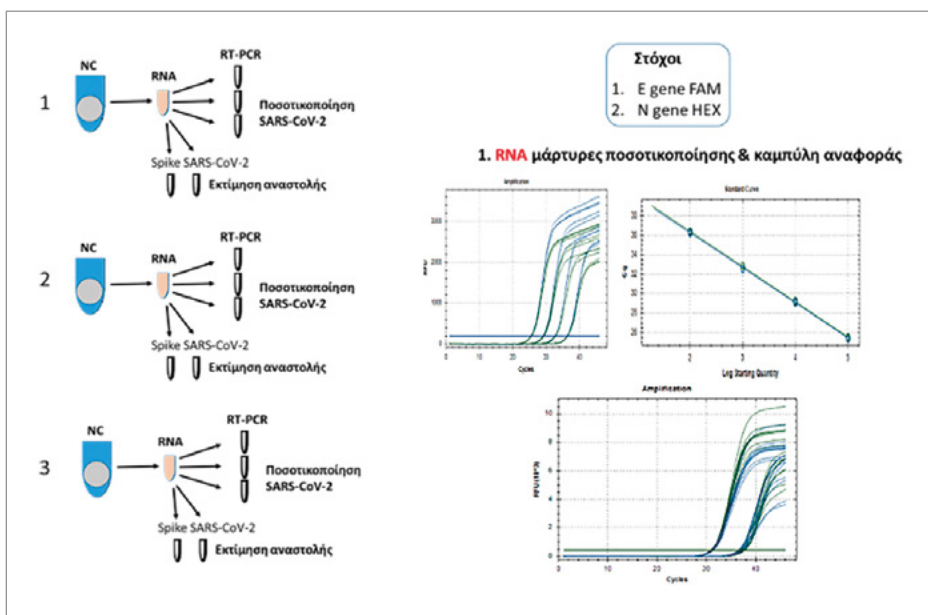
Στο τρίτο στάδιο, τα δείγματα υπόκεινται σε απομόνωση RNA και ποσοτικοποίηση του ιικού γονιδιώματος με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής - αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time RT-PCR). Μέχρι τον Ιούνιο 2020 τα δείγματα προεπεξεργασμένων λυμάτων μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Τμήματος Βιολογίας, ενώ από τον Σεπτέμβριο 2020 στο Διαγνωστικό Εργαστήριο του Τομέα Κλινικών του Τμήματος Κτηνιατρικής (Εικ. 6). Τα δείγματα αναλύονται ακολουθώντας τις βασικές αρχές που διέπουν τις καλές μικροβιολογικές πρακτικές (Good Microbiological Practices, GMPs).

Κατά την εξέλιξη του δεύτερου επιδημικού κύματος στην πόλη, δόθηκε η δυνατότητα να αξιολογηθούν και να βελτιστοποιηθούν διάφορες διαδικασίες συμπίκνωσης και απομόνωσης του RNA, με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης και ακρίβειας της ποσοτικοποίησης του γονιδιώματος του SARS-CoV-2. Συγκεκριμένα, δόθηκε έμφαση στις ανακτήσεις των σταδίων της συμπίκνωσης του λύματος και απομόνωσης του RNA, καθώς και στην απαλλαγή από διάφορες χημικές ενώσεις, που βρίσκονται στα λύματα και μπορούν να λειτουργήσουν ως αναστολές των μοριακών αντιδράσεων.

Η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου εκτιμάται ανά κυβικό εκατοστό όγκου ανεπεξέργαστου λύματος. Για τη βέλτιστη ευαισθησία ανίχνευσης και ακρίβεια της ποσοτικοποίησης του ιικού γονιδιώματος, ειδικά στις περιπτώσεις όπου αυτό είναι



