



## ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑ MSc: “Επιστήμη &  
Τεχνολογία Υδατικών Πόρων»

**«Ο ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ  
SARS-19 ΣΤΑ ΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ Η  
ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ  
ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ  
ΛΥΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ  
ΤΗΣ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ»**

*Στεφανία Μπουρλή*

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023

Επιβλέπων: Καθηγητής Δ. Μαμάης

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωσή της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δανιήλ Μαμάη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ανάθεση της παρούσας εργασίας και την πολύτιμη βοήθεια του. Όπως επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και το σύζυγό μου που ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση των βασικών εννοιών και μεθόδων της μικροβιολογίας και επιδημιολογίας με βάση τα λύματα (WBE) για την αντιμετώπιση της πανδημίας του Covid-19. Επίσης παρουσιάζονται οι τρόποι ανίχνευσης και αντιμετώπισης για την εξάπλωση του ιού με την αρωγή της επιδημιολογίας καθώς και άλλων καινοτόμων εφαρμογών.

Η πανδημία Covid-19 έως και σήμερα συνεχίζει να αποκαλύπτει αμέτρητα απρόβλεπτα προβλήματα σε όλα τα επίπεδα της πολύπλοκης, διασυνδεδεμένης κοινωνίας του κόσμου. Ουσιαστικά ο ιός SARS COV-2 αποτελεί ένα παγκόσμιο ντόμινο που αφορά τη δημόσια υγεία και ασφάλεια, την προσβάσιμη υγειονομική περίθαλψη, την επισιτιστική ασφάλεια, τη σταθερότητα των οικονομιών και των χρηματοπιστωτικών θεσμών, ακόμη και τη βιωσιμότητα των δημοκρατιών. Τα προβλήματα αυτά θέτουν τεράστιες προκλήσεις που μπορούν να καταναλώσουν αχόρταγα ανθρώπινους και οικονομικούς πόρους. Η παρακολούθηση της έναρξης, της εξάπλωσης και των μεταβαλλόμενων τάσεων του Covid-19 σε κλίμακα πληθυσμού είναι μία από τις πιο τρομακτικές προκλήσεις, ιδίως η επείγουσα ανάγκη χαρτογράφησης της κατανομής και του μεγέθους του Covid-19 σε σχεδόν πραγματικό χρόνο. Εκτός από την προφύλαξη πριν από την έκθεση ή τις θεραπευτικές αγωγές, το σημαντικότερο εργαλείο είναι η δυνατότητα ταχείας ταυτοποίησης των μολυσμένων ατόμων. Η βασική προσέγγιση για τις επιδημίες περιλαμβάνει εδώ και καιρό την εφαρμογή διαγνωστικών δοκιμών μεγάλης κλίμακας σε επίπεδο μεμονωμένων περιπτώσεων. Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή αντιμετωπίζει συντριπτικές δυσκολίες στην παροχή γρήγορων ερευνών σε μεγάλους πληθυσμούς. Ένα επιδημιολογικό εργαλείο που αναπτύχθηκε και επαναπροσδιορίστηκε από περιβαλλοντολόγους τα τελευταία 20 χρόνια (Wastewater- Based Epidemiology - WBE) έχει τη δυνατότητα να αποτελέσει βασικό εργαλείο για τον περιορισμό και τον μετριασμό των επιδημιών γενικότερα, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις επιπτώσεις ντόμινο, όπως οι άσκοπα μακρές πολιτικές παραμονής στο σπίτι που καταπονούν τόσο τον άνθρωπο όσο και τις οικονομίες.

Παρά την καθιέρωση της παγκόσμιας κλινικής επιτήρησης για το COVID-19, παραμένουν αρκετές περιπτώσεις ασυμπτωματικών ατόμων και ατόμων με πολύ ήπια συμπτώματα που δεν θα εντοπιστούν και, επομένως, μαζί με τις επαφές που δεν θα εντοπιστούν, ένα μεγάλο μέρος της πραγματικής μετάδοσης θα μπορούσε δυνητικά να διαφύγει. Η επιτήρηση των λυμάτων του SARS-CoV-2 έχει αποδειχθεί ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της επίπτωσης της νόσου σε επίπεδο κοινότητας, αλλά εξακολουθεί να χρειάζεται να

ενσωματωθεί σε άλλες πρωτοβουλίες δημόσιας υγείας (π.χ., βασισμένες σε εκστρατείες και τυχαιοποιημένες εξετάσεις ατόμων, όπως η παρουσία παθογόνου ή αντισωμάτων, η αναφορά κλινικών περιστατικών και συστήματα παρακολούθησης επαφών και αυτοαναφορών μέσω κινητών τηλεφώνων). Αυτό αποτελεί σημαντική πρόκληση, λαμβάνοντας υπόψη την ανεπαρκή ενσωμάτωση των περιβαλλοντικών και κλινικών επιστημονικών κοινοτήτων.

Μέσω της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έγινε παρουσίαση των βασικών εννοιών και των μεθόδων της επιδημιολογίας με βάση τα αστικά λύματα (WBE). Η μέθοδος αυτή έχει αποδείξει ότι είναι ένα ισχυρό και αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση των λοιμώξεων στα αστικά λύματα. Επίσης παρουσιάστηκαν οι τρόποι ανίχνευσης του ιού SARS COV-2 με την αρωγή της WBE. Η παρακολούθηση των λυμάτων σε περιπτώσεις πανδημίας χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη και η εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα είναι ικανή ώστε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με την πορεία της επιδημιολογίας στα λύματα. Από πολλές μελέτες έχει φανεί ότι η εφαρμογή της μεθόδου αυτής δύναται να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού SAR COV-2.

Γενικότερα, η εμπειρία που απέκτησε η επιστημονική κοινότητα από την ανίχνευση του ιού SARS COV-2 στα λύματα καταδεικνύει ότι η εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση αστικά λύματα μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την επιτήρηση των λοιμωδών νόσων στις κοινότητες. Η συγκεκριμένη τεχνική ενημερώνει έγκαιρα τις κοινότητες αναφορικά με την κατάσταση και τις τάσεις εξάπλωσης των λοιμωδών ασθενειών και έχει αποδειχθεί ότι είναι μια μέθοδος που συμπληρώνει την κλινική επιτήρηση και δύναται να συμβάλλει στην καλύτερευση των πόρων για την καταπολέμηση των λοιμωδών ασθενειών.

## Abstract

The purpose of this diploma thesis is to present the basic concepts and methods of wastewater-based microbiology and epidemiology (WBE) for the treatment of the Covid-19 pandemic. Also presented are the ways of detection and treatment for the spread of the virus with the help of epidemiology and other innovative applications.

The Covid-19 pandemic to this day continues to reveal countless unforeseen problems at all levels of the world's complex, unified society. In essence, SARS COV-2 is a global domino effect affecting public health and safety, accessible healthcare, food security, the stability of economies and financial institutions, and even the sustainability of democracies. These problems pose enormous challenges that can voraciously consume human and capital resources. Tracking the onset, spread and changing trends of Covid-19 at the population scale is one of the most daunting challenges, especially the urgent need to map the distribution and size of Covid-19 in near real-time. In addition to pre-exposure prophylaxis or therapeutic treatments, the most important tool is the ability to rapidly identify infected individuals. The basic approach to epidemics has long involved the application of large-scale diagnostic tests at the level of individual cases. However, this approach faces overwhelming difficulties in providing rapid surveys of large populations. An epidemiological tool developed and redefined by environmentalists over the past 20 years (Wastewater- Based Epidemiology - WBE) has the potential to be a key tool for mitigating and reducing Covid-19 epidemics, while minimizing domino effects such as unnecessarily long home stay policies that strain both people and economies.

Despite the establishment of global clinical surveillance for COVID-19, there remain several cases of asymptomatic individuals and individuals with very mild symptoms that will not be detected and therefore, together with contacts that will not be detected, much of the actual transmission could potentially be missed. Surveillance of SARS-CoV-2 sewage has proven to be a powerful tool for assessing the incidence of the disease at the community level, but still needs to be integrated into other public health initiatives (e.g., campaign-based and randomized testing of individuals, such as pathogen or antibody presence, clinical case reporting, and mobile phone contact and self-reporting surveillance systems). This is a major challenge, considering the poor integration of the environmental and clinical scientific communities.

Through this master thesis, the basic concepts, and methods of wastewater-based epidemiology (WBE) were presented. This method has proven to be a powerful and effective

tool for the detection of infections in wastewater. The ways of detecting SARS COV-2 virus with the help of WBE were also presented. Wastewater monitoring in pandemic situations is identified as critical and the application of wastewater-based epidemiology can provide important information regarding the epidemiology of wastewater. Several studies have shown that the application of this method can provide important information to limit the spread of SAR COV-2 virus.

More generally, the experience gained by the scientific community from the detection of SARS COV-2 in wastewater demonstrates that the application of urban wastewater-based epidemiology can be an important tool for surveillance of infectious diseases in communities. This technique provides communities with timely information on the status and trends in the spread of infectious diseases and has been shown to be a method that complements clinical surveillance and can help to improve resources for infectious disease control.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract .....	4
Κατάλογος Εικόνων .....	8
Κατάλογος Πινάκων .....	9
1. Εισαγωγή .....	10
1.1 Σκοπός/Στόχοι της Εργασίας .....	11
1.2 Αντικείμενο Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας .....	11
2. Επιδημιολογία των Λυμάτων .....	13
2.1 Εισαγωγή .....	13
2.2 Προσέγγιση της Επιδημιολογίας με βάση τα Λύματα ως Εργαλείο Εποπτείας (Water Based Epidemiology – WBE).....	14
2.3 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την ανίχνευση και επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών.....	19
2.4 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα .....	20
2.5 Οφέλη της προσέγγισης της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών .....	21
2.6 Προκλήσεις της προσέγγισης της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών.....	22
2.7 Δεοντολογικοί προβληματισμοί σχετικά με την σχετική προσέγγιση.....	23
2.8 Κόστος που σχετίζεται με την επιτήρηση της προσέγγισης .....	24
2.9 Κοινοτική Οδηγία 91/271/ΕΟΚ.....	24
3. Ο Ιός SARS-COV2 .....	29
3.1 Οι Ιοί Γενικά.....	29
3.2 Είδος Ιών.....	29
3.3 Λοιμώδεις Ασθένειες .....	32
3.4 Ο Ιός SARS CoV-2 .....	32
3.5 Η Εμφάνιση του SARS CoV-2 στα Λύματα.....	35

4.	Προσδιορισμός του ιού SARS CoV- 2 στα Αστικά Λύματα.....	37
4.1	Εφαρμογή της Επιδημιολογίας με Βάση τα Λύματα - (WBE) για την Ανίχνευση του SARS CoV-2 .....	37
4.2	Φορτία SARS-COV-2 στα Λύματα .....	38
4.3	Μέθοδοι Ανίχνευσης και Μέτρησης της Συγκέντρωσης SARS CoV-2 στα Λύματα ....	39
4.3.1	Δειγματοληψία.....	39
4.3.2	Αποθήκευση .....	39
4.3.3	Συγκέντρωση του Ιού .....	40
4.3.4	Εκχύλιση και Απομόνωση RNA .....	40
4.3.5	Μέθοδος Αντίστροφης Μεταγραφής Αλυσιδωτής-Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR )	41
4.3.6	Μέθοδος Αλυσιδωτής Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (RT-qPCR).....	41
4.3.7	Μέθοδος Διαχωρισμού Δύο Φάσεων με Βάση την Πολυαιθυλενογλυκόλη PEG ..	42
4.3.8	Βιοαισθητήρες.....	43
4.3.9	Μέθοδος 4S.....	43
4.4	Ανίχνευση του Ιού SARS – COV -2 με βάση την Υπολογιστική Ανάλυση .....	47
4.4.1	Υπολογιστική Προσέγγιση Προσομοίωσης Monte Carlo.....	50
4.5	Παγκόσμιες Εμπειρίες στην Επιτήρηση του SARS-COV-2 μέσω της Ανάλυσης των Λυμάτων.....	51
4.5.1	Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Ελλάδα.....	52
4.5.2	Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Ευρώπη .....	55
4.5.3	Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Αμερική.....	61
4.5.4	Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Ασία .....	63
4.5.5	Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Αυστραλία .....	64
	Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα .....	68
	Βιβλιογραφία .....	70



## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2. 1: Στάδια επεξεργασίας λυμάτων για την εκτίμηση ουσιών στα λύματα μιας περιοχής ή μονάδας επεξεργασίας λυμάτων (Bijlsma & et. al, 2018).....	18
Εικόνα 2. 2: Ανάλυση ουσιών στα λύματα με τη μέθοδο της χρωματογραφίας (Bijlsma & et. al, 2018).....	19
Εικόνα 3. 1: Κύριες διαφορές μεταξύ ιών και βακτηρίων (Ζαφειρόπουλος, Καρακασιλιώτης, Μπελούκας, Σουρβίνος, & Σπανάκης, 2020) .....	30
Εικόνα 3. 2: Οι πιο κοινοί τύποι ιών.....	31
Εικόνα 3. 3: Χρονοδιάγραμμα των βασικών γεγονότων της πανδημίας Covid-19 (Μαρκόπουλος , 2021) από (Hu, Guo, Zhou, & Shi, 2021).....	33
Εικόνα 3. 4: Γραφική απεικόνιση των «εξόδων» του ιού από τον ανθρώπινο σώμα το οποίο RNA καταλήγει στα λύματα (Jones, Baluja, & Graham, 2020).....	35
Εικόνα 4. 1: Σχηματική απεικόνιση για την ανίχνευση του κορονοϊού με τη χρήση της μεθόδου RT-qPCR ( <a href="https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2213343720306552-ga1_lrg.jpg">https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2213343720306552-ga1_lrg.jpg</a> ).....	42
Εικόνα 4. 2: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου 4S (Whitney, et al., 2020).....	44
Εικόνα 4. 3: Ρύθμιση φίλτρου μέσω σύριγγας που σημαίνει ότι τα λύματα φιλτράρονται μέσω μιας επαναχρησιμοποιημένης μεμβράνης φίλτρου 47mm ( <a href="https://www.protocols.io/">https://www.protocols.io/</a> , 2023).....	45
Εικόνα 4. 4: Μεμβράνη ειδική για τη διήθηση (Μαρκόπουλος , 2021) .....	46
Εικόνα 4. 5: Στήλες πυριτίου Zymmo–IIIIP για απευθείας συλλογή RNA (Μαρκόπουλος , 2021).....	46
Εικόνα 4. 6: Ελάχιστο ποσοστό μόλυνσης για ανίχνευση (Hart & Halden, 2020) .....	48
Εικόνα 4. 7: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάλογα την εποχή για την ανίχνευση ιών στα υγρά απόβλητα (Hart & Halden, 2020).....	49
Εικόνα 4. 8: Μεταβολή του χρόνου εξάντλησης του ιού σε ετήσια βάση σε αποχετεύσεις για 8 πόλεις που επλήγησαν από την πανδημία COVID-19 (Hart & Halden, 2020) .....	50
Εικόνα 4. 9: Τοπολογικό μοντέλο πλήρους ανάλυσης για το κάθε τμήμα σωλήνα και διασταυρώσεων στο δίκτυο αποχέτευσης. Στην πάνω δεξιά γωνία απεικονίζεται ο σωλήνας της μονάδας με τα μεμονωμένα μέρη του ιού και τα στερεά σωματίδια με προσροφημένα ιικά σωματίδια που ρέουν στα λύματα (Petala, και συν., 2021).....	54

Εικόνα 4. 10: Σχηματική αναπαράσταση πιθανών μηχανισμών αλληλεπίδρασης σωματιδίων/θραυσμάτων ιού με ένα πορώδες στερεό σωματίδιο που αιωρείται στα λύματα. 1: μεταφορά μάζας (συναγωγή και διάχυση) από το υγρό περιβάλλον, 2: προσρόφηση, 3: εκρόφηση, 4: διάχυση πόρων και 5: διάχυση στην επιφάνεια (Petala, και συν., 2021).....	55
Εικόνα 4. 11: Χάρτες των λεκανών απορροής των εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων και των πρωτοβάθμιων κέντρων υγείας Νότια και Δυτικά του Brisbane (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021) .....	65

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2. 1: Συνοπτική απεικόνιση των δυνητικών προτάσεων για την αναβάθμιση της Κοινοτικής Οδηγίας 271-91/ΕΟΚ (Μαμάης, 2023) .....	27
Πίνακας 4. 1: Διασπορά του ιού SARS COV -2 και ποσοστά επιπολασμού σε μολυσμένα άτομα στο Queensland της Αυστραλίας που εκτιμήθηκε μέσω της ανίχνευσης αντιγράφων του ιικού RNA σε λύματα μέσω της μοντελοποίησης Monte Carlo (Ahmed et. al., 2021) ....	51
Πίνακας 4. 2: Οι τρεις διαφορετικές ένθετες δοκιμασίες που προέβησαν οι La Rosa et al., (2020) για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2 στα λύματα .....	58
Πίνακας 4. 3: Ευρήματα του ιού SARS-CoV-2 στα λύματα από τις τρεις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Όπου, x: δεν εντοπίστηκε ο ιός ,ο: εντοπισμός του ιού (ORFlab), ●: εντοπισμός του ιού (spike) (La Rosa, και συν., 2020) .....	59

## 1. Εισαγωγή

Από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα τα τελευταία σχεδόν 3 έτη είναι η πρόληψη, ο περιορισμός και η αντιμετώπιση της πανδημίας του COVID-19. Ο ιός SARS-CoV-2, υπεύθυνος για την πανδημία του κορονοϊού άρχισε να εξαπλώνεται στις αρχές του 2020 με ταχύτατους ρυθμούς σε όλο τον κόσμο, μολύνοντας ολόένα όλο και περισσότερους ανθρώπους με αποτέλεσμα εκατοντάδες εκατομμύρια άνθρωποι έως σήμερα να έχουν χάσει τη ζωή τους. Οι συνεχόμενες έρευνες επιβεβαίωσαν πως ο ιός υφίσταται στα λύματα και αυτό γίνεται αντιληπτό μέσω της μελέτης αυτών. Οι μελέτες δύναται να προσδιορίσουν το μέγεθος της εξάπλωσης του ιού ενώ σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση της πανδημίας του κορονοϊού είναι η επιδημιολογία με βάση τα λύματα (Wastewater Based Epidemiology – WBE).