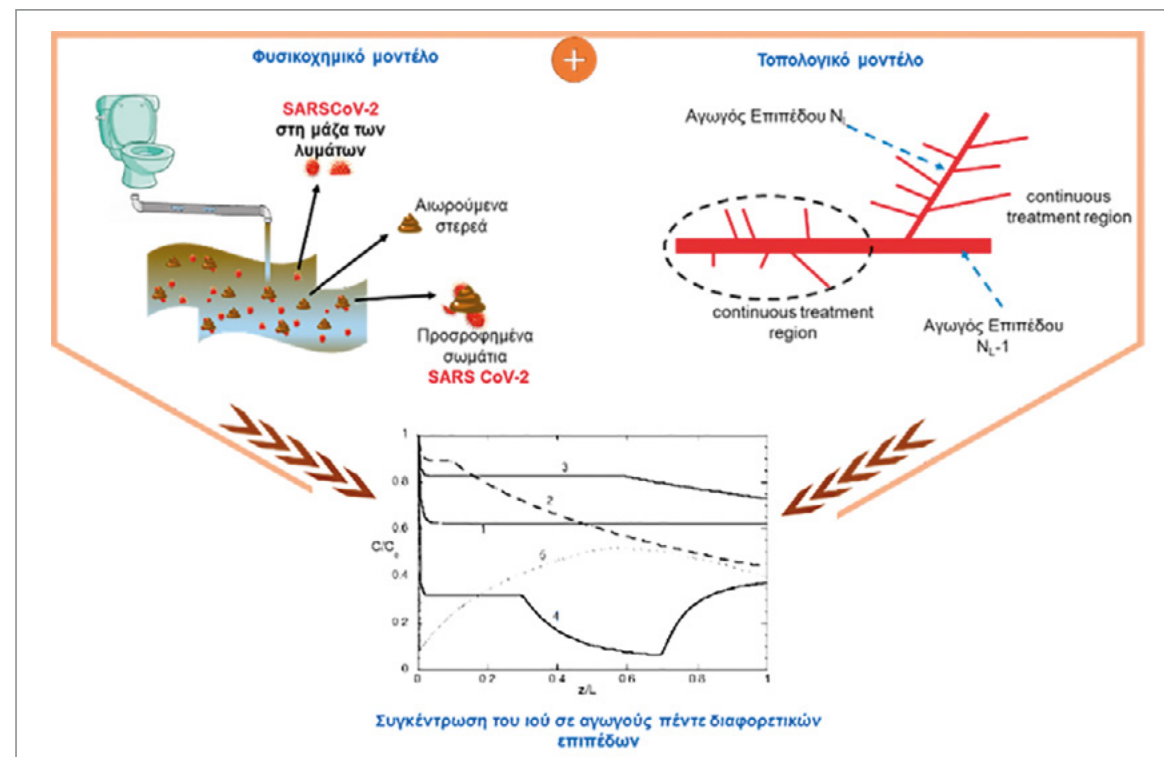
Εικ. 6.
Εργαστηριακός εξοπλισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό του SARS-CoV-2 RNA στα λύματα της Θεσσαλονίκης.



Εικ. 7.
Μοριακή ανάλυση ενός δείγματος λυμάτων της Θεσσαλονίκης

μειωμένο, γίνεται στόχευση δύο διαφορετικών γονιδιωματικών περιοχών του ιού και διενεργούνται πολλές επαναλήψεις συμπύκνωσης και ποσοτικοποίησης του ιού ανά δείγμα λύματος (Εικ. 7). Σε κάθε δείγμα λύματος γίνεται εκτίμηση ανάκτησης του ιού και εκτίμηση για την παρουσία και την επίδραση αναστολέων της real-time RT-PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους μάρτυρες, ώστε να εξασφαλίζεται η ακρίβεια των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης.

Στο τέταρτο στάδιο η ερευνητική ομάδα του τμήματος Πολιτικών Μηχανικών σε συνεργασία με την ομάδα του Τμήματος Χημείας διενεργεί φυσικοχημικές αναλύ-



Εικ. 8.
Παραμετρική ανάλυση του μαθηματικού μοντέλου για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του ιού SARS-CoV-2 σε ένα δίκτυο αποχέτευσης, λαμβάνοντας υπόψη το φυσικοχημικό μοντέλο εκτίμησης της έκκρισης του ιικού φορτίου

σεις στα δείγματα των λυμάτων για τον προσδιορισμό σημαντικών παραμέτρων, όπως: χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD), ενεργός οξύτητα, αγωγιμότητα, απορρόφηση στο υπεριώδες στα 254 nm, διαλυμένο οξυγόνο, ολικό άζωτο, ολικός φώσφορος, διαλυμένος οργανικός άνθρακας, ειδική απορρόφηση, δυναμικό οξειδοαναγωγής, συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών, θολότητα κ.λπ. Τα χημικά χαρακτηριστικά των λυμάτων εξυπηρετούν στην ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την αναγωγή τους σε επίπεδο πληθυσμού. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι πρότυπες, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα ISO, ASTM ή πρότυπες μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό του νερού και των υγρών αποβλήτων (APHA, 2017).

Στο πέμπτο και τελευταίο στάδιο της μεθόδου, πραγματοποιείται αρχικά ο εξορθολογισμός των αποτελεσμάτων συγκέντρωσης ιικού φορτίου με βάση το φυσικοχημικό μοντέλο που ανέπτυξε η ομάδα του ΑΠΘ (Εικ. 8) και έπειτα η αξιολόγηση και η αποτίμηση των αποτελεσμάτων, καθώς και η συσχέτισή τους με τα αντίστοιχα κλινικά δεδομένα που ανακοινώνει ο ΕΟΔΥ (Petala et al., 2021a; Kostoglou et al., 2021; Petala et al., 2021b).