Η επιδημιολογία βασίζεται στη μελέτη της εμφάνισης, διάδοσης και ελέγχου των ασθενειών στον πληθυσμό. Ένα από τα εργαλεία που χρησιμοποιεί η επιδημιολογία για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 και της ασθένειας COVID-19 είναι η συλλογή και ανάλυση δεδομένων από λύματα. Τα λύματα αναφέρονται στα απόβλητα νερού που προέρχονται από νοσοκομεία, κτίρια, ή άλλες εγκαταστάσεις όπου χρησιμοποιείται νερό. Κατά τη χρήση τους, αυτά τα νερά μπορεί να περιέχουν ιών, βακτήρια και άλλα παθογόνα μικρόβια που εκπέμπονται από τα ανθρώπινα σωματικά υγρά και αποβλήτων.

Στην περίπτωση του SARS-CoV-2, η παρουσία του ιού στα ανθρώπινα λύματα έχει αναγνωριστεί ως δυνητικός δείκτης επιδημίας. Ο ιός μπορεί να εκκρίνεται στα κατάλοιπα και να εισέρχεται στο αστικό ή αποχετευτικό σύστημα. Η ανίχνευση και η ανάλυση του ιού σε δείγματα λυμάτων δύναται να λειτουργήσει ως αρωγός στην παρακολούθηση και την πρόγνωση της διάδοσης του SARS-CoV-2 σε μια κοινότητα.

Πολλές χώρες και πόλεις χρησιμοποιούν την προσέγγιση των λυμάτων ως εργαλείο για την παρακολούθηση της επιδημίας. Μέσω της συλλογής δειγμάτων λυμάτων και της ανάλυσής τους σε εργαστήρια, μπορεί να προσδιοριστεί η παρουσία και η συγκέντρωση του ιού. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να παρέχει έναν εναλλακτικό τρόπο παρακολούθησης της επιδημίας, ιδίως όταν η διαθεσιμότητα των μοριακών εξετάσεων (PCR Tests) για τον κορονοϊό είναι περιορισμένη ή όταν απαιτείται να γίνει ευρεία παρακολούθηση σε μια κοινότητα.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ανίχνευση του SARS-CoV-2 σε λύματα δεν μπορεί να αντικαταστήσει την άμεση διάγνωση σε ανθρώπους με συμπτώματα ή τη χρήση

μοριακών εξετάσεων για την ιχνηλάτηση κρουσμάτων. Παρόλα αυτά, δύναται να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική μέθοδος για την παρακολούθηση και τον έλεγχο της επιδημίας, καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τη διάδοση του ιού σε μια κοινότητα και να βοηθήσει στον προσδιορισμό πιθανών περιοχών μεγαλύτερης επιδημικής δραστηριότητας.

Συνολικά, η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα μπορεί να αποτελέσει ένα αναμενόμενο εργαλείο ανίχνευσης του SARS-CoV-2 και να συμβάλει στην παρακολούθηση και τον έλεγχο της επιδημίας, αλλά πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους διάγνωσης και παρακολούθησης.

### **1.1 Σκοπός/Στόχοι της Εργασίας**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εκτενής παρουσίαση των μεθόδων εντόπισης του SARS COV-2 με βάση τα λύματα. Η εν λόγω μέθοδος ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες μεθόδους αφού επιτρέπει την άμεση εντόπιση του ιού από τα αστικά λύματα προτρέποντας την περαιτέρω διασπορά του. Παρά το γεγονός ότι σήμερα τα θετικά κρούσματα του ιού έχουν μειωθεί καθώς ο ιός έχει ενσωματωθεί στην ανθρώπινη κοινωνία, οι επιδράσεις του μπορεί να αποβούν μοιραίες. Ως εκ τούτου, η παρακολούθηση της πορείας του ιού μέσω των αστικών λυμάτων είναι μείζονος σημασίας αφού σχεδόν όλες οι ενώσεις που καταναλώνονται από τον άνθρωπο αποβάλλονται μέσω των ούρων και δύναται να εντοπιστούν αναλλοίωτες. Η εν λόγω μέθοδος κρίνεται αναγκαία κατά τη διάρκεια μιας παγκόσμιας κρίσης της δημόσιας υγείας και ως εκ τούτου η ανάλυση λυμάτων δύναται να λειτουργήσει ως σύστημα πρώιμης προειδοποίησης λοιμώξεων καθώς και ασθενειών.

### **1.2 Αντικείμενο Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας**

Η παρούσα εργασία διαρθρώνεται σε πέντε κεφάλαια συμπεριλαμβανομένου του παρόντος.

Στο δεύτερο κεφάλαιο με τίτλο «Επιδημιολογία των λυμάτων» πραγματοποιείται εκτενής ανάλυση της προσέγγισης της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα ως εργαλείο εποπτείας ενώ παρουσιάζονται οι προσεγγίσεις με βάση τα λύματα για την παρακολούθηση της χρήσης φαρμάκων και παράνομων ουσιών. Επίσης δίδονται πληροφορίες αναφορικά με την ανίχνευση και επιτήρηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Δίδεται αναλυτική περιγραφή για το πώς οι παθογόνοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν στα υγρά απόβλητα. Επιπλέον γίνεται αναφορά για τα οφέλη της προσέγγισης της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την επιτήρηση των παθογόνων μικροοργανισμών και τέλος παρουσιάζεται η

Κοινοτική Οδηγία 91/271/ΕΟΚ «για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων». Στο τρίτο κεφάλαιο «Ο ιός SARS-COV2» παρουσιάζονται οι ιοί γενικά, τα είδη των ιών, τι είναι οι λοιμώδεις ασθένειες ενώ παρουσιάζεται εκτενώς ο ιός SARS-CoV-2. Πραγματοποιείται εκτενής περιγραφή για το πώς ο ιός SARS-CoV-2 εμφανίζεται και ανιχνεύεται στα αστικά λύματα.

Στο τέταρτο κεφάλαιο «Προσδιορισμός του ιού SARS-CoV-2 στα αστικά λύματα» παρουσιάζεται αναλυτικά η επιδημιολογία με βάση τα λύματα, η εφαρμογή της μεθόδου για την ανίχνευση του ιού και οι μέθοδοι ανίχνευσης και συγκέντρωσης του ιού στα αστικά λύματα (δειγματοληψία, αποθήκευση του ιού κλπ.). Επίσης γίνεται παρουσίαση διαφόρων μεθόδων για την ανίχνευση του ιού (π.χ. μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων με βάση την πολυαιθυλενογλυκόλη κ.α.). Επιπλέον γίνεται αναφορά για τα φορτία αυτού στα αστικά λύματα. Τέλος παρουσιάζονται παγκόσμιες εμπειρίες στην επιτήρηση του ιού μέσω της μεθόδου της επιδημιολογίας των λυμάτων.

Στο πέμπτο κεφάλαιο, «Συμπεράσματα», παρουσιάζονται τα γενικά συμπεράσματα της εργασίας.

## 2. Επιδημιολογία των Λυμάτων

### 2.1 Εισαγωγή

Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα βασίζεται στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των ουσιών που προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο αποβάλλονται είτε αυτούσιες είτε ως μείγμα μεταβολιτών στα ούρα και τα κόπρανα. Τα οικιακά λύματα καταλήγουν στο αποχετευτικό σύστημα, το οποίο αποτελεί κεντρικό τμήμα των αναπτυγμένων πόλεων και σε επιτόπια συστήματα. Στα κεντρικά συστήματα αποχέτευσης, τα λύματα μεταφέρονται σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων για επεξεργασία και απομάκρυνση πριν από την απόρριψη, την επαναχρησιμοποίηση ή την τελική τους διάθεση. Τα ανεπεξέργαστα λύματα περιέχουν όλα τα μεταβολικά κατάλοιπα των ουσιών που καταναλώνονται από την κοινωνία που εξυπηρετεί το δίκτυο αποχέτευσης. Σύμφωνα με την επιδημιολογία των λυμάτων τα αστικά λύματα αποτελούν μια πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την αξιολόγηση των ανθρώπινων συνηθειών και συγκεκριμένων σεναρίων στην πληθυσμού.

Οι μέθοδοι παρακολούθησης των υγρών αποβλήτων θα μπορούσαν να περιγραφούν ως μια σημαντική ποσότητα εξέτασης ούρων αφού τα λύματα ενός συνόλου αντιπροσωπεύουν ανώνυμα τα δείγματα ούρων αρκετών χιλιάδων ανθρώπων (Kasprzyk-Hordern, 2014).

Ο Daughton (2001) διατύπωσε την έννοια της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα ενώ η έννοια αυτή πρωτο-εφαρμόστηκε το 2005 από τους Zuccato και Castiglioni προκειμένου να εκτιμηθεί η χρήση του ναρκωτικού κοκαΐνη σε διάφορες ιταλικές πόλεις. Από τότε και ως σήμερα, πληθώρα ερευνητικών ομάδων έχουν εφαρμόσει την έννοια της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα, του Daughton, ώστε να εκτιμήσουν την ποσότητα ναρκωτικών σε άτομα σε περιφερειακή, εθνική και διεθνή κλίμακα.

Η ταχεία πρόοδος στον τομέα αυτό οφείλεται κυρίως σε διεθνείς συνεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, το 2011 ιδρύθηκε η ομάδα SCORE, η οποία συγκεντρώνει επαγγελματίες που ασχολούνται με την ανάλυση των παράνομων ναρκωτικών από διάφορες ευρωπαϊκές χώρες με στόχο τη διεξαγωγή διεθνούς έρευνας σχετικά με τη σύγκριση της χρήσης παράνομων ναρκωτικών μεταξύ μεγάλων ευρωπαϊκών πόλεων και την αξιολόγηση των διαφορετικών διαδικασιών ανάλυσης που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά εργαστήρια. Με την υποστήριξη του Ευρωπαϊκού Κέντρου Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Τοξικομανίας, η SCORE συγκρότησε ένα διευρυμένο δίκτυο το οποίο επέστρεψε για πρώτη φορά να πραγματοποιηθεί μια διεθνής μελέτη με στόχο την ανάλυση των υγρών

αποβλήτων και την εκτίμηση της ποσότητας ναρκωτικών που βρίσκονται σε αυτά (Kasprzyk-Hordern, 2014).

Οι επιδημιολογικές προσεγγίσεις με βάση τα λύματα έχουν χρησιμοποιηθεί και στεφθεί με επιτυχία για την παρακολούθηση πολλών ιών (παθογόνων) όπως είναι η ηπατίτιδα Α, ο ιός της πολιομυελίτιδας και ο πολιοϊός και ο νοροϊός (Poliovirus και Norovirus) (Orive, Lertxundi, & Barcelo, 2020)

Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία εφαρμογών του κλάδου επιδημιολογίας των λυμάτων επικεντρώνεται στην παρακολούθηση κατανάλωσης φαρμάκων, η εν λόγω μεθοδολογία δύναται να αντλήσει πληροφορίες σχετικά με άλλες συνήθειες (π.χ. κατανάλωση ουσιών) και γενικότερα να αναλυθεί ο τρόπος ζωής μιας κοινωνίας ή ενός πληθυσμού αρκεί να χρησιμοποιούνται κατάλληλοι βιοδείκτες. Φερειπείν, σε κάποιες πόλεις ευρωπαϊκές προκειμένου να αναλυθεί η ποσότητα κατανάλωσης καφεΐνης χρησιμοποιείται η ανάλυση των λυμάτων. Επίσης, επιδημιολογικές προσεγγίσεις με τη χρήση λυμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηριστούν οι διατροφικές συνήθειες ενός πληθυσμού, η γενική την κατάσταση της υγείας και τον βαθμό έκθεσης σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς ρύπους. Αυτό σημαίνει ότι τα αστικά λύματα δύναται να θεωρηθούν ως ένα μέσο διάγνωσης της κατάστασης μιας πόλης, ενός πληθυσμού ή μιας κοινωνίας (Τζαβάρα, 2022).

## **2.2 Προσέγγιση της Επιδημιολογίας με βάση τα Λύματα ως Εργαλείο Εποπτείας (Water Based Epidemiology – WBE)**

Ο κλάδος της επιδημιολογίας ως εργαλείο εποπτείας των λυμάτων έχει απύθμενες δυνατότητες και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως ένα συμπληρωματικό εργαλείο για την κλινική παρακολούθηση ενός πληθυσμού. Ακόμη, χρησιμοποιείται για να εντοπίσει και τα ποσοστά χρήσης παράνομων ναρκωτικών ουσιών (αναφορά γίνεται στην επόμενη ενότητα) σε μεγάλους πληθυσμούς.

Ο τομέας υγείας ανά τους καιρούς έχει χρησιμοποιήσει διάφορες τακτικές ώστε να παρακολουθεί τα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας ενώ ο εντοπισμός των διάφορων κρουσμάτων (ύποπτα) βασίζονται γενικά στην κλινική παρακολούθηση. Εν αντιθέσει, στην επιδημιολογία με βάση τα λύματα, δύναται να εντοπιστούν ύποπτα και μη ύποπτα κρούσματα, συμπτωματικά και ασυμπτωματικά (Aguilar-Oliveira, et al., 2020).

Ήταν το 1854 όταν ο John Snow συνέδεσε με σαφήνεια την έξαρση της χολέρας στην περιοχή Broad Street του Λονδίνου με τη μόλυνση του νερού από μια δημόσια αντλία με

λύματα. Τα αποτελέσματα του Snow ήταν θεμελιώδη για την αντιμετώπιση της εξάπλωσης της νόσου. Έδειξαν επίσης έμμεσα ότι το νερό των λυμάτων περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς από τον πληθυσμό της συγκεκριμένης λεκάνης απορροής που εξυπηρετείται. Μόλις το 1939 αποδείχθηκε ότι η ιδέα αυτή ήταν αποτελεσματική στην παρακολούθηση της εξάπλωσης του ιού της πολιομυελίτιδας. Στη συνέχεια, το 2005, η ανάλυση των λυμάτων χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της ευρείας χρήσης κοκαΐνης σε συγκεκριμένο πληθυσμό, γεγονός που έδειξε εμμέσως ότι η παρακολούθηση των λυμάτων μπορεί να επεκταθεί από τους παθογόνους μικροοργανισμούς στην ευρεία χρήση ναρκωτικών και φαρμακευτικών προϊόντων (nature.com, 2023).

Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα χρησιμοποιούνταν εδώ και αρκετές δεκαετίες, πριν ακόμη εκδηλωθούν διάφορες πανδημίες, προκειμένου να εντοπίζονται τα ποσοστά ναρκωτικών και παθογόνων ιών στα λύματα. Ειδικά σήμερα, όπου ο ιός SARS-CoV-2 υφίσταται, η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται τακτικά ειδικά σε σεμινάρια πανδημίας (π.χ. Covid – 19), όπου οι πόροι είναι μειωμένοι και η παρακολούθηση των κρουσμάτων σε εργαστηριακό επίπεδο μη εφικτή.

Φυσικά, η παρακολούθηση των λυμάτων της εκάστοτε περιοχής εξαρτάται και από το σύστημα αποχέτευσης της. Για παράδειγμα σε μερικές χώρες δεν υφίστανται εκτεταμένα ή αρκετά έστω, κεντρικά συστήματα αποχέτευσης και η εφαρμογή της μεθόδου αυτής δεν είναι εφικτή. Μάλιστα, σε χώρες αναπτυσσόμενες όπου το εισόδημα είναι μεσαίο και κυρίως χαμηλό, τα συστήματα αποχέτευσης είναι επιτόπια (λ.χ. λάκκοι για χρήση αποχωρητηρίων, κάδοι, σηπτικές δεξαμενές κ.α.) και συνεπώς η μελέτη των λυμάτων είναι ανέφικτη.

Όπως αναφέρεται από τους (Aguilar-Oliveira, et al., 2020) εφόσον το σύστημα λυμάτων είναι κεντρικό, η επιδημιολογία με βάση τα λύματα αποτελεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο που δύναται να εντοπίσει έγκαιρα τους παθογόνους μικροοργανισμούς ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει και τον εντοπισμό των τάσεων είτε χρονικών είτε γεωγραφικών είτε και των δύο και την εφαρμογή μέτρων για την προστασία της δημόσιας υγείας σε περιπτώσεις πανδημιών.

Οι Aguilar-Oliveira και συνεργάτες αναφέρουν επίσης ότι τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για την παρακολούθηση των περιβαλλοντικών συνθηκών σε έναν ποταμό ο οποίος έχει μολυνθεί.



Έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος WBE αποτελεί ένα από τα πιο πολύτιμα εργαλεία αξιολόγησης διαφορετικών σεναρίων χρήσης ουσιών, ρύπων και πανδημικών καταστάσεων. Η Castiglioni (2015) αναφέρει τις κυριότερες πιθανές χρήσεις της προσέγγισης WBE που έχουν ως εξής:

- Τοπική, εθνική και διεθνή εκτίμηση των χωρικών διαφόρων,
- Παρακολούθηση των χρονικών τάσεων σε ημερήσια, εβδομαδιαία και ετήσια βάση,
- Παρακολούθηση των αλλαγών στις καταναλώσεις σε διάφορες περιοχές είτε αστικές είτε αγροτικές,
- Αξιολόγηση της χρήσης παράνομων ναρκωτικών ουσιών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς όπως σχολεία, φυλακές κλπ.,
- Εντοπισμός νέων ουσιών όπως για παράδειγμα ψυχοτρόπους ουσίες.

Εκτός από τις παραπάνω χρήσεις δύναται να προστεθεί ακόμη μια, αυτή της πιθανής εφαρμογής της ανάλυσης σεναρίων πανδημιών. Μάλιστα, πολύ πρόσφατα, η εν λόγω μεθοδολογία εφαρμόστηκε για να προβλέψει την παγκόσμια εξάπλωση του ιού SARS-COV-2 (2020).

Μερικά από τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η μέθοδος παρακολούθησης των λυμάτων είναι (Castiglioni, 2015):

- Αντικειμενική εκτίμηση μιας κατάστασης,
- Μπορεί να πραγματοποιηθεί ποιοτική και εν μέρει ποσοτική αξιολόγηση,
- Εκτιμήσεις πραγματοποιούνται σε πραγματικό χρόνο,
- Μπορεί να γίνει λήψη αλλά και επικαιροποιημένη παρακολούθηση της χρήσης ουσιών ή παθογόνων μικροοργανισμών,
- Εντοπισμός νέων μεταβαλλόμενων συνηθειών αλλά και παρουσία νέων ουσιών, ρύπων και άγνωστων παθογόνων μικροοργανισμών σε έναν πληθυσμό.

Στον αντίποδα, οι προκλήσεις που καλείται να αντιμετωπίσει η εν λόγω μέθοδος είναι (Castiglioni, 2015):

- Λήψη παρόμοιων εκτιμήσεων ώστε να γίνει σύγκριση των δεδομένων και αποτελεσμάτων μέσω πρόσθετων δεδομένων,
- Μη αξιοπιστία χαρακτηριστικών των δειγμάτων που λήφθηκαν,
- Χωρικές ασυνέπειες για παράδειγμα αν ο πληθυσμός είναι στάσιμος ή κινητός,
- Τυποποιημένη στρατηγική δειγματοληψίας για την παραγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων/στοιχείων σε διαφορετικές γεωγραφικές κλίμακες.

Ενδεικτικό της σημασίας της επιδημιολογίας των λυμάτων ως εργαλείο περιβαλλοντικής πολιτικής και μέσο προστασίας της δημόσιας υγείας είναι ότι, όπως περιγράφεται πιο αναλυτικά σε επόμενη παράγραφο του κεφαλαίου 2, η πρόταση για την αναθεώρηση της Οδηγίας 91/271 για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων προβλέπει την θέσπιση ενός Εθνικού Φορέα Παρακολούθησης των Λυμάτων για την καταγραφή των συγκεντρώσεων παθογόνων μικροοργανισμών στα ανεπεξέργαστα λύματα (τουλάχιστον SARS-CoV-2 virus and its variants, poliovirus, influenza virus, emerging pathogens, contaminants of emerging concern). Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την παρακολούθηση της χρήσης φαρμάκων και παράνομων ουσιών

Η χρήση της μεθόδου WBE επιτρέπει όπως αναφέρθηκε και στην παραπάνω ενότητα τον εντοπισμό παράνομων ναρκωτικών ουσιών στα λύματα σε έναν πληθυσμό. Κατά τη διάρκεια κατανάλωσης ναρκωτικών, το ανθρώπινο σώμα εκκρίνει βιοδείκτες, οι οποίοι καταλήγουν στα λύματα και ως εκ τούτου προσφέρονται πολύτιμες πληροφορίες για το είδος και την ποσότητα των ναρκωτικών ουσιών που έχουν καταναλωθεί σε μια περιοχή.

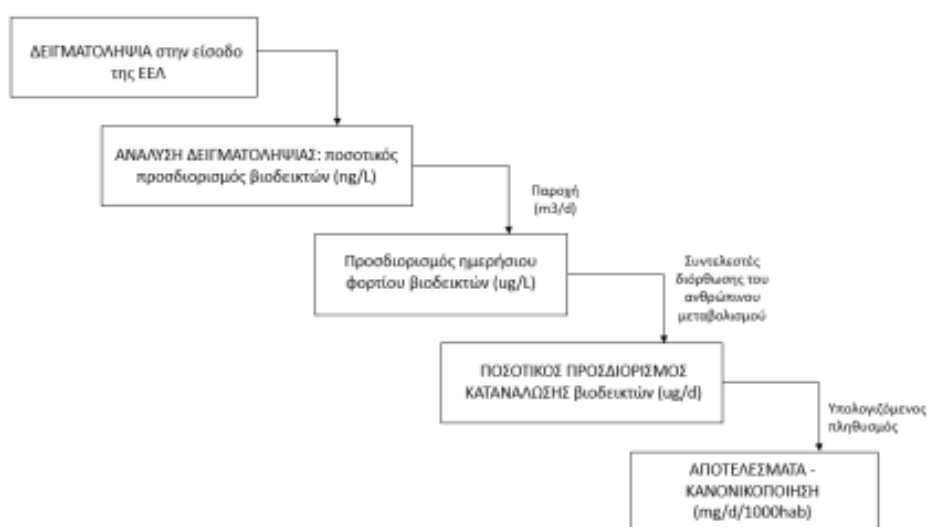
Οι Prichard και συνεργάτες (2015) έχουν πραγματοποιήσει μελέτες σε σημαντικά είδη ναρκωτικών μέσω της WBE, όπως είναι η κάνναβη, η ηρωίνη, η κοκαΐνη κ.α. Ο προσδιορισμός των βιοδεικτών πραγματοποιείται μέσω ειδικών αναλυτικών τεχνικών, οι οποίες επιδιώκουν στον υπολογισμό της ποσότητας κατανάλωσης ναρκωτικών σε μια χρονική περίοδο όπως για παράδειγμα μέσα σε μια ημέρα σε μια περιοχή (Prichard, et al., 2015).

Τα δεδομένα ωστόσο από τη λήψη δειγμάτων στα λύματα δύναται να επηρεαστούν και να χαρακτηριστούν από αβεβαιότητα. Ως εκ τούτου θα πρέπει τα δείγματα που λαμβάνονται να εφαρμόζονται σωστά ώστε η μέθοδος WBE να δώσει ορθά αποτελέσματα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα δείγματα έχουν ως εξής (Bijlsma & et. al, 2018):

- Ο ανθρώπινος μεταβολισμός κατά τη διάρκεια εξέτασης του, κάτω από την επήρεια ουσιών,
- Τύπος συστήματος αποχέτευσης και χαρακτηριστικά,
- Συμπεριφορά των βιοδεικτών από την απέκκριση τους έως την άφιξη τους στα εργοστάσια επεξεργασίας λυμάτων.

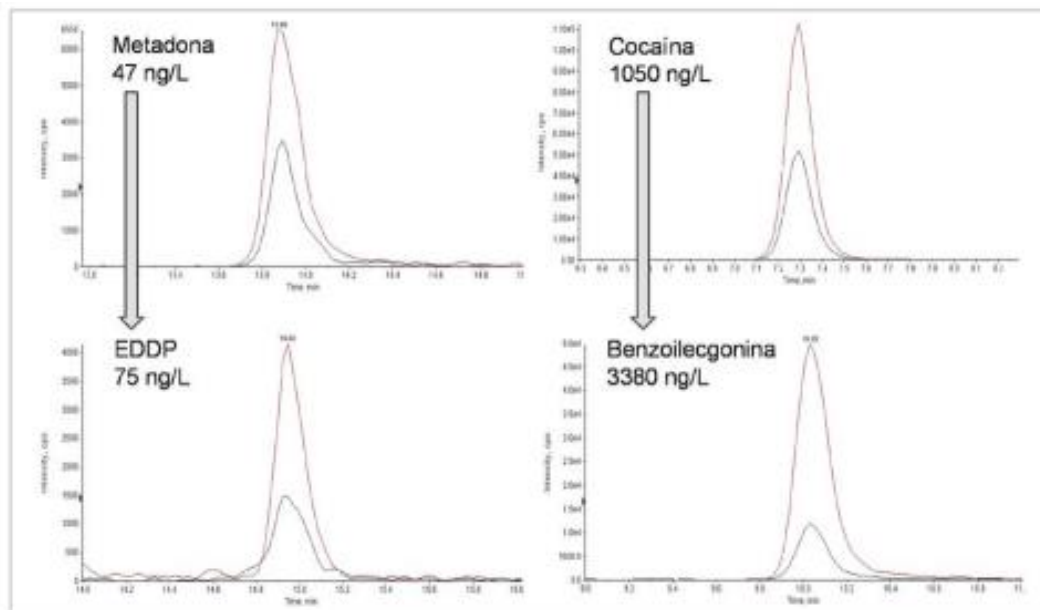
Πρέπει να αναφερθεί ότι η επιδημιολογία με βάση τα λύματα χαρακτηρίζεται από διάφορα στάδια. Αρχικά συλλέγονται κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα από ακατέργαστα λύματα και έπειτα τα υγρά απόβλητα αναλύονται για συγκεκριμένες ουσίες μετρώντας τις

ποσότητες αυτών. Στο επόμενο στάδιο, πολλαπλασιάζονται οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων με τις ημερήσιες τιμές ροής των λυμάτων ώστε να προκύψουν τα ημερήσια φορτία αυτών στους αποχετευτικούς αγωγούς. Μετά η συνολική κατανάλωση ενός φαρμάκου σε ημερήσια βάση προκύπτει μέσω ενός ειδικού διορθωτικού συντελεστή στα ημερήσια φορτία αποθήκευσης. Να τονιστεί ότι ο εν λόγω συντελεστής λαμβάνει υπόψη του το μέσο ρυθμό έκκρισης ενός συγκεκριμένου υπολείμματος φαρμάκου καθώς και το λόγο της μοριακής μάζας του μητρικού φαρμάκου ως προς το μεταβολιτή του. Στο τελευταίο στάδιο οι ημερήσιες τιμές διαιρούνται με τον αριθμό του πληθυσμού που εξυπηρετείται από τη μονάδα επεξεργασίας που μελετάται προκειμένου να προκύψει μια τιμή ανά κεφαλή ώστε να διευκολυνθούν οι συγκρίσεις ανάμεσα των πόλεων. Η εν λόγω τιμή δύναται έπειτα να εκφραστεί με ημερήσιες ποσότητες ανά 1000 κατοίκους (EMCDDA, 2020). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται τα προαναφερθέντα στάδια.



Εικόνα 2. 1: Στάδια επεξεργασίας λυμάτων για την εκτίμηση ουσιών στα λύματα μιας περιοχής ή μονάδας επεξεργασίας λυμάτων (Bijlsma & et. al, 2018)

Στην Εικόνα 2.2. που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά κάποια τυπικά γραφήματα ανίχνευσης βιοδεικτών. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτίμηση των βιοδεικτών είναι αυτή της χρωματογραφίας συνδυαστικά με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) καθώς και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης.



Εικόνα 2. 2: Ανάλυση ουσιών στα λύματα με τη μέθοδο της χρωματογραφίας (Bijlsma & et. al, 2018)

Τροχοπέδη στην ανάλυση αυτή είναι ότι δεν δύναται να παράσχει πληροφορίες αναφορικά με τον επιπολασμό και τη συχνότητα χρήσης ουσιών, τον αριθμό των χρηστών, τους τύπους των χρηστών καθώς και την καθαρότητα των παράνομων ουσιών (EMCDDA, 2020).

### 2.3 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την ανίχνευση και επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), λόγω του ότι πολλές ασθένειες μεταδίδονται με το νερό, περίπου δύο δις άνθρωποι παγκοσμίως καταναλώνουν μολυσμένο νερό. Μάλιστα οι θάνατοι λόγω χρήσης μολυσμένου νερού μπορεί να αγγίζουν και τα 16 εκατομμύρια σε ετήσια βάση. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μεταδίδονται με το νερό οι οποίοι προκαλούν και την ανησυχία των επιστημόνων είναι:

- Βακτήρια (π.χ. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio cholerae*),
- Ιοί (π.χ. νοροϊός, αδενοϊός, πολιοϊός),
- Πρωτόζωα (π.χ. *Cryptosporidium* spp. Και *Giardia* spp),
- Έλμινθες (π.χ. *Ascaris* spp. και *Trichuris* spp).

Η παρακολούθηση των παθογόνων μικροοργανισμών που μεταφέρονται με το νερό κρίνεται απαραίτητη και τα αποτελέσματα της κλινικής επιτήρησης αποτελούν απαραίτητα εργαλεία για την ανίχνευση και την πρόληψη της εξάπλωσης μιας πιθανής επιδημίας (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021). Αναφέρεται ωστόσο ότι ο κλινικός έλεγχος είθισται

να περιορίζεται στα άτομα τα οποία είναι αρκετά άρρωστα προκειμένου να δεχτούν εξέταση και θεραπεία. Συνεπώς υποεκτιμάται ο επιπολασμός της νόσου και η παροχή ενός δείκτη καθυστέρησης για μια περιοχή (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021).

Κατά την επιτήρηση του πόσιμου νερού υφίσταται ένα μειονέκτημα: οι συγκεντρώσεις των παθογόνων μικροοργανισμών είναι παρόντες αλλά σε χαμηλή συγκέντρωση με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία στις αναλύσεις και συνεπώς την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών.

Αναφέρεται επίσης ότι η μέθοδος που μελετάται δύναται να ανιχνεύσει παθογόνους μικροοργανισμούς που εκκρίνονται από τη σίελο, τα πτύελα, τη βλέννα, τον έμετο και το φλέγμα τα οποία είθισται να αποβάλλονται στα υγρά απόβλητα (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021).

Άρα, η επιδημιολογία με βάση τα λύματα σχετίζεται άμεσα με τη λήψη και ανάλυση μεγάλων συνθετικών δειγμάτων όπως περιττώματα, σίελο, πτύελα, βλέννα, φλέγμα, ούρα, δέρμα κ.α. αφού όλα καταλήγουν στο αποχετευτικό σύστημα.

## **2.4 Επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα**

Μετά την απόρριψη μέσω του ρινικού, στοματικού, οισοφαγικού, αναπνευστικού και εντερικού συστήματος, οι ασθενογόνοι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με το περιβάλλον των λυμάτων για ποικίλο χρονικό διάστημα, από μερικές ώρες έως μερικές ημέρες, πριν φθάσουν στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων. Η επιβίωση και η πορεία των ασθενογόνων μικροοργανισμών στα συστήματα αποχέτευσης εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως οι χαρακτηριστικά των αποβλήτων, η παρουσία βιοϋμενίων, η θερμοκρασία, το pH, ο μέσος χρόνος που απαιτείται για τη διέλευσή τους μέσα από το δίκτυο αποχέτευσης, η κατανάλωση νερού και οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία και απολύμανση των αποβλήτων (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021; Hart & Halden, 2020).

Η διαδικασία απολύμανσης στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων συνήθως περιλαμβάνει μια συνδυασμένη προσέγγιση φυσικών λειτουργιών, ακολουθούμενη από βιολογικές και χημικές επεξεργασίες. Γενικά, η δευτεροβάθμια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων μπορεί να αφαιρέσει κατά μέσο όρο το 90% των ιών, αν και τα επίπεδα απομάκρυνσης είναι υψηλά μεταβλητά και απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία, όπως η χλωρίωση, για τη μείωση των επιπέδων ιών σε ασφαλή επίπεδα για την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον (Corbett, Edwards, Leist, & et al, 2020).

Η απολύμανση των λυμάτων είθισται να πραγματοποιείται με τη χρήση χλωρίου. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, ο ιός SARS-COV-1 είναι πιο ευαίσθητος στην απολύμανση σε σύγκριση με τον E. Coli, καθώς πλήρως απενεργοποιείται με δόση 10 mg/L χλωρίου ή 20 mg/L διοξειδίου του χλωρίου (Corbett, Edwards, Leist, & et al, 2020).

Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη στην Ιταλία ανέφερε την ανίχνευση του ιού SARS-COV-2 σε ακατέργαστα λύματα, αλλά όχι σε λύματα που έχουν υποστεί τριτοβάθμια επεξεργασία. Επιπλέον, μια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία κατέδειξε μια 100πλάσια μείωση του ιϊκού φορτίου μέσω της διαδικασίας της επεξεργασίας. Αυτό υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα αυτού του σταδίου επεξεργασίας για τη μείωση του φορτίου παθογόνων μικροοργανισμών (Τζαβάρια, 2022).

## **2.5 Οφέλη της προσέγγισης της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών**

Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα επιτρέπει σε μια περιοχή ή μια κοινότητα να ανιχνεύει έγκαιρα κρούσματα ασθενειών χωρίς να απαιτείται η δαπάνη χρόνου αλλά και οικονομικών πόρων που σχετίζονται με την παρακολούθηση κλινικών δοκιμών. Η συνεχής και συστηματική παρακολούθηση των παθογόνων μπορεί να ωφελήσει τη δημόσια υγεία παρέχοντας έγκαιρα προειδοποιητικά σημάδια και πληροφορίες σχετικά με τη χρονική και χωρική εξάπλωση της λοίμωξης σε διάφορες περιοχές (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021).

Μια σημαντική εφαρμογή αυτής της προσέγγισης είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την αξιολόγηση της εφαρμογής υγειονομικών μέτρων. Έχει χρησιμοποιηθεί, για παράδειγμα, για να αναλυθεί ο ευεργετικός αντίκτυπος που είχε ο αποκλεισμός που επιβλήθηκε στο Παρίσι στις 17/03/2020 στην εξάπλωση του COVID-19.

Έτσι, μια δειγματοληψία η οποία θα είναι προσεκτικά σχεδιασμένη δύναται να εντοπίσει και να παρακολουθήσει τις ευαίσθητες κοινωνικές ομάδες όπως για παράδειγμα οίκοι ευγηρίας κ.α. Παράλληλα, μια προσεκτική δειγματοληψία μπορεί να προχωρήσει στη δημιουργία χαρτών συστάδων ασθενειών ώστε να προκύψουν μοτίβα της νόσου και επομένως στην εφαρμογή παρεμβάσεων για τη δημόσια υγεία (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021).

## **2.6 Προκλήσεις της προσέγγισης της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα για την επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών**

Η εφαρμογή της προσέγγισης WBE για την παρακολούθηση των παθογόνων μικροοργανισμών αντιμετωπίζει ορισμένες προκλήσεις προκειμένου να επιτύχει αποτελεσματική επιτήρηση.

Οι συγκεντρώσεις των παθογόνων μικροοργανισμών στα υγρά απόβλητα ποικίλλουν εποχιακά και καθημερινά λόγω διάφορων παραγόντων, όπως ο επιπολασμός της νόσου, η ηλικία και η κατάσταση της υγείας στις κοινότητες, ο ρυθμός απόβλησης των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω των εκκρίσεων όπως οι ρινικές, στοματικές, οισοφαγικές, αναπνευστικές και κοπρανώδεις εκκρίσεις, κλιματικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς και η χρήση νερού και οι πρακτικές διαχείρισης των λυμάτων. Η κατανόηση αυτών των παραγόντων είναι σημαντική για τη βελτίωση της προγνωστικής αξίας της τεχνικής αυτής (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021).

Τονίζεται δε ότι θα πρέπει να κατανοηθεί πλήρως ο τρόπος με τον οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αποβάλλονται μέσα από τις ρινικές, στοματικές, οισοφαγικές, αναπνευστικές και κοπρανώδεις εκκρίσεις από τα μολυσμένα άτομα. Ο τρόπος με τον οποίο αποβάλλονται και οι ποσότητες αυτών είναι μείζονος σημασίας και θα πρέπει να υπάρχει η δέουσα προσοχή ώστε να μπορεί να μοντελοποιηθεί ο αριθμός των λοιμώξεων σε μια κοινότητα ή μια περιοχή (Zahedi, Monis, Deere, & Ryan, 2021).

Η αποτελεσματική ανάκτηση και συγκέντρωση των παθογόνων μικροοργανισμών στα υγρά απόβλητα πριν από την ανάλυση είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη αξιόπιστης ανίχνευσης. Η ανάκτηση απαιτεί τη χρήση κατάλληλων μεθόδων για την εξαγωγή των μικροοργανισμών από το περιβάλλον και τη συγκέντρωσή τους σε δείγματα που θα υποβληθούν σε ανάλυση. Αυτή η διαδικασία πρέπει να είναι αποτελεσματική και να εξασφαλίζει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και ακρίβεια.

Επιπλέον, η κατανόηση των ορίων ανίχνευσης στην επιδημιολογία βάσει των λυμάτων είναι σημαντική. Αυτό αναφέρεται στον καθορισμό του κατώτατου αριθμού περιπτώσεων που πρέπει να είναι θετικές σε μια κοινότητα προκειμένου να μπορεί να ανιχνευθεί με βεβαιότητα σε μια ευρύτερη γεωγραφική περιοχή. Η καθορισμένη αυτή τιμή είναι σημαντική για να ερμηνευθούν σωστά τα αποτελέσματα και να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα. Ως εκ τούτου αποτελεί μείζονος σημασίας να κατανοηθεί πλήρως η μολυσματικότητα, ο χρόνος ημιζωής καθώς και η επιβίωση των παθογόνων

μικροοργανισμών στα λύματα. Επίσης σημαντικό είναι να διερευνηθεί ο χρόνος της διαδρομής του μικροοργανισμού από την απόρριψη του έως την εγκατάσταση επεξεργασίας (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021; Hart & Halden, 2020).

## **2.7 Δεοντολογικοί προβληματισμοί σχετικά με την σχετική προσέγγιση**

Παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα των μελετών έχει επικεντρωθεί στην ανάλυση της κατανάλωσης ναρκωτικών από τον πληθυσμό, ορισμένες μελέτες έχουν υιοθετήσει μια επιδημιολογική προσέγγιση που εστιάζει σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα με περιορισμένη κάλυψη, όπως φυλακές, νοσοκομεία, σχολεία και χώρους εργασίας (Prichard, και συν., 2015).

Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη έρευνας στον τομέα της δεοντολογίας σχετικά με αυτήν την τεχνική, κυρίως λόγω του ότι δεν συλλέγονται προσωπικά δεδομένα που μπορούν να αντιστοιχηθούν σε συγκεκριμένα άτομα. Επομένως, γενικά θεωρείται ότι η τεχνική αυτή δεν εγείρει υψηλούς δεοντολογικούς κινδύνους. Πάντως, οι Prichard και συν. (2015) υπογραμμίζουν ότι απαιτείται προσοχή και εποπτεία από επιτροπές δεοντολογίας.

Στην Ευρώπη και την Αυστραλία, ερευνητές έχουν αναπτύξει ένα ειδικό έγγραφο με οδηγίες δεοντολογίας το οποίο θα μειώσει τους κινδύνους για τα ευάλωτα άτομα καθώς και άλλες ομάδες και το οποίο θα συμβάλλει στη διατήρηση της καλής φήμης του εν λόγω τομέα (Prichard, και συν., 2015).

Υπάρχουν τρεις δεοντολογικές ανησυχίες στην εν λόγω έρευνα. Αυτές είναι:

Η διασφάλιση της συγκατάθεσης των συμμετεχόντων μετά από ενημέρωση,

Ο καθορισμός των περιστάσεων με τις οποίες δύναται να χρησιμοποιηθούν ανώνυμα δεδομένα δίχως τη συγκατάθεση των συμμετεχόντων,

Την προστασία της εμπιστευτικότητας των ευαίσθητων πληροφοριών.

Στην πλειοψηφία των ερευνών για φάρμακα, οι επιπτώσεις στην αυτονομία των ατόμων που συμμετέχουν είναι ελάχιστη και έτσι οι συμμετέχοντες δεν διατρέχουν σοβαρό κίνδυνο βλάβης. Συνεπώς η έρευνα της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα αποσκοπεί στο όφελος της κοινωνίας. Παρόλα αυτά να αναφερθεί ότι αιωρείται ο κίνδυνος βλάβης σε κάποιες περιπτώσεις (Prichard, και συν., 2015).



Πιο συγκεκριμένα, εάν δημοσιευθούν λανθασμένα ή εντυπωσιοθηρικά στοιχεία αναφορικά με αυτού του είδους την ανάλυση που εφαρμόζεται σε πληθυσμιακές μελέτες, δύναται να οδηγήσει σε συναισθηματικές βλάβες και να ενισχύσει τον στιγματισμό και την ετικετοποίηση ευάλωτων ατόμων ή ομάδων. Φερεπειν, μπορεί να δημιουργηθεί μια αρνητική αντίληψη για ένα ευάλωτο προάστιο αναφέροντας την κατανάλωση ναρκωτικών εκεί. Παρόμοια αποτελέσματα μπορεί να παρατηρηθούν σε μελέτες που διεξάγονται σε άλλους επίσης χώρους, π.χ. νοσοκομεία, σχολεία, φυλακές και εργασιακούς χώρους. Οι επιπτώσεις δεν περιορίζονται μόνο στην ντροπή ή την αμηχανία που μπορεί να προκληθεί, αλλά μπορεί να υπάρξουν και κοινωνικές και οικονομικές ζημίες. Είναι απαραίτητο να διαφυλάσσεται η ανωνυμία των δεδομένων, να διαμορφώνεται μια αποτελεσματική επικοινωνία των αποτελεσμάτων της έρευνας μέσω των μέσων ενημέρωσης και να λαμβάνεται η έγκριση της επιτροπής δεοντολογίας της ανθρώπινης έρευνας.

## **2.8 Κόστος που σχετίζεται με την επιτήρηση της προσέγγισης**

Το κόστος που σχετίζεται με αυτήν την προσέγγιση είναι άμεσα εξαρτώμενο από το μέγεθος αλλά και το σχεδιασμό της μελέτης. Σε θεωρητικό επίπεδο, το μεγαλύτερο κόστος αυτών των ερευνών σχετίζονται με τις μελέτες που βασίζονται στα λύματα. Πιο συγκριμένα, το αυξημένο κόστος οφείλεται στον απαιτούμενο χρόνο για την επαφή με την τοπική μονάδα επεξεργασίας λυμάτων και το εργαστήριο και έπειτα για το σχεδιασμό μιας κατάλληλης εκστρατείας (EMCDDA, 2020).

Το κόστος της συλλογής δειγμάτων είναι άμεσα εξαρτώμενο από τις εγκαταστάσεις και τους πόρους που διαθέτει η τοπική μονάδα επεξεργασίας λυμάτων. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το κόστος για τη συλλογή των δειγμάτων είθισται να είναι χαμηλό, και το μεγαλύτερο μέρος υποκύπτει στο ανθρώπινο δυναμικό που συλλέγει τα δείγματα των λυμάτων (EMCDDA, 2020).

Σύμφωνα με το EMCDDA (2020), το κόστος ανάλυσης των δειγμάτων διαφέρει από χώρα σε χώρα, ωστόσο ένα εύρος τιμών είναι τα 100-200€ ανά δείγμα. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, το κόστος εξαρτάται από τον αριθμό των απαιτούμενων δειγμάτων.

## **2.9 Κοινοτική Οδηγία 91/271/ΕΟΚ**

Η Οδηγία 91/271/ΕΟΚ «για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων» αποσκοπεί στην προστασία του υδάτινου περιβάλλοντος της Ευρωπαϊκής Ένωσης από τις δυσμενείς επιπτώσεις των αστικών λυμάτων ενώ θεσπίζει και τους κανόνες που εφαρμόζονται σε όλη την Ένωση για τη συλλογή, την επεξεργασία και την απόρριψη των λυμάτων.

Τα βασικά σημεία της οδηγίας αυτής είναι ότι οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης θα πρέπει (271/91, 1991):

- Να συλλέγουν και να επεξεργάζονται λύματα στα αστικά κέντρα με πληθυσμό κατά τουλάχιστον 2000 ατόμων και να εφαρμόζονται δευτεροβάθμιες επεξεργασίες στα συλλεχθέντα δείγματα,
- Να γίνεται εφαρμογή προηγμένης επεξεργασίας σε αστικά κέντρα με πληθυσμό πάνω από 10000 άτομα σε καθορισμένες ευαίσθητες περιοχές,
- Να διασφαλίζεται ότι οι σταθμοί επεξεργασίας να συντηρούνται σωστά προκειμένου να εξασφαλίζονται επαρκείς αποδόσεις και να μπορούν να λειτουργούν υπό όλες τις συνήθεις τοπικές κλιματικές αλλαγές,
- Να λαμβάνουν μέτρα για τον περιορισμό της ρύπανσης των υδάτων υποδοχής από υπερχειλίσεις ομβρίων υδάτων σε ακραίες καταστάσεις, όπως ασυνήθιστη καταρρακτώδης βροχή,
- να παρακολουθούν τις επιδόσεις των σταθμών επεξεργασίας και των υδάτων υποδοχής,
- να παρακολουθούν τη διάθεση και επαναχρησιμοποίηση της λυματολάσπης.