Σε όλα τα στάδια της διαδικασίας τηρούνται αυστηρά όλα τα πρωτόκολλα ασφαλείας του ΕΟΔΥ και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Η διάρκεια της μέτρησης, από τη λήψη του δείγματος μέχρι και τη διεξαγωγή του αποτελέσματος, είναι περίπου 12 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί πως σε όλα τα παραπάνω στάδια, η ομάδα του ΑΠΘ εφαρμόζει βελτιστοποιημένα δικά της πρωτόκολλα από την αρχική προκατεργασία και την προσυγκέντρωση των δειγμάτων μέχρι την αδρανοποίηση του ιού και τη μοριακή ανάλυσή του.

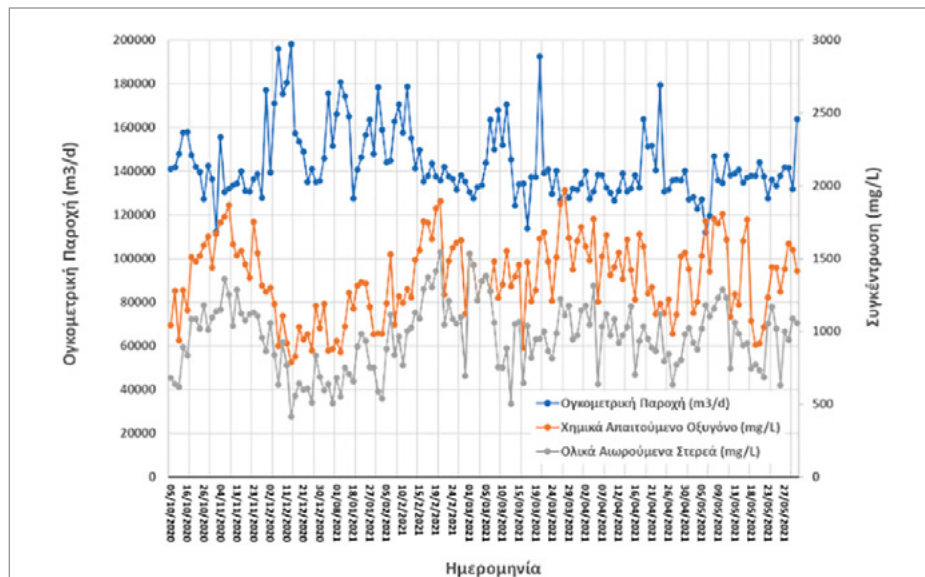
Αποτελέσματα και συμπεράσματα της έρευνας

Η μεταβολή των πιο σημαντικών χαρακτηριστικών παραμέτρων των λυμάτων, από το δεύτερο κύμα της πανδημίας μέχρι τέλος Μαΐου 2021, φαίνεται στις Εικ. 9 και 10. Οι μετρούμενες τιμές των παραμέτρων αυτών χρησιμοποιήθηκαν για τον εξορθολογισμό των μετρήσεων της συγκέντρωσης του ιικού φορτίου SARS-CoV-2 στα λύματα.

Στην Εικ. 9 παρουσιάζεται η εισερχόμενη ροή λυμάτων στην ΕΕΛΘ. Όπως φαίνεται, από τις αρχές Δεκεμβρίου και μέχρι τα μέσα Φεβρουαρίου, η παροχή των λυμάτων ήταν υψηλότερη από τη μέση ογκομετρική ροή που δέχεται η ΕΕΛΘ. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στις έντονες βροχοπτώσεις που είχαν ως αποτέλεσμα την εισροή των ομβρίων υδάτων στο αποχετευτικό σύστημα. Από τις 10 Φεβρουαρίου 2021 και έπειτα, η παροχή επανέρχεται στις φυσιολογικές τιμές. Σημειακές αυξομειώσεις στην εισερχόμενη ογκομετρική παροχή των λυμάτων είναι αποτέλεσμα παροδικών βροχοπτώσεων. Συχνά, η αύξηση της παροχής των λυμάτων συνοδεύεται από αύξηση στη συγκέντρωση του οργανικού φορτίου, ενώ σε ηπιότερες περιόδους σημειώθηκε αύξηση στη συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών.

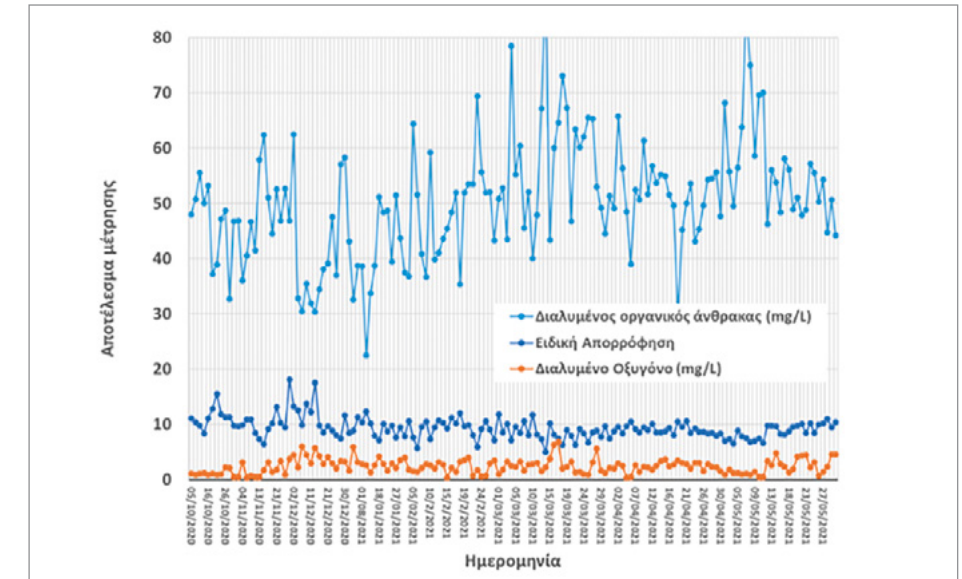
Στη συνέχεια, στις Εικ. 11 και 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων από τον Οκτώβριο του 2020 έως τον Ιούνιο του 2021, διάστημα στο οποίο εκδηλώθηκαν δύο κύματα της πανδημίας. Για την καλύτερη εκτίμηση των αποτελεσμάτων δίνεται και ο αριθμός των καταγεγραμμένων κρουσμάτων κορωνοϊού στη Θεσσαλονίκη.

Η ένδειξη του σχετικού ρυθμού έκκρισης του ιικού φορτίου (Εικ. 11) σημειώνεται με διαφορετικό χρωματισμό, ανάλογα με τον αριθμό των επιβεβαιωμένων και ανακινωμένων από τον ΕΟΔΥ κρουσμάτων κορωνοϊού την αντίστοιχη χρονική στιγμή, για την πόλη της Θεσσαλονίκης. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί σε λιγότερα από εκατό επιβεβαιωμένα κρούσματα την ημέρα, το πορτοκαλί σε 100-400 κρούσματα, ενώ το κόκκινο



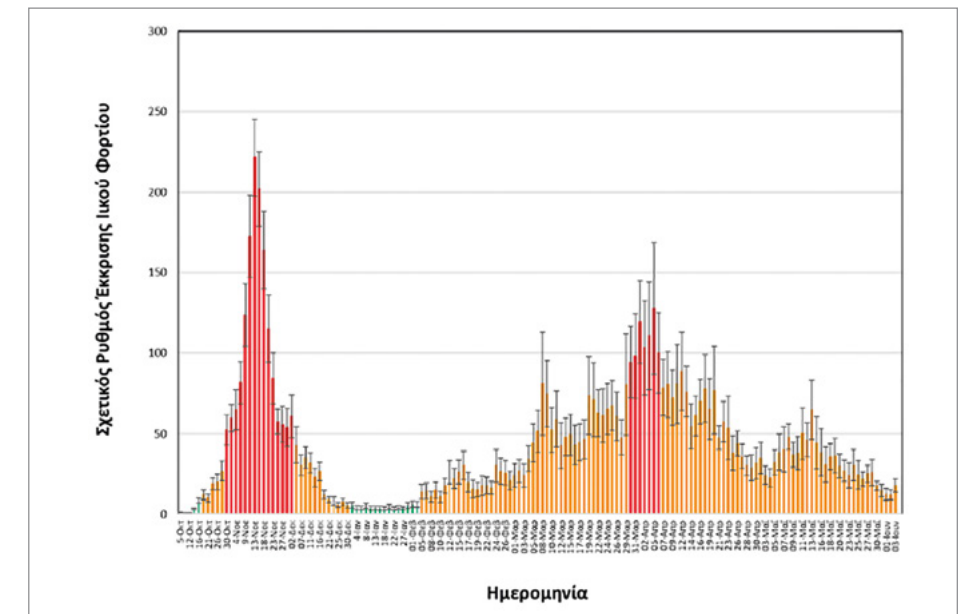
Εικ. 9. Μεταβολή της ογκομετρικής παροχής και της συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου (εκφρασμένου ως COD) και των ολικών αιωρούμενων στερεών.

Εικ. 10. Μεταβολή της ειδικής απορρόφησης, του διαλυμένου οξυγόνου και της συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου (εκφρασμένου ως DOC).



δείχνει τις ημέρες όπου τα ανακοινωμένα κρούσματα ξεπερνούσαν τα 400 και η κλινική κατάσταση στην πόλη της Θεσσαλονίκης ήταν κρίσιμη. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το τρίτο κύμα της πανδημίας, το οποίο, όπως διαφαίνεται από τις αναλύσεις των λυμάτων, ξεκίνησε στις αρχές Φεβρουαρίου του 2021, είχε διαφορετικά χαρακτηριστικά από το δεύτερο κύμα (Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2020), το οποίο χαρακτηρίστηκε από μια απότομη εκθετική αύξηση και μια αντίστοιχη γρήγορη μείωση. Τα χαρακτηριστικά του τρίτου κύματος φαίνεται να επηρεάστηκαν σημαντικά από την επικράτηση του βρετανικού στελέχους