Ουσιαστικά, η οδηγία αυτή ορίζει την ελάχιστη αναγκαία τεχνική υποδομή στα δίκτυα αποχέτευσης και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων που πρέπει να διαθέτουν οι πόλεις και οι οικισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ανάλογα με τον ισοδύναμο πληθυσμό και τον αποδέκτη των επεξεργασμένων λυμάτων και διακρίνοντας τους υδάτινους αποδέκτες στους οποίους καταλήγουν τα αστικά λύματα σε τρεις κατηγορίες: σε κανονικούς, ευαίσθητους και λιγότερο ευαίσθητους. Επίσης καθορίζει τα ανώτατα επιτρεπτά όρια των ποιοτικών χαρακτηριστικών των επεξεργασμένων λυμάτων που πρέπει να επιτυγχάνονται στις εκροές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων και παράλληλα προβλέπει συγκεκριμένα χρονικά όρια μέσα στα οποία οι οικισμοί, που εμπίπτουν στις διατάξεις της, οφείλουν να ολοκληρώσουν την απαιτούμενη σε κάθε περίπτωση υποδομή συλλογής, επεξεργασίας και διάθεσης των αστικών τους λυμάτων (Μαμάης, 2023).

Η Οδηγία επίσης καθορίζει το απαιτούμενο επίπεδο επεξεργασίας των λυμάτων όσον αφορά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία ενώ σε ευαίσθητες περιοχές θα πρέπει να εφαρμόζεται η τριτοβάθμια επεξεργασία.

Η εν λόγω Οδηγία εφαρμόζεται εδώ και τριάντα περίπου έτη και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή προωθεί προτάσεις για την αναθεώρηση της οδηγίας. Οι προτάσεις στοχεύουν προς την αντιμετώπιση νέων προκλήσεων που σχετίζονται με την κλιματική αλλαγή, τις νέες

τεχνολογίες, τους νέους ρύπους, την αναγκαιότητα της συμβολής στη νέα πράσινη οικονομία για μια κυκλική και αποδοτική οικονομία ως προς τους πόρους καθώς και την προώθηση καινοτόμων τεχνολογιών.

Στους στόχους της αναθεωρημένης Οδηγίας εκτός από την περιβαλλοντική προστασία περιλαμβάνονται η προστασία της δημόσιας υγείας, η μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, βελτίωση της διακυβέρνησης και της διαφάνειας, τακτική παρακολούθηση παραμέτρων που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία (COVID).

Πιο συγκεκριμένα το νέο άρθρο «Εθνικό Πρόγραμμα Παρακολούθησης Αστικών Λυμάτων» θεσπίζει ένα εθνικό σύστημα παρακολούθησης των αστικών λυμάτων για την παρακολούθηση κατάλληλων παραμέτρων δημόσιας υγείας στα αστικά λύματα από τα κράτη μέλη. Για το σκοπό αυτόν, τα κράτη μέλη θα πρέπει να δημιουργήσουν, το αργότερο έως την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου 2025 μια δομή συντονισμού μεταξύ των αρχών που είναι αρμόδιες για τη δημόσια υγεία και για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων. Η δομή αυτή θα καθορίσει τις παραμέτρους που πρέπει να παρακολουθούνται (τουλάχιστον SARS-CoV-2 virus and its variants, poliovirus, influenza virus, emerging pathogens, contaminants of emerging concern), τη συχνότητα παρακολούθησης και την εφαρμοστέα μέθοδο. Για όλους τους οικισμούς με 100,000 ισοδύναμο πληθυσμό (ι.π) και άνω, τα κράτη μέλη θα πρέπει επίσης να παρακολουθούν τακτικά τη μικροβιακή αντοχή στην είσοδο και έξοδο των ΕΕΛ τουλάχιστον 2/έτος (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2023).

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται συνοπτικά οι νέες προτάσεις και τα χρονικά περιθώρια για την αλλαγή της Οδηγίας.

Πίνακας 2. 1: Συνοπτική απεικόνιση των δυνατικών προτάσεων για την αναβάθμιση της Κοινοτικής Οδηγίας 271-91/ΕΟΚ (Μαμάης, 2023)

	2025	2030	2035	2040
<b>Υπερχείλισεις λόγω όμβριων και υπερχειλίσεις από αστικές απορροές παντορροικών δικτύων</b>	Έχει ξεκινήσει η παρακολούθηση	Ολοκληρωμένα σχέδια για οικισμούς > 100 k ι.π. + περιοχές υπό κίνδυνο	Έχει ξεκινήσει η εφαρμογή των ολοκληρωμένων σχεδίων για οικισμούς σε κίνδυνο μεταξύ 10 και 100 k ι.π.	Ισχύει ενδεικτικός στόχος ΕΕ για όλους τους οικισμούς > 10 k ι.π.
<b>Μεμονωμένα κατάλληλα συστήματα (ΜΚΣ)</b>	Τακτική επιθεώρηση σε όλα τα κράτη μέλη + υποβολή εκθέσεων για τα κράτη μέλη με πολλά ΜΚΣ	Δευτεροβάθμια ή Τριτοβάθμια Επεξεργασία		
<b>Μικροί οικισμοί</b>	Νέα όρια 1 000 ι.π.	Όλοι οι οικισμοί > 1 000 ι.π. συμμορφώνονται		
<b>Άζωτο και φώσφορος</b>	Προσδιορισμός των περιοχών σε κίνδυνο (οικισμοί 10 έως 100 κ.ι.π.)	Ενδιάμεσος στόχος απομάκρυνσης Ν/Ρ στο 50% ΕΕΛ > 100 κ ι.π. + νέα πρότυπα	Απομάκρυνση Ν/Ρ σε όλες τις εγκαταστάσεις άνω των 100 κ ι.π. + ενδιάμεσος στόχος για τις περιοχές σε κίνδυνο	Πραγματοποιείται απομάκρυνση Ν/Ρ σε όλες τις περιοχές σε κίνδυνο (μεταξύ 10 και 100 κ ι.π.)
<b>Μικρορύποι</b>	Θέσπιση προγραμμάτων διευρυμένης ευθύνης του παραγωγού	Έχουν προσδιοριστεί οι περιοχές που διατρέχουν κίνδυνο (10 έως 100 κ ι.π.) + 50% ΕΕΛ > 100 κ ι.π.	Εξοπλισμός όλων των εγκαταστάσεων άνω των 100 κ ι.π. + ενδιάμεσος στόχος για τις περιοχές σε κίνδυνο	Όλες οι εγκαταστάσεις περιοχών σε κίνδυνο διαθέτουν εξελιγμένα συστήματα επεξεργασίας
<b>Ενέργεια</b>	Ενεργειακοί έλεγχοι για όλες τις εγκαταστάσεις άνω των 100 κ ι.π.	Έλεγχοι για όλες τις εγκαταστάσεις άνω των 10 κ ι.π. + 50% των ΕΕΛ	Ενδιάμεσος στόχος ενεργειακής ουδετερότητας 75% των ΕΕΛ	Επίτευξη ενεργειακής ουδετερότητας και αντίστοιχης μείωσης αερίων θερμοκηπίου

Στην Ημερίδα που πραγματοποιήθηκε μεταξύ 07-09/06/2023 με τίτλο «Προκλήσεις που προκύπτουν στη διαχείριση των αστικών λυμάτων από την επικείμενη αναθεώρηση της Οδηγίας 91/271» υπήρξαν προτάσεις βελτίωσης της υφιστάμενης Οδηγίας 91/271, οι οποίες έχουν ως εξής (ΕΜΠ, 2023):

- Έχουν παρατηρηθεί ασάφειες οι οποίες θα πρέπει να διευκρινιστούν και σε ορισμένες περιπτώσεις οι τεκμηριώσεις είναι ανεπαρκείς.
- Στο άρθρο 2 ο ορισμός του οικισμού θεωρείται αυστηρός (>1 άτομα/στρέμμα) και δύναται να οδηγήσει σε αυξημένα κόστη δικτύων.
- Για τα μεμονωμένα συστήματα επεξεργασίας κρίνεται σκόπιμο να διατηρηθεί ο όρος «ίδια περιβαλλοντική προστασία» αντί της νέας απαίτησης για δευτεροβάθμια ή τριτοβάθμια επεξεργασία. Η νέα πρόταση θα δυσκολευτεί να εφαρμοστεί στα υφιστάμενα μεμονωμένα συστήματα επεξεργασίας ενώ κρίνεται δύσκολο αρκετά και η συστηματική καταγραφή καθώς και έλεγχος συμμόρφωσης των ιδιωτικών συστημάτων.
- Θα πρέπει να γίνει επεξήγηση του φορτίου που αναφέρεται στο άρθρο 5 της Οδηγίας που αφορά τα όμβρια και την υπερχειλίση των παντορροικών δικτύων καθώς και η επέκταση της καταληκτικής ημερομηνίας εφαρμογής του εν λόγω άρθρου πέρα από το 2035/2040.

- Αναφορικά με το νέο άρθρο 7 που αφορά στην τριτοβάθμια επεξεργασία, το αναμενόμενο πρόσθετο κόστος διαφαίνεται να ξεπερνά κατά πολύ το αντίστοιχο περιβαλλοντικό όφελος. Για το λόγο αυτό γίνεται πρόταση να διατηρηθούν τα υφιστάμενα όρια σε όλες της μεγάλες μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (>100,000 PE) και ανά περίπτωση επέκταση του ΕΕΛ (10,000-100,000 PE) κατά περίπτωση και όταν προκύπτει σημαντικό περιβαλλοντικό όφελος.
- Οι στόχοι της ενεργειακής κατανάλωσης βρίσκονται σε αντίφαση με τις απαιτήσεις της 4βάθμιας επεξεργασίας λυμάτων καθώς και των αυξημένων απαιτήσεων για τριτοβάθμια επεξεργασία. Θα πρέπει να προστεθεί στο άρθρο 11 ότι οι ΑΠΕ δύναται να βρίσκονται και εκτός των χωρικών ορίων της ΕΕΛ και στην πράσινη ενέργεια να υπολογίζεται επίσης και η αγοραζόμενη πράσινη ενέργεια.
- Το άρθρο 9 της Οδηγίας αναφέρει ότι απαιτείται μια πολύπλοκη διαδικασία για την υλοποίηση της αρχής «ο ρυπαίνων πληρώνει». Για το λόγο αυτό προτείνεται η παράταση της καταληκτικής ημερομηνίας για την εφαρμογή του άρθρου 9 πέραν από το 2035/2040.
- Τα χρονικά περιθώρια κρίνονται ως «στενά» (15-17 έτη). Έτσι, όλες οι καταληκτικές ημερομηνίες θα πρέπει να μελετηθούν και να επαναπροσδιοριστούν και σε κάθε περίπτωση βάσει την ημερομηνία εφαρμογής της νέας οδηγίας.
- Για τη χρηματοδότηση των νέων θα πρέπει να διατεθούν ακόμη και κοινοτικοί πόροι της ΕΕ.

## 3. Ο Ιός SARS-COV2

### 3.1 Οι Ιοί Γενικά

Οι ιοί είναι μικροσκοπικοί μολυσματικοί παράγοντες οι οποίοι περιέχουν γενετικό υλικό, είτε DNA είτε RNA και εισβάλλοντας σε ένα ξενιστή δύνανται να πολλαπλασιαστούν. Οι ιοί μπορούν να μολύνουν ζωικά, φυτικά ή βακτηριακά κύτταρα και να αναπαραχθούν μέσω του ζωντανού οικοδεσπότη. Όταν ένας ιός εισβάλλει σε ένα κύτταρο, εισάγει το γενετικό του υλικό στον οικοδεσπότη και χρησιμοποιεί τη μηχανή του κυττάρου για να αναπαραχθεί. Αυτή η αναπαραγωγή μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ασθενειών. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι ιοί προκαλούν ασθένειες ενώ λόγω αυτών, αρκετές πανδημίες έχουν γραφτεί στην ανθρώπινη ιστορία ανά τους καιρούς. Πρόσφατα παραδείγματα μάλιστα είναι η πανδημία της γρίπης των χοίρων (*Influenza* ή *swine flu*) που έπληξε την Ευρώπη το 2009, το ξέσπασμα του ιού «Ebola» στη Δυτική Αφρική το 2014, και φυσικά την πιο πρόσφατη που «παρέλυσε» τη γη, εκείνη της πανδημίας του Covid-19 που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 2019 και συνεχίζει ως σήμερα. Παρά το γεγονός ότι οι ιοί αποτελούν εχθρό στον άνθρωπο, την επιστημονική και ιατρική κοινότητα, παίζουν ρόλο μείζονος σημασίας αφού λειτουργούν ως ερευνητικά εργαλεία που έχουν βοηθήσει την περαιτέρω κατανόηση των βασικών κυτταρικών διεργασιών και τον τρόπο αντιμετώπισης τους (Vidyasagar, 2022)

### 3.2 Είδος Ιών

Πριν παρουσιαστούν τα είδη των ιών θα πρέπει αρχικά να αναφερθούμε στην καταγωγή των ιών. Υφίστανται τρεις κύριες θεωρίες αναφορικά με την καταγωγή των ιών. Βασιζόμενοι στην υπόθεση της παλινδρόμησης ή σμίκρυνσης (1<sup>η</sup> θεωρία), οι ιοί ξεκίνησαν ως μικρά κύτταρα και παρομοίως με τα βακτήρια όπως για παράδειγμα τα χλαμύδια, μολύνουν τα μεγαλύτερα κύτταρα. Τα εν λόγω κύτταρα έχασαν τη μεταβολική τους ικανότητα καθώς και το μεγαλύτερο μέρος της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και συνεπώς ήταν αδρανή εκτός του κυτταρικού τους περιβάλλοντος. Το αποτέλεσμα αυτού ήταν τα κύτταρα αυτά να εξαρτώνται από τα κυτταρικά μονοπάτια προκειμένου να αναπαραχθούν. Έπειτα υφίσταται η θεωρία της διαφυγής ή της κυτταρικής θεωρίας η οποία σχετίζεται με τα κινητά στοιχεία όπως είναι τα ρετροτρανσποζόνια. Αυτά τα στοιχεία απέκτησαν γονίδια τα οποία είχαν τη δυνατότητα να κωδικοποιούν τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες του καψιδίου και διαφύγαν από το αρχικό τους κυτταρικό περιβάλλον με αποτέλεσμα να αναπαράγονται σε άλλα κύτταρα. Η τρίτη θεωρία αφορά τη θεωρία της

συν-εξέλιξης ή αλλιώς του πρωταρχικού ιού στην οποία τα κύτταρα και οι ιοί εξελίχθηκαν παράλληλα (Ζαφειρόπουλος, Καρακασιλιώτης, Μπελούκας, Σουρβίνος, & Σπανάκης, 2020)

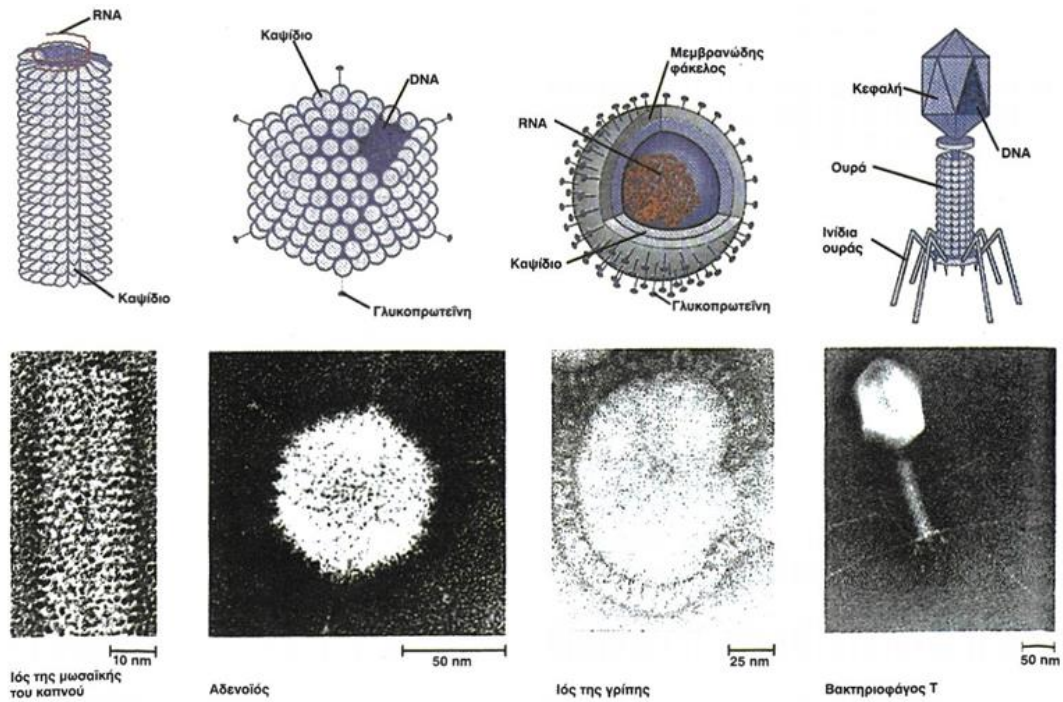
Στην παρακάτω εικόνα διαφαίνονται οι κύριες διαφορές μεταξύ ιών και βακτηρίων.