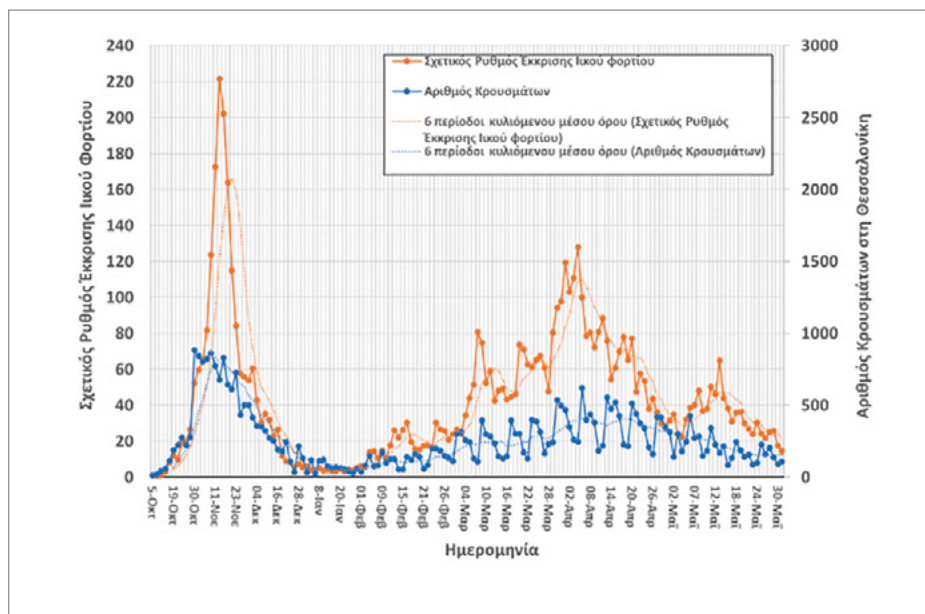
Εικ. 11. Μεταβολή του σχετικού ρυθμού έκκρισης του ιικού φορτίου (εξορθολογισμένες τιμές).



του ιού. Η μεταδοτικότητα του μεταλλαγμένου αυτού στελέχους και το ικκό φορτίο στους νοσούντες ήταν υψηλότερα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα και ο αριθμός των κρουσμάτων αλλά και το ικκό φορτίο στα λύματα να διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα για ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα παρά τα μέτρα περιορισμού. Έτσι, η μείωση της έκκρισης του ιικού φορτίου στα λύματα άρχισε να διαφαίνεται με πολύ αργούς ρυθμούς. Οι χαμηλές τιμές που καταγράφηκαν στις αρχές Ιουνίου 2021 δείχνουν πως η επιδημιολογική κατάσταση της πόλης τείνει να επανέλθει στην ασφαλή «πράσινη» ζώνη.

Στην Εικ. 12 παρατίθενται συγκριτικά οι εξορθολογισμένες μετρήσεις ιικού φορτίου στα λύματα και ο αντίστοιχος αριθμός των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων του ιού. Σε γενικές γραμμές, οι καμπύλες του κυλιόμενου μέσου όρου ακολουθούν την ίδια τάση. Στην περίπτωση του τρίτου κύματος της πανδημίας, ο ρυθμός αύξησης του φορτίου ήταν πολύ μικρότερος από αυτόν του δεύτερου κύματος και, επιπλέον, η συχνότητα δειγματοληψίας και ανάλυσης ήταν αυξημένη. Συνεπώς, υπήρχε η αναλυτική ικανότητα στο να διαφανεί η προγνωστικότητα των μετρήσεων του ιού στα λύματα για την έναρξη του τρίτου κύματος αλλά και για την αποκλιμάκωσή του στη συνέχεια. Συγκεκριμένα, η σταδιακή άνοδος του ιικού φορτίου στα λύματα από τις 10 Φεβρουαρίου άρχισε να αποτυπώνεται και στον αριθμό των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων λίγες ημέρες αργότερα. Επιπλέον, η μείωση στην έκκριση του ιικού φορτίου στην πόλη, όπως φαίνεται από τον κυλιόμενο εβδομαδιαίο μέσο όρο, ξεκίνησε στις αρχές Απριλίου, ενώ η αντίστοιχη μείωση στα καταγεγραμμένα ημερήσια κρούσματα ήρθε λίγο αργότερα.

Η έντονη αύξηση του ιικού φορτίου στα λύματα αρχές Μαρτίου με αρχές Απριλίου, όπως και η πτώση του φορτίου μέσα στον μήνα Απρίλιο, δεν αποτυπώθηκαν στην αντίστοιχη μεταβολή των κρουσμάτων του ιού που δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διακυμάνσεις. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως το ικκό φορτίο από τους



Εικ. 12. Μεταβολή του ιικού φορτίου έπειτα από εφαρμογή του μοντέλου εξορθολογισμού και μεταβολή των καταγεγραμμένων κρουσμάτων στη Θεσσαλονίκη. Εκτός από τα πρωτογενή δεδομένα στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αντίστοιχος κυλιόμενος εβδομαδιαίος μέσος όρος.

ασυμπτωματικούς φορείς του ιού (το οποίο συμπεριλαμβάνεται στις αποτυπώσεις των μετρήσεων στα λύματα) συγκεντρωτικά ήταν ιδιαίτερα σημαντικό για το χρονικό αυτό διάστημα. Έτσι, ενώ ο αριθμός των κρουσμάτων έδειχνε πως το επιδημιολογικό φορτίο της πόλης κινείται σε σταθερά επίπεδα, η πληροφορία από τα λύματα έδειξε πως κατά τον μήνα Μάρτιο υπήρχε σοβαρό ενδεχόμενο επιδημιολογικής έξαρσης. Έτσι, μια πιθανή χαλάρωση των περιοριστικών μέτρων από την Πολιτεία στο μεσοδιάστημα Μαρτίου-Απριλίου πιθανόν να καθυστερούσε την εξομάλυνση της επιδημιολογικής εικόνας.

Μελλοντικός σχεδιασμός και όραμα

Σε πρώτη φάση, η διεπιστημονική ομάδα επιδημιολογίας λυμάτων του ΑΠΘ προσέβλεπε στον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδιώματος ιού SARS-CoV-2 στα λύματα του πολεοδομικού συγκροτήματος της Θεσσαλονίκης και στην αποτίμηση της εξέλιξης του ιικού φορτίου στα λύματα σε σχέση με την κλινική κατάσταση και τα καταγεγραμμένα κρούσματα στην πόλη. Αναλύονταν δείγματα από την έξοδο του κεντρικού αποχετευτικού αγωγού της Θεσσαλονίκης και πριν αυτά εισέλθουν προς επεξεργασία στην Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Θεσσαλονίκης (ΕΕΛΘ) στη Σίνδο, δηλαδή δείγματα που έδιναν εικόνα για το σύνολο του πληθυσμού που εξυπηρετείται από την ΕΕΛΘ.

Σε δεύτερη φάση, τέθηκε ο στόχος να εφαρμοστεί η μεθοδολογία για την παρακολούθηση του φορτίου του κορωνοϊού σε αποχετευτικά δίκτυα μικρότερης κλίμακας, π.χ. στους επιμέρους δήμους της πόλης, σε μεγάλες τουριστικές υποδομές, σε μονάδες φιλοξενίας προσφύγων κ.λπ. Σε συνεργασία με την ΕΥΑΘ προχώρησε η διαδικασία εγκατάστασης εξοπλισμού δειγματοληψίας και μέτρησης παροχής λυμάτων σε επιλεγμένα σημεία του πολεοδομικού συγκροτήματος της πόλης, ώστε να υπάρχει καταγραφή της επιδημιολογικής κατάστασης σε τοπικό επίπεδο με σκοπό αφενός να εντοπίζονται πιθανές τοπικές εστίες υπερμετάδοσης αλλά και πιθανές συσχετίσεις της διασποράς του ιού με οικονομικές και κοινωνικές δραστηριότητες των περιοχών αυτών. Οι πληροφορίες αυτές έχουν μεγάλη σημασία στον σχεδιασμό μέτρων πρόληψης και προστασίας εκ μέρους της Πολιτείας και των τοπικών Αρχών.

Με βάση την επιτυχία στην επιδημιολογική επιτήρηση των λυμάτων της Θεσσαλονίκης, η διεπιστημονική ομάδα του ΑΠΘ οραματίστηκε και πρότεινε προς την Πολιτεία τον Ιούνιο 2020 την ίδρυση ενός Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Επιδημιολογίας Λυμάτων, ως ενός Παρατηρητηρίου Δημόσιας Υγείας για τις επιδημίες, ώστε να παρακολουθείται οργανωμένα και συστηματικά, σε συνεργασία με όλους τους συναρμόδιους φορείς, η πορεία όχι μόνο της πανδημίας του κορωνοϊού αλλά και άλλων λοιμώξεων και επιδημιών σε όλη τη χώρα. Την Πέμπτη 11 Φεβρουαρίου 2021, ο Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) ανακοίνωσε τη δημιουργία του Εθνικού Δικτύου Επιδημιολογίας Λυμάτων, με στόχο την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του ιού SARS-CoV-2 στα αστικά λύματα πόλεων στις Περιφέρειες Αττικής, Κεντρικής Μακεδονίας, Θεσσαλίας, Ανατολικής Μακεδονίας - Θράκης, Πελοποννήσου και Κρήτης. Στο Εθνικό αυτό Δίκτυο, το οποίο συντονίζει ο ΕΟΔΥ, συμμετέχουν, εκτός από τη διεπιστημονική ομάδα του ΑΠΘ, το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, το Εργαστήριο Υγιεινής του Τμήματος Ιατρικής