Πίνακας 1 <b>Ιοί και Βακτήρια</b>	<b>Βακτήρια</b>	<b>Ιοί</b>
Μέγεθος	Μεγαλύτερο	Μικρότερο (20-400nm)
Μπορούν να παρατηρηθούν με οπτικό μικροσκόπιο.	Ναι	Όχι εκτός από τους ποξϊούς και τους μιμηϊούς
Ανάπτυξη σε τεχνητά θρεπτικά υλικά.	Ναι	Όχι
Περιέχουν DNA και RNA	Ναι	Όχι
Διαίρεση με διχοτόμηση	Ναι	Όχι
Περιέχουν ριβοσώματα	Ναι	Όχι
Περιέχουν μουραμικό οξύ	Ναι	Όχι
Ευαίσθησία στα αντιβιοτικά	Ναι	Όχι
Κινητικότητα	Ναι/Όχι	Όχι

Εικόνα 3. 1: Κύριες διαφορές μεταξύ ιών και βακτηρίων (Ζαφειρόπουλος, Καρακασιλιώτης, Μπελούκας, Σουρβίνος, & Σπανάκης, 2020)

Άρα οι ιοί είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί που συνθέτουν mRNA το οποίο αφορά ουσιαστικά ριβοσώματα του ξενιστή. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν χιλιάδες ιικά σώματα (σωμάτια) υπάρχουν μόνο επτά (7) τύποι ιικών γονιδιωμάτων, Η σύνθεση και η δομή τους παρουσιάζουν όμως τεράστια ποικιλομορφία (Αναστασοπούλου, 2020).

Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζονται πιο κοινοί τύποι ιών



Εικόνα 3. 2: Οι πιο κοινοί τύποι ιών

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι πιο συχνοί και κοινοί ιοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο είναι (ΠΟΥ, 2023):

- COVID-19
- Influenza – Ιός της γρίπης
- HIV - AIDS
- Meningitis – Μηνιγγίτιδα/βακτηριακή μηνιγγίτιδα
- Pneumonia – Πνευμονία
- Human papillomavirus (HPV) – Ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων
- Herpes – Έρπης
- Rotavirus – Ροταϊός
- Chicken Pox – Ανεμοβλογιά

### 3.1.2 Τρόπος Μετάδοσης Ιών

Οι ιοί μπορούν να μεταδοθούν από έναν οργανισμό σε άλλον με διάφορους τρόπους. Οι κύριοι τρόποι μετάδοσης ιών περιλαμβάνουν (CDC, 2023) :

- Επαφή από άτομο σε άτομο: Οι ιοί μεταδίδονται συχνά μέσω άμεσης επαφής με έναν μολυσμένο άτομο. Αυτή η μετάδοση μπορεί να γίνει μέσω ανταλλαγής



σωματικών υγρών (όπως σάλιο, αίμα ή εκκρίσεις), αγκαλιάς, φιλιού, κοινής χρήσης αντικειμένων ή επαφής με μολυσμένες επιφάνειες.

- Αέρας: Ορισμένοι ιοί μεταδίδονται μέσω της αναπνοής, όταν ένα μολυσμένο άτομο εκπέμπει μικροσωματίδια που περιέχουν τον ιό. Αυτά τα μικροσωματίδια μπορεί να εισπνευστούν από άλλα άτομα στον ίδιο χώρο, μεταδίδοντας τον ιό.
- Ραγδαία μετάδοση: Ορισμένοι ιοί, όπως οι ιοί της γρίπης και ο SARS-CoV-2, μεταδίδονται εύκολα και γρήγορα μέσω μικροσωματιδίων που εκπέμπονται από τον ασθενή κατά την κατάποση, το φτέρνισμα ή τη βήχα.
- Μετάδοση μέσω τροφής και νερού

### 3.3 Λοιμώδεις Ασθένειες

Σήμερα υπάρχουν πολλές λοιμώδεις ασθένειες που προκαλούνται είτε από ιούς είτε από βακτήρια και παράσιτα είτε και από άλλους μικροοργανισμούς. Μερικές από τις λοιμώδεις ασθένειες είναι οι μολυσματικές ασθένειες, οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια όπως η σύφιλη και το αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα, και οι ιογενείς όπως ο HPV και η ηπατίτιδα, παρασιτικές όπως η ψώρα, ή μυκητιασικές λοιμώξεις όπως η καντιντίαση. Άλλες λοιμώδεις ασθένειες είναι η μαλάρια (ελονοσία), η πνευμονική φλεγμονώδη νόσο, και η βακτηριδιακή κολπίτιδα.

Οι λοιμώδεις ασθένειες δεν είναι κάτι νέο αλλά υπήρχαν στην ιστορία εδώ και αιώνες. Από τους πιο καταστροφικούς που αποδεκάτισαν ολόκληρους πληθυσμούς είναι ο τύφος, η πανούκλα, η χολέρα, η μαύρη πανώλη, η φυματίωση, η ισπανική γρίπη, η πανδημία γρίπης H1N1, και ο νέος κορονοϊός.

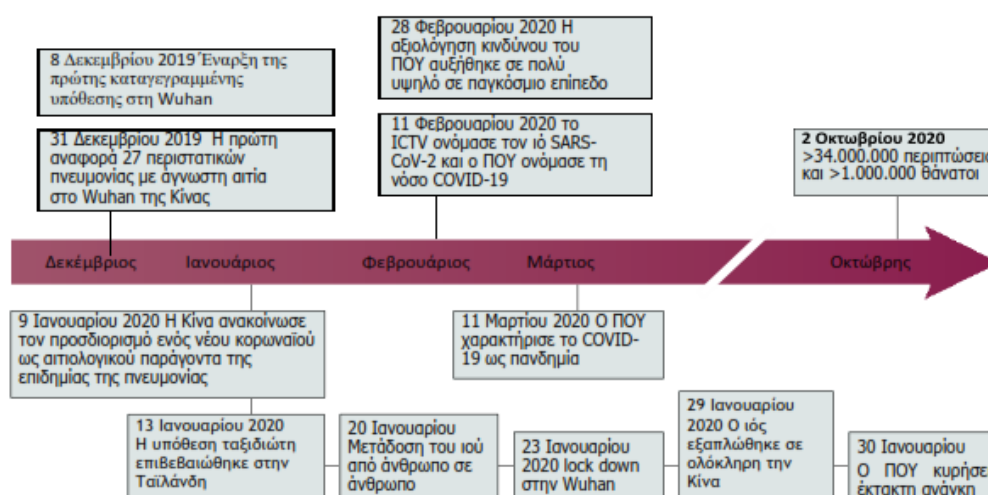
### 3.4 Ο Ιός SARS CoV-2

Ακόμη μια διαφορετική ομάδα ιών που πλήττουν τους ζωικούς οργανισμούς και είναι ικανοί να προκαλέσουν ακόμη και σοβαρές αναπνευστικές λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι αυτοί των κορονοϊών. Εν έτη 2002 και 2012 αντίστοιχα εμφανίστηκαν δύο εξαιρετικά παθογόνοι κορονοϊοί, οι SARS-CoV και MERS-CoV, προξενώντας σοβαρές λοιμώξεις στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου, καθιστώντας έτσι την ύπαρξή τους ως ένα νέο πρόβλημα για την δημόσια υγεία. Ορμώνοντες το 2019, ένα νέο είδος κορονοϊού, SARS-CoV-2, γνωστή και ως *Covid-19* ή απλά *Covid* κάνει την εμφάνισή του στην πόλη Wuhan της Κίνας, σπέρνοντας μια ασυνήθιστη για τα ιατρικά δεδομένα ιογενή πνευμονία. Ο εν λόγω νέος κορονοϊός εξαπλώνεται με ταχύτατους ρυθμούς μολύνοντας ολόένα και περισσότερους ανθρώπους και φτάνοντας στα επίπεδα μιας νέας παγκόσμιας πανδημίας.

Οι πρώτες δημοσιευμένες μελέτες για τον εν λόγω ιό εμφανίστηκαν στα τέλη Ιανουαρίου του 2020 όταν ο νέος κορονοϊός ήταν ακόμη γνωστός με την ονομασία «2019-nCoV» (Chan, et al., 2020).

Η επίσημη ονομασία του νέου κορονοϊού είναι «σοβαρό αναπνευστικό σύνδρομο» ή «*Severe Acute Respiratory Syndrome*» ήτοι SARS και η ονοματοδοσία αυτή ήταν λόγω του ότι ο πλησιέστερος συγγενικός ιός του είναι αυτός του SARS-CoV (2002).

Έως σήμερα ο κορονοϊός είναι υπεύθυνος για περίπου 675,000,000 κρούσματα ενώ οι θάνατοι που έχουν προκληθεί από τον ιό *Covid-19* είναι 6,866,482 ([COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center \(jhu.edu\)](https://www.jhu.edu/covid19/map)). Οι κύριες προσπάθειες μέχρι στιγμής επικεντρώνονται στον εμβολιασμό των ατόμων μέσω Εθνικών Εκστρατειών Εμβολιασμού, τη χρήση προστατευτικής μάσκας και γαντιών καθώς και τη διαπροσωπική επαφή όπου αυτό μπορεί να επιτευχθεί, την προώθηση τηλεργασίας. Παρά τα μέτρα ασφαλείας που σε εισαγωγικά επιβάλλονται και προτείνονται θα πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή στα μελλοντικά κρούσματα της νόσου αφού αρκετά από αυτά είναι ασυμπτωματικά κρούσματα μόλυνσης από τον κορονοϊό. Τα εν λόγω κρούσματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σημαντική πηγή μετάδοσης του ιού ενώ ο αξιόπιστος έλεγχος και η ταχεία ανίχνευση όλων των νέων περιπτώσεων κρουσμάτων αποτελεί πρόκληση (Day, 2020).



Εικόνα 3. 3: Χρονοδιάγραμμα των βασικών γεγονότων της πανδημίας Covid-19 (Μαρκόπουλος, 2021) από (Hu, Guo, Zhou, & Shi, 2021)

Είναι ενδιαφέρον ότι οι συγκεντρώσεις διαφορετικών ουσιών στα λύματα παρέχουν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες αναφορικά με τη δραστηριότητα των κατοίκων σε μια δεδομένη λεκάνη απορροής λυμάτων κυρίως με τη χρήση φαρμάκων (Choi, et al., 2018).

Μάλιστα, ο ιός SARS-CoV-2 έχει απομονωθεί από τα κόπρανα και τα ούρα εντός τριών ημερών από τη μόλυνση (Holdshue, et al., 2020). Σε μια μελέτη που αξιολόγησε τη δυναμική του ιού στην επαρχία *Zhejiang* της Κίνας, παρατηρήθηκε ότι η διάμεση διάρκεια του ιού στα κόπρανα ήταν 22 ημέρες (διατεταρτημόριο εύρος 17-31 ημέρες), η οποία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από ό,τι στους αναπνευστικούς αεραγωγούς (18 ημέρες ) και δείγματα ορού (16 ημέρες) (Zheng, et al., 2020).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ιός SARS δύναται να επιβιώσει μερικές μέρες έξω από το ανθρώπινο σώμα, μετρήσεις σε λύματα θα μπορούσαν να προσφέρουν ένα έγκυρο αλλά και συμπληρωματικό εργαλείο για την προληπτική παρακολούθηση και διάγνωση του ιού. Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Medema et al. (2020), το RNA του SARS-CoV-2 ανιχνεύτηκε σε δείγματα λυμάτων πριν αναφερθεί οποιοδήποτε κρούσμα, υποδηλώνοντας ότι η παρακολούθηση του ιού θα μπορούσε να είναι εφικτή πριν τεκμηριωθούν τα κρούσματα μέσω του συστήματος επιτήρησης της υγείας (Medema, Heijnen, Elsinga, Italiaander, & Brouwer, 2020). Ακόμη μια έρευνα που δημοσιεύθηκε το 2020 ανέφερε ότι δείγματα που συλλέχθηκαν από τα λύματα στο Παρίσι κατά το διάστημα 05/03/2020-07/04/2020, αποκάλυψε ότι η αύξηση των μονάδων γονιδιώματος SARS-CoV-2 ακολουθήθηκε από την αύξηση του αριθμού των θανατηφόρων κρουσμάτων που καταγράφηκαν τόσο σε περιφερειακό όσο και σε εθνικό επίπεδο (Wurtzer, Marechal, Mouchel, & Moulin, 2020).

Αξίζει να αναφερθεί πως η δειγματοληψία, η διατήρηση και η επεξεργασία των δειγμάτων που συλλέγονται από τα λύματα, είναι κρίσιμα ζητήματα ενώ η ανίχνευση του ιού σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα λύματα είναι πρόκληση. Ορισμένα αρχικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με βάση το νουκλεϊκό οξύ και η ψηφιακή εξέταση PCR-RT σταγονιδίων ενός σταδίου μπορεί να ρίξουν φως στον ποσοτικό προσδιορισμό του ιού. Αυτές οι προσεγγίσεις έχουν ιδιαίτερη σημασία αλλά και ευαισθησία, ωστόσο είναι χρονοβόρες, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό καθώς και μια μακρά περίοδο επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων. Εκτός από τα παραπάνω, προκειμένου να αναλυθούν τα αποτελέσματα της μοριακής εξέτασης PCR, απαιτείται παροχή ρεύματος και άλλων πρόσθετων εργαλείων, ήτοι ακόμη ένας περιορισμός, για το λόγω αυτό αναπτύχθηκαν εξετάσεις οι οποίες δεν απαιτούσαν τα εν λόγω όπως για παράδειγμα τα *self-test* και *rapid test*<sup>1</sup>. Μια παρόμοια εξέταση εφαρμόστηκε με επιτυχία

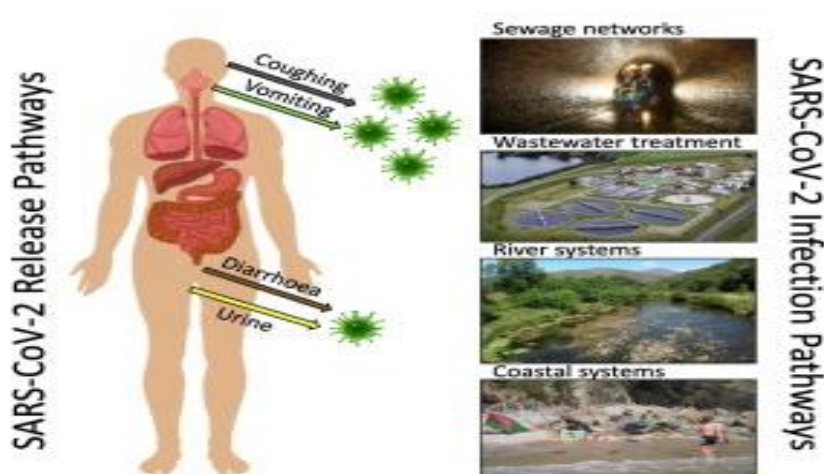
---

<sup>1</sup> Τα *self* και *rapid test* αφορούν αυτοδιαγνωστικά τεστ ταχείας ανίχνευσης αντιγόνου. Μέσω της διαδικασίας αυτής ο κάθε άνθρωπος μπορεί να αυτό-διαγνωσθεί με απλό τρόπο βοηθώντας σημαντικά στο να σταματήσει η εξάπλωση του ιού. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η προστασία

για τη διάγνωση της ελονοσίας μέσω της απλής εξέτασης αίματος. Μάλιστα τα αποτελέσματα της εξέτασης παρείχαν υψηλή ποιότητα και ταχύτερη ακρίβεια σε σχέση με την εξέταση PCR (Reboud, et al., 2019).