του Πανεπιστημίου Πατρών, τα Περιφερειακά Εργαστήρια Δημόσια Υγείας του ΕΟΔΥ στη Θεσσαλία και την Κρήτη, καθώς και το Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας (ΚΕΔΥ) του ΕΟΔΥ. Έκτοτε, όλα τα εργαστήρια του Εθνικού Δικτύου συνεργάζονται για την εναρμόνιση των διαδικασιών και των τεχνικών ανίχνευσης, τη βελτιστοποίηση της ακρίβειας στον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου, τον εξορθολογισμό των μετρήσεων με βάση τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των λυμάτων και, τέλος, τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών πόλεων. Σε όλα αυτά η ομάδα επιδημιολογίας λυμάτων του ΑΠΘ έχει σημαντική συνεισφορά.

Για τις ανάγκες ανίχνευσης και επιτήρησης των μεταλλάξεων του κορωνοϊού στα αστικά λύματα, η Ομάδα Επιδημιολογίας Λυμάτων του ΑΠΘ προχώρησε σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του ΕΚΕΤΑ (καθ. Α. Αργυρίου) και την ΕΥΑΘ Α.Ε. Η επιτήρηση μεταλλάξεων στα λύματα είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ειδικών και της Πολιτείας ειδικά σε περιόδους ύφεσης της πανδημίας που δεν υπάρχουν πολλά κλινικά δείγματα για ανάλυση. Με την πρόοδο των εμβολιασμών και την αύξηση της φυσικής ανοσίας του πληθυσμού, επειδή μεγάλος αριθμός πολιτών έχει νοσήσει, αναμένεται να μειωθεί δραστικά ο αριθμός των κρουσμάτων και τότε η επιτήρηση μεταλλάξεων στα λύματα θα προσφέρει πολύτιμη υπηρεσία.

Βιβλιογραφία

- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J.W., Choi, P.M., Kitajima, M., Simpson, S.L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W.J.M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V, Mueller, J.F., 2020. 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. *Sci. Total Environ.* 728, 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- APHA, 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd ed, Water Research. American Public Health Association, Washington, DC. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90249-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90249-4)
- CDC, 2020. COVID-19: 4. Public Health Interpretation and Use of Wastewater Surveillance Data.
- D'Aoust, P.M., Graber, T.E., Mercier, E., Montpetit, D., Alexandrov, I., Neault, N., Baig, A.T., Mayne, J., Zhang, X., Alain, T., Servos, M.R., Srikanthan, N., MacKenzie, M., Figeys, D., Manuel, D., Jüni, P., MacKenzie, A.E., Delatolla, R., 2021. Catching a resurgence: Increase in SARS-CoV-2 viral RNA identified in wastewater 48 h before COVID-19 clinical tests and 96 h before hospitalizations. *Sci. Total Environ.* 770, 145319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145319>
- Foladori, P., Cutrupi, F., Segata, N., Manara, S., Pinto, F., Malpei, F., Bruni, L., La Rosa, G., 2020. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci. Total Environ.* 743, 140444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140444>
- Hasan, S.W., Ibrahim, Y., Daou, M., Kannout, H., Jan, N., Lopes, A., Alsafar, H., Yousef, A.F., 2021. Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates. *Sci. Total Environ.* 764, 142929. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142929>
- Havers, F.P., Reed, C., Lim, T., Montgomery, J.M., Klena, J.D., Hall, A.J., Fry, A.M., Cannon, D.L., Chiang, C.-F., Gibbons, A., Krapivunaya, I., Morales-Betoulle, M., Roguski, K., Rasheed, M.A.U., Freeman, B., Lester, S., Mills, L., Carroll, D.S., Owen, S.M., Johnson, J.A., Semenova, V., Blackmore, C., Blog, D., Chai, S.J., Dunn, A., Hand, J., Jain, S., Lindquist, S., Lynfield, R., Pritchard, S., Sokol, T., Sosa, L., Turabelidze, G., Watkins, S.M., Wiesman, J., Williams, R.W., Yendell, S., Schiffer, J., Thornburg, N.J., 2020. Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV-2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Intern. Med.* <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.4130>
- ISO 5667-10:2020 Water quality—Sampling—Part 10: Guidance on sampling of wastewater, 2020.
- Kostoglou, M., Petala, M., Karapantsios, Th., Dovas, C., Roilides, E., Metallidis, S., Papa, A., Stylianidis, Papadopoulos, A., Papaioannou, N., 2021. SARS-CoV-2 adsorption on suspended solids along a sewerage network: mathematical model formulation, sensitivity analysis, and parametric study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16528-0>.
- La Rosa, G., Bonadonna, L., Lucentini, L., Kenmoe, S., Suffredini, E., 2020. Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. *Water Res.* 179, 115899. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>
- Liu, Ying, Gayle, A.A., Wilder-Smith, A., Rocklöv, J., 2020. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J. Travel Med.* 27. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021>
- Liu, Yuan, Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Yingle, Gali, N.K., Sun, L., Duan, Y., Cai, J., Westerdahl, D., Liu, X., Xu, K., Ho, K.-F., Kan, H., Fu, Q., Lan, K., 2020. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* 582, 557–560. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2271-3>

13. Lodder, W., de Roda Husman, A.M., 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5, 533–534. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30087-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30087-X)
14. Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., Brouwer, A., 2020b. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *medRxiv* 2020.03.29.20045880. <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>
15. Medema, G., Been, F., Heijnen, L., Petterson, S., 2020a. Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 17, 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.09.006>
16. Nemudryi, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., Buyukyoruk, M., Cicha, C., Vanderwood, K.K., Wilkinson, R., Wiedenheft, B., 2020. Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Reports Med.* 1, 100098. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100098>
17. Pechlivanis, N., Tsagiopoulou, M., Maniou, M.C., Tougkousidis, A., Laidou, S., Vlachonikola, E., Mouchtaropoulou, E., Chassalevris, T., Chaintoutis, S., Dovas, C., Petala, M., Kostoglou, M., Karapantsios, T., Chatzidimitriou, A., Papadopoulos, A., Papaioannou, N., Argiriou, A., Psomopoulos F. 2021 Detecting SARS-CoV-2 lineages and mutational load in municipal wastewater; a use-case in the metropolitan area of Thessaloniki, Greece *medRxiv* 2021.03.17.21252673; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.17.21252673>
18. Petala, M., Dafou, D., Kostoglou, M., Karapantsios, T., Kanata, E., Chatziefstathiou, A., Sakaveli, F., Kotoulas, K., Arsenakis, M., Roilides, E., Sklaviadis, T., Metallidis, S., Papa, A., Stylianidis, E., Papadopoulos, A., Papaioannou, N., 2021a. A physicochemical model for rationalizing SARS-CoV-2 concentration in sewage. Case study: The city of Thessaloniki in Greece. *Sci. Total Environ.* 755, 142855. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142855>
19. Petala, M., Kostoglou, M., Karapantsios, Th., Dovas, C., Lytras, Th., Paraskevis, D., Roilides, E., Koutsolioutsou-Benaki, A., Panagiotakopoulos, G., Sypsa, V., Metallidis, S., Papa, A., Stylianidis, E., Papadopoulos, A., Tsiodras, S., Papaioannou N. 2021b. Relating SARS-CoV-2 shedding rate in wastewater to daily positive tests data: A consistent model based approach. *Science of The Total Environment.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150838>

20. Petala, M., Tsiridis, V., Darakas, E., Kostoglou, M., 2020. Longevity aspects of potablewater disinfected by ionic silver: Kinetic experiments and modeling. *Water (Switzerland)* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3390/w12010258>
21. Petala, M., Tsiridis, V., Mintsouli, I., Pliatsikas, N., Spanos, T., Rebeyre, P., Darakas, E., Patsalas, P., Vourlias, G., Kostoglou, M., Sotiropoulos, S., Karapantsios, T., 2017. Silver deposition on stainless steel container surfaces in contact with disinfectant silver aqueous solutions. *Appl. Surf. Sci.* 396, 1067–1075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.11.090>
22. Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G., 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 181, 115942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
23. Rimoldi, S.G., Stefani, F., Gigantiello, A., Polesello, S., Comandatore, F., Mileto, D., Maresca, M., Longobardi, C., Mancon, A., Romeri, F., Pagani, C., Cappelli, F., Roscioli, C., Moja, L., Gismondo, M.R., Salerno, F., 2020. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Sci. Total Environ.* 744, 140911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>
24. Róka, E., Khayer, B., Kis, Z., Kovács, L.B., Schuler, E., Magyar, N., Málnási, T., Oravec, O., Pályi, B., Pándics, T., Vargha, M., 2021. Ahead of the second wave: Early warning for COVID-19 by wastewater surveillance in Hungary. *Sci. Total Environ.* 786, 147398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147398>
25. Saththasivam, J., El-Malah, S.S., Gomez, T.A., Jabbar, K.A., Remanan, R., Krishnankutty, A.K., Ogunbiyi, O., Rasool, K., Ashhab, S., Rashkeev, S., Bensaad, M., Ahmed, A.A., Mohamoud, Y.A., Malek, J.A., Abu Raddad, L.J., Jeremijenko, A., Abu Halaweh, H.A., Lawler, J., Mahmoud, K.A., 2021. COVID-19 (SARS-CoV-2) outbreak monitoring using wastewater-based epidemiology in Qatar. *Sci. Total Environ.* 774, 145608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145608>
26. Wurtzer, S., Waldman, P., Ferrier-Rembert, A., Frenois-Veyrat, G., Mouchel, J.M., Boni, M., Maday, Y., Marechal, V., Moulin, L., 2020. Several forms of SARS-CoV-2 RNA can be detected in wastewaters : implication for wastewater-based epidemiology and risk assessment. *medRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2020.12.19.20248508>