### 3.5 Η Εμφάνιση του SARS CoV-2 στα Λύματα

Η επιδημιολογία με βάση τα λύματα ολοένα και αυξάνει προσοχή ιδιαίτερα στην εποχή που διανύουμε ειδικά τα τελευταία 2.5 και πλέον έτη, αυτή την πανδημίας Covid-19. Ο έλεγχος των λυμάτων αποτελεί ένα συμπληρωματικό εργαλείο για την παρακολούθηση του επιδημιολογικού επιπέδου στις κοινότητες καθώς και την ανίχνευση της τάσης στη δυναμική της εξάπλωσης του ιού. Ο έλεγχος των λυμάτων βασίστηκε το γεγονός ότι τα μολυσμένα άτομα εκκρίνουν το RNA του SARS-CoV-2, κυρίως μέσω των κοπράνων, το οποίο εν συνεχεία μεταφέρεται μέσω του αποχετευτικού συστήματος στις Μονάδες Επεξεργασίας Λυμάτων (ΜΕΛ) και δύναται να εντοπιστεί σε δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων (Jones, Baluja, & Graham, 2020). Η Εικόνα 3.4 απεικονίζει τα προαναφερθέντα.



Εικόνα 3. 4: Γραφική απεικόνιση των «εξόδων» του ιού από τον ανθρώπινο σώμα το οποίο RNA καταλήγει στα λύματα (Jones, Baluja, & Graham, 2020)

Κατά συνέπεια, δείγματα λυμάτων που αποκτώνται από την είσοδο των ΜΕΛ θεωρούνται ως αντιπροσωπευτικά πληθυσμιακά δείγματα που κατοικούν σε μια ολόκληρη λεκάνη απορροής. Η παρακολούθηση της εξάπλωσης του SARS-CoV-2 μέσω των μετρήσεων στα λύματα δύναται να αποτελεί μια οικονομικά αποδοτική προσέγγιση που δεν επηρεάζεται από προκαταλήψεις και περιορισμούς που εμφανίζονται στις συμβατικές πρακτικές επιτήρησης (π.χ. χωρικές και χρονικές διαφορές στις συμπεριφορές αναζήτησης υγείας, ρυθμός δειγματοληψίας, ιχνηλάτηση επαφών, έλεγχος κ.λπ.) (Larsen & Wigginton, 2020).

της Δημόσιας Υγείας ανιχνεύοντας ασυμπτωματικούς φορείς του ιού SARS - CoV -2 εύκολα, γρήγορα και αξιόπιστα (<https://self-testing.gov.gr/>)

Υποστηρίζεται γενικά, ότι οι ενεργοί φορείς του ιού σε μια κοινότητα που εξυπηρετείται από συγκεκριμένη ΜΕΛ, δύναται να υπολογιστούν εκ των υστέρων από τα λύματα μέσω μετρήσεων. Τα αποτελέσματα εξάγονται από μια συνάρτηση που ενσωματώνεται τη συγκέντρωση του RNA του SARS-CoV-2 που ανιχνεύτηκε σε δείγματα λυμάτων από μια λεκάνη απορροής, τη ροή των λυμάτων, την αναλογία αποσύνθεσης του SARS-CoV-2 RNA στα λύματα καθώς και το ρυθμό απέκκρισης του SARS-CoV-2 RNA από μολυσμένα άτομα (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021).

Ωστόσο, η ακριβής εκτίμηση των παραπάνω χαρακτηρίζεται ως περίπλοκη έχοντας ένα βαθμό αβεβαιότητας (Li, Zhang, & Shi, 2021). Παράλληλα θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι αναλυτικές αβεβαιότητες σχετικά με την απόλυτη ποσοτικοποίηση του RNA του SARS-CoV-2 στα λύματα. Πάντως, υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρουν συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα SARS-CoV-2 στα λύματα και των δεικτών που σχετίζονται με την εξάπλωση του ιού.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι οι ποσοτικές εκτιμήσεις του ιικού φορτίου στα λύματα δύναται να συνδεθούν με επιδημιολογικούς δείκτες όπως η σωρευτική επίπτωση, ο εκτιμώμενος επιπολασμός<sup>2</sup> περιόδου και τα ποσοστά νοσηλείας (Medema, Heijnen, Elsinga, Italiaander, & Brouwer, 2020). Ο προσδιορισμός του μεγέθους, η χρονική συνέπεια και η γενίκευση αυτών των συσχετίσεων σε διαφορετικά περιβάλλοντα, παραμένει ένα κρίσιμο ζήτημα που πρέπει να διευκρινιστεί αν η αξιολόγηση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα (WBE) αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο παρακολούθησης της πορείας του ιού. Επιπλέον, ορισμένες αναφορές παρουσιάζουν ότι ο έλεγχος των λυμάτων μπορεί να λειτουργήσει ως κρίσιμο εργαλείο έγκαιρης προειδοποίησης (Wu, Xiao, & Zhang, 2020).

---

<sup>2</sup> Στην επιδημιολογία, ο **επιπολασμός** είναι η αναλογία ενός συγκεκριμένου πληθυσμού που διαπιστώνεται ότι επηρεάζεται από μια ιατρική κατάσταση (συνήθως μια ασθένεια ή έναν παράγοντα κινδύνου όπως το κάπνισμα ή τη μη χρήση της ζώνης ασφαλείας). Ουσιαστικά αφορά το ποσοστό του πληθυσμού που διαπιστώνεται ότι πάσχει από κάποια νόσο (<https://www.efsa.europa.eu/el/glossary/prevalence>)

## **4. Προσδιορισμός του ιού SARS CoV- 2 στα Αστικά Λύματα**

### **4.1 Εφαρμογή της Επιδημιολογίας με Βάση τα Λύματα - (WBE) για την Ανίχνευση του SARS CoV-2**

Η ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 με τη μέθοδο WBE χρησιμοποιείται ως μια πρόσθετη προσέγγιση στις κλινικές δοκιμές και λειτουργεί ως ένδειξη προειδοποίησης για τη ταχεία διάδοση του ιού στις κοινότητες (Barcelo, 2020). Η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει τόσο τα συμπτωματικά όσο και τα ασυμπτωματικά άτομα, παρέχοντας ένα ευρύ φάσμα δεδομένων που μπορεί να ενσωματώσει τους ασυμπτωματικούς ανθρώπους στην κρίσιμη αξιολόγηση της πραγματικής επιδημιολογικής κατάστασης και της μοντελοποίησης για το μέλλον. Αυτή η μέθοδος έχει προταθεί για την παρακολούθηση του μεγέθους και της κατανομής του ιού SARS-CoV-2 στις κοινότητες μέσω της δοκιμής των ιογενών βιοδεικτών σε δείγματα που συλλέγονται από το αποχετευτικό δίκτυο. Εκτός από την εφαρμογή της ως εργαλείο για την έγκαιρη προειδοποίηση στην περίπτωση ανίχνευσης ιογενούς φορτίου, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία θερμικών χαρτών που καθορίζουν τη διανομή του ιογενούς φορτίου σε μια κοινότητα (Gonzalez, et al., 2020; Hamouda, Mustafa, Maraqa, Rizvi, & Hassan, 2020).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ένα καίριο κλειδί για την αντιμετώπιση και πρόληψη της εξάπλωσης της πανδημίας Covid-19 είναι η διεξαγωγή συνεχών δοκιμών για την έγκαιρη ανίχνευση του ιού. Ωστόσο, οι χώρες με χαμηλότερα ή μεσαία εισοδήματα αντιμετωπίζουν προκλήσεις στην πραγματοποίηση συχνών και εκτενών δοκιμών λόγω περιορισμένης πρόσβασης σε απαιτούμενα κιτ και άλλους σημαντικούς πόρους. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρακολούθηση του ιού SARS-CoV-2 μέσω της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα αποτελεί μια οικονομικά προσιτή λύση για αυτές τις χώρες. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, μπορούμε να κατανοήσουμε έμμεσα την επιδημιολογική κατάσταση και την εξάπλωση των ιογενών λοιμώξεων στον πληθυσμό. Ανιχνεύοντας την ποσότητα του ιικού γενετικού υλικού που εκκρίνεται στα λύματα από τους ανθρώπους, μπορούμε να προσεγγίσουμε τη σχετική επικράτηση της μόλυνσης σε έναν πληθυσμό. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από αυτήν την μέθοδο είναι χρήσιμες για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη δημόσια υγεία. Αυτή η προσέγγιση αποτελεί πρόκληση ακόμη και για ανεπτυγμένες χώρες, ειδικά σε περιοχές που δεν διαθέτουν αποτελεσματικά αποχετευτικά δίκτυα (Pandey, et al., 2021).

## 4.2 Φορτία SARS-COV-2 στα Λύματα

Έχει επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα του γαστρικού, δωδεκαδακτύλου και ορθού επιθηλίου μολύνονται από τον ιό SARS-CoV-2 και η απελευθέρωση των μολυσματικών ιών στη λεκάνη απορροής υποδηλώνει την πιθανή μετάδοση μέσω κοπράνων (Xiao κ.ά., 2020).

Σε πολλές ερευνητικές μελέτες, ο επιπολασμός της λοίμωξης από τον SARS-CoV-2 εντός της λεκάνης απορροής υπολογίστηκε με ισοζύγιο μάζας για τον συνολικό αριθμό αντιγράφων του ιικού RNA στα δείγματα καθημερινά, όπως μετρήθηκε με την RT-qPCR, καθώς και τον αριθμό των αντιγράφων του RNA του SARS-CoV-2 που εκκρίνονται στα κόπρανα από ένα μολυσμένο άτομο καθημερινά (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021). Η συσχέτιση αυτή μπορεί να εκφραστεί με την ακόλουθη μαθηματική εξίσωση:

$$\text{Μολυσμένα άτομα} = \frac{\left(\frac{\text{Αντίγραφα RNA}}{\text{λίτρα λυμάτων}}\right) * \left(\frac{\text{λίτρα λυμάτων}}{\text{ημέρα}}\right)}{\left(\frac{\text{g περιττωμάτων}}{\text{άτομα} - \text{ημέρα}}\right) * \left(\frac{\text{Αντίγραφα RNA}}{\text{g περιττωμάτων}}\right)}$$

Προκειμένου να υπολογιστεί το εκτιμώμενο ιικό φορτίο, η Hart καθόρισε ένα εύρος κοπρανώδους φορτίου ανάμεσα σε 100-400 γραμμάρια κοπράνων ανά ημέρα ανά άτομο, με πυκνότητα κοπράνων 1,06 mg/L. Αυτό το φορτίο συσχετίζεται με την ποσότητα των ιικών γονιδιωμάτων που εκφράζονται ανά μολυσμένο άτομο, η οποία κυμαίνεται από 56,6 εκατομμύρια έως 11,3 δισεκατομμύρια ανά ημέρα. Αυτό το μαζικό φορτίο μεταφράζεται σε συγκεντρώσεις ιικών γονιδιωμάτων που κυμαίνονται από 0,15 έως 141,5 εκατομμύρια ανά λίτρο λυμάτων που παράγονται στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη.

Η τεχνική η οποία μελετάται στην παρούσα εργασία (WBE) αποτελεί ένα αποδεδειγμένο χρήσιμο εργαλείο προκειμένου να εντοπιστεί η εξάπλωση του ιού SARS-COV-2 στα αρχικά στάδια, ακόμα και αν δεν έχουν δημοσιευθεί επίσημα τα κρούσματα της μόλυνσης σε ορισμένα μέρη. Για παράδειγμα, στην περιοχή Μούρθια στην Ισπανία, πραγματοποιήθηκε έρευνα με βάση την παρακολούθηση των λυμάτων. Οι Randazzo και συνεργάτες (2020) παρακολούθησαν τα λύματα από τις 12/03/2020-14/04/2020 και λάβανε 72 δείγματα συνολικά σε έξι διαφορετικούς σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων. Τα δείγματα μελετήθηκαν και εξετάστηκαν με τη χρήση TaqMan RT-PCR πραγματικού χρόνου. Το 83% των δειγμάτων εισροής ήτοι 35 θετικά δείγματα από τα 42 και το 11% των δειγμάτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας νερού ήτοι 2 από τα 18 δείγματα εξετάστηκαν θετικά για τουλάχιστον έναν στόχο RT-qPCR SARS-COV-2. Από τα δείγματα τριτοβάθμιας εκροής (0

από τα 12) κανένα δεν βρέθηκε θετικό για οποιονδήποτε από τους στόχους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα θετικά κρούσματα ανιχνεύθηκαν σχεδόν δύο εβδομάδες πριν την αναγγελία των κρουσμάτων COVID-19 στους δήμους Lorca, Cieza και Totana της Ισπανίας (Randazzo, et al., 2020).

### **4.3 Μέθοδοι Ανίχνευσης και Μέτρησης της Συγκέντρωσης SARS CoV-2 στα Λύματα**

#### **4.3.1 Δειγματοληψία**

Η διαμόρφωση της δειγματοληψίας είναι κρίσιμη για την ανίχνευση του RNA του ιού SARS-CoV-2. Η συγκέντρωση του RNA ποικίλει καθημερινά, καθώς αλλάζουν ο χρόνος και η συχνότητα της αφόδευσης, καθώς επίσης και η τεχνική και η συχνότητα της δειγματοληψίας (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021). Επιπλέον, ο χρόνος δειγματοληψίας είναι κρίσιμος και εξαρτάται από σημαντικούς παράγοντες,. Για παράδειγμα, μπορεί να υπάρχει καθυστέρηση έως και 24 ωρών για τη μεταφορά των αποβλήτων, μέσω του δικτύου αποχέτευσης ,από μια κατοικία στην εγκατάσταση επεξεργασίας. Σε ορισμένες μεγάλες αστικές περιοχές, για παράδειγμα, μπορεί να υπάρξει καθυστέρηση 24 ωρών για τη μεταφορά των αποβλήτων από το νοικοκυριό σε μια κεντρική εγκατάσταση (Polo, et al., 2020).

Από τα ανωτέρω αντιλαμβάνεται κανείς ότι είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία των λυμάτων που προορίζονται για χημική ανάλυση εντός 24 ωρών. Λόγω της μικρής διάρκειας ημι-ζωής των ανησυχητικών ρύπων, το προφίλ απόκρισης μπορεί να διαφέρει κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ο χρόνος ζωής του SARS-CoV-2, υπό ιδανικές συνθήκες περιβάλλοντος, εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 4,8 και 7,2 ωρών. Παρόλο που η προσέγγιση που αναφέρθηκε είναι σωστή, σύμφωνα με την επιστημονική βιβλιογραφία, η πλειοψηφία των ερευνητικών ομάδων χρησιμοποιεί τη μέθοδο της αρπαγής για τη δειγματοληψία, γεγονός που προκαλεί ανησυχία. Ένας άλλος κρίσιμος παράγοντας είναι ο όγκος του δείγματος, καθώς ένας χαμηλός όγκος δείγματος σε συνδυασμό με χαμηλή ανάκτηση μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελέσματα, κάτι που δεν συμβαίνει στην περίπτωση ενός μεγαλύτερου όγκου δείγματος (Alygizakis, et al., 2020).

#### **4.3.2 Αποθήκευση**

Προκειμένου να σταματήσει η βακτηριακή δραστηριότητα προτείνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων να είναι - 20°C. Παρόλα αυτά η εν λόγω θερμοκρασία μπορεί



να μην είναι η ιδανική για την ανάλυση του ιού. Κατά το πάγωμα και την κατάψυξη του δείγματος, το γενετικό υλικό του ιού υποβαθμίζεται και εν συνεχεία υπάρχει απώλεια ιικού φορτίου με σημαντικές συνέπειες ως προς τα αποτελέσματα που επρόκειτο να αναλυθούν. Το ότι δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο για την αποθήκευση των δειγμάτων μεγαλώνει το πρόβλημα το οποίο πρέπει να αντιμετωπιστεί ταχύτατα. Ρόλο μείζονος σημασίας παίζει και ο χρόνος διάρκειας της αποθήκευσης πριν λάβει χώρα η ανάλυση διότι ο ιός μπορεί στη θερμοκρασία των 20°C να επιβιώσει μόνο για δύο ημέρες. Ωστόσο, σε μικρότερες θερμοκρασίες ήτοι 4°C, ο ιός δύναται να επιβιώσει για σχεδόν δύο εβδομάδες. Τα δείγματα μεταφέρονται στο εργαστήριο με πάγο ενώ κατά την άφιξη των δειγμάτων στο εργαστήριο, αποθηκεύονται στους 4°C μέσα σε 48-72 ώρες (Ahmed et al., 2021). Το συμπυκνωμένο δείγμα δε (όχι το ακατέργαστο λύμα) θα πρέπει να αποθηκεύεται στους -80°C (Alygizakis, και συν., 2020).

#### **4.3.3 Συγκέντρωση του Ιού**

Έως σήμερα διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού εντερικών ιών στα λύματα έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς. Ωστόσο δεν ισχύει το ίδιο και για τον ιό SARS CoV-2. Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι η έλλειψη προτύπων εξωτερικού ελέγχου που να διαθέτουν τις ίδιες ιδιότητες με αυτές του SARS CoV-2. Οι μέθοδοι απορρόφησης και εξαγωγής είναι ικανές ώστε να παρέχουν ταχεία και βραχυπρόθεσμη ανάκτηση του ιού στα λύματα (Alygizakis, και συν., 2020).

Σε ένα πρόσφατο ερευνητικό έργο, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση διαφόρων μεθόδων συγκέντρωσης για την ανίχνευση ενός υποκατάστατου του ιού SARS-CoV-2, γνωστού και ως ιός ηπατίτιδας του ποντικιού, σε ποσότητα 50ml. Από τις μεθόδους που δοκιμάστηκαν, η πιο αποτελεσματική ήταν η χρήση ηλεκτρο-αρνητικής μεμβράνης με την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου (MgCl<sub>2</sub>), η οποία επέδειξε υψηλό ρυθμό ανάκτησης. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη καθώς δεν απαιτεί την προ-επεξεργασία και προ-συγκέντρωση των ιών, ενώ η μεμβράνη παρουσιάζει υψηλή απορροφητικότητα για τους ιούς. Επιπλέον, η χρήση μεγαλύτερης μεμβράνης επιτρέπει την επεξεργασία μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι για αυτούς τους τύπους ιών, υπάρχει μια σχετικά περιορισμένη βάση ερευνητικών εργασιών (Ahmed et al., 2021).

#### **4.3.4 Εκχύλιση και Απομόνωση RNA**

Η απομόνωση του RNA από τον ιό αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για την απόκτηση ενός δείγματος υψηλής ποιότητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση. Με το πέρασμα του χρόνου, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα εμπορικά κιτ εκχύλισης για την απομόνωση

του RNA. Αυτά τα κιτ έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την απομόνωση του RNA από μύκητες και βακτήρια (Alygizakis, και συν., 2020). Η ποιότητα αυτών των κιτ είναι κρίσιμη για την εύκολη ανάκτηση του RNA και την απόδοση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Ο όγκος των συμπυκνωμένων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε πολλές μελέτες κυμαίνεται συνήθως από 140 έως 450 ml. Από αυτές τις ποσότητες δείγματος, εξάχθηκαν 30-100 ml ιικού RNA. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι συγκέντρωσης και εκχύλισης του RNA πρέπει να είναι εξίσου αποτελεσματικές προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική απομόνωση του ιού στα δείγματα υγρών (Ahmed, et al., 2021).

#### **4.3.5 Μέθοδος Αντίστροφης Μεταγραφής Αλυσιδωτής-Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR )**

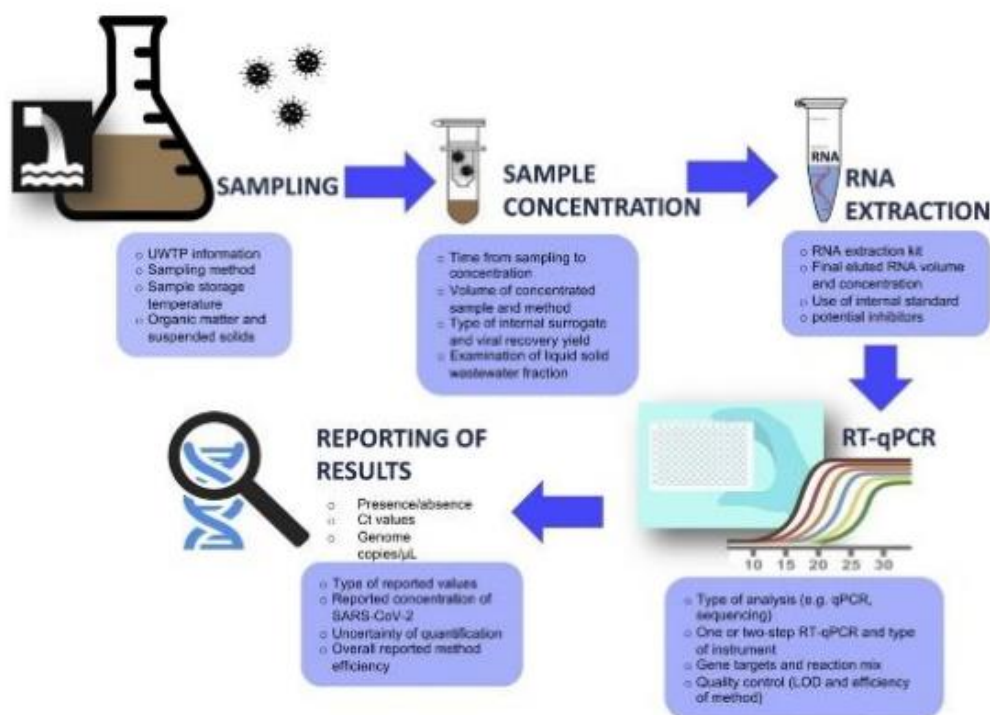
Η εν λόγω μέθοδος αποτελεί την πιο δημοφιλή μέθοδο κατά την παρούσα στιγμή. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται εδώ και σχεδόν μια τριακονταετία, τότε θεωρούνταν αναξιόπιστη. Στην μέθοδο RT-PCR, τα ένζυμα της αντίστροφης μεταγραφής καταλύουν τη σύνθεση του cDNA από το mRNA. Το mRNA στη συνέχεια δρα ως πρότυπο για την ακόλουθη αντίδραση PCR. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητη που σημαίνει ότι αρκεί μια μικρή ποσότητα RNA προκειμένου να προσδώσει ορθά αποτελέσματα (Doak & Zoulikha, 2011).

Μέσω του PCR υπάρχει η δυνατότητα να συλλεχθούν αρκετές πληροφορίες αναφορικά με τους ιούς και να εφαρμοσθούν οι συγκεκριμένες πληροφορίες για την ορθή διεξαγωγή των εμβολιασμών. Δύναται επίσης να ενισχυθούν τα ιικά νουκλεϊκά οξέα και να ανιχνευτούν σε ένα μόνο στάδιο μειώνοντας έτσι τον απαιτούμενο χρόνο για την ανίχνευση του ιού συγκριτικά με άλλες μεθόδους (Pilevar, Kim, & Lee, 2020).

#### **4.3.6 Μέθοδος Αλυσιδωτής Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (RT-qPCR)**

Έπειτα από την εξαγωγή του ιικού RNA, ο ιός δύναται να ανιχνευτεί μέσω της μεθόδου RT-qPCR. Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται ως επί το πλείστο για την ανίχνευση του ιού SARS COV-2 στα λύματα. Για να ανιχνευθεί το ιικό RNA χρησιμοποιούνται ανιχνευτές και εκκινητές μικρών συμπληρωματικών κομματιών DNA. Έχοντας ως δεδομένο ότι το RNA δεν δύναται να ενισχυθεί άμεσα, θα πρέπει αρχικά να γίνει μετατροπή του RNA σε DNA μέσω της αρωγής του ενζύμου RT (Hamouda, Mustafa, Maraga, Rizvi, & Hassan, 2020). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά και υπάρχουν παραδείγματα εφαρμογής όπως για παράδειγμα ο εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός του ιού SARS COV-2 στις αποχετεύσεις στην Μασαχουσέτη, τα αποτελέσματα των οποίων δίνουν τιμές περίπου  $1,04 \cdot 10^3$  αντίγραφα γονιδιώματος ανά λίτρο δείγματος. Η ίδια μέθοδος έχει

εφαρμοστεί και στη Γαλλία, συγκεκριμένα στο Παρίσι σε δείγματα λυμάτων που ήταν ακατέργαστα ενώ τα αποτελέσματα οδήγησαν στο γεγονός ότι υφίστατο μόλυνση τους στην περιοχή αρκετά πριν από την ταχεία εξάπλωση του ιού το 2019 (Corruz et. al., 2020). Παρά το γεγονός ότι η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ιού SARS COV-2, δεν δύναται να γίνει η διάκριση ανάμεσα στα μολυσματικά και αδρανή κλάσματα (Tran, et al., 2020). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται σχηματικά η αναπαράσταση ανίχνευσης του SARS-COV-2 με τη χρήση της μεθόδου RT-qPCR.



Εικόνα 4. 1: Σχηματική απεικόνιση για την ανίχνευση του κορονοϊού με τη χρήση της μεθόδου RT-qPCR ([https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2213343720306552-qa1\\_lrg.jpg](https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2213343720306552-qa1_lrg.jpg))

#### 4.3.7 Μέθοδος Διαχωρισμού Δύο Φάσεων με Βάση την Πολυαιθυλενογλυκόλη PEG

Εν έτη 1960 προτάθηκε για πρώτη φορά η χρήση διαχωρισμού δύο φάσεων με βάση το PEG ώστε να συγκεντρωθούν οι ιοί ανάμεσα σε δύο υδατικές φάσεις. Με την εξέλιξη του χρόνου, η εν λόγω μέθοδος υπέστη αρκετή βελτίωση και βοήθησε στη συγκέντρωση εντεροϊών όπως για παράδειγμα ο ιός SARS COV – 2 από τα υπόγεια ύδατα και λύματα. Σύμφωνα με έρευνες, παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου δύναται να οδηγήσει σε αποτελεσματικότητα έως 72% στην ανίχνευση του ιού της πολιομυελίτιδας από δείγματα λυμάτων. Αυτό οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) να επιλέξει την μέθοδο PEG ως την τυπική διαδικασία ανίχνευσης του ιού. Η μέθοδος αυτή έχει πολλά

πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος, η άμεση δυνατότητα εφαρμογής και η ταχύτητα στα αποτελέσματα. Επίσης, είναι μη καταστροφική για τους ιούς, δηλαδή δεν καταστρέφει τον ιό κατά τη διαδικασία ανίχνευσης. Ωστόσο, το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι πως μπορεί να διαφοροποιείται σε διάφορα δείγματα, και ως αποτέλεσμα, το δείγμα από τα λύματα πρέπει να έχει χαμηλό ή μέτριο ιικό φορτίο για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική συγκέντρωση του ιού κατά τη διαδικασία ανάκτησης (Lu, Huang, Luo, Zhang, & Sha, 2020).

#### **4.3.8 Βιοαισθητήρες**

Οι βιοαισθητήρες είναι εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση χημικών ενώσεων, συνδυάζοντας το οργανικό στοιχείο με ένα φυσικοχημικό δέκτη (Behera, et al., 2020) Έχουν τραβήξει μεγάλη προσοχή λόγω των εξαιρετικών τους χαρακτηριστικών που εξυπηρετούν την παρακολούθηση του περιβάλλοντος, την υγειονομική περίθαλψη και την ανακάλυψη φαρμάκων (Mao, Zhang, & Yang, 2020).

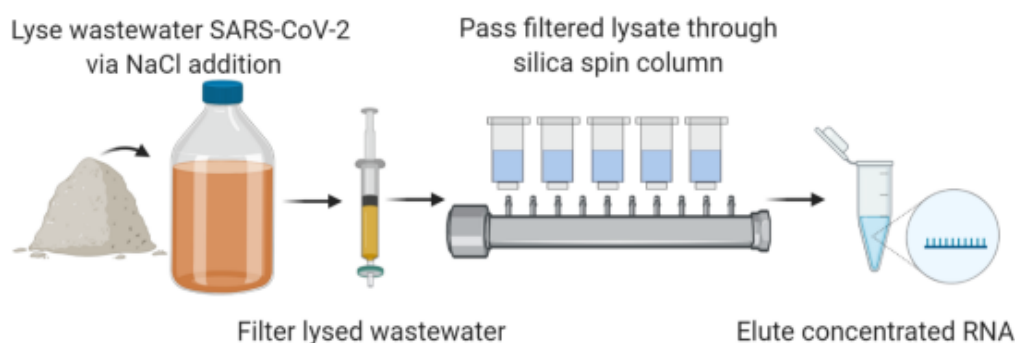
Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από διάφορα συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του βιοαντιδραστήρα, του μορφοτροπέα και των ηλεκτρονικών τμημάτων, όπως ο επεξεργαστής και μια οθόνη (Behera, et al., 2020). Ένα χαρακτηριστικό τους είναι η ταχεία αντίδραση, το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα χρήσης από μη εξιδεικευμένο προσωπικό.

Οι βιοαισθητήρες παρέχουν σημαντικά δεδομένα σε πραγματικό χρόνο σχετικά με την ανάλυση των λυμάτων, καθιστώντας τους ιδανικούς για τους αρμόδιους οργανισμούς. Αυτοί οι βιοαισθητήρες επιτρέπουν την παρακολούθηση των αυξητικών τάσεων των ιών στα λύματα και συνεπώς συμβάλλουν στη δημιουργία αποτελεσματικού συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης για την πρόληψη επιδημιών στις κοινότητες (Mao, et al., 2020). Βασιζόμενοι στον βιομετατροπέα, ο οποίος εκπέμπει σήματα όταν υπάρχουν ιοί στα λύματα, οι βιοαισθητήρες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορους τύπους, όπως οπτικοί, ηλεκτροχημικοί και άλλοι (Behera, et al., 2020).

#### **4.3.9 Μέθοδος 4S**

Έως τώρα, οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού SARS COV -2 στα λύματα, απαιτούν αρκετό χρόνο ενώ είναι και σχετικά δύσκολη η εφαρμογή τους σε ευρεία κλίμακα αφού είναι άμεσα εξαρτώμενες από τα κιτ που υφίσταται στο εμπόριο. Επιπλέον, η πρωτογενής συγκέντρωση απαιτεί την ανάκτηση ενός ανέπαφου ιού και πολύ συγκεκριμένα μέτρα προστασίας. Προκειμένου να ξεπεραστούν τα ανωτέρω, μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αυτή της μεθόδου 4S η οποία ουσιαστικά παστεριώνει

τα δείγματα που έχουν συλλεχθεί από τα λύματα με θερμότητα και έπειτα γίνεται εκχύλιση ώστε η επεξεργασία των λυμάτων μετά τη συλλογή να είναι καλύτερη και πιο ασφαλής (Whitney, et al., 2020).



Εικόνα 4. 2: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου 4S (Whitney, et al., 2020)

Οι Whitney και συνεργάτες, το Δεκέμβριο του 2020, ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο προκειμένου να εξαγονται άμεσα αποτελέσματα του ιού SARS COV – 2 από τα λύματα δίχως την ανάγκη χρήσης ενός κιτ. Η εν λόγω μέθοδος πέρα από την αποτελεσματικότητα της ήταν και οικονομική. Η μέθοδος ονομάστηκε 4S από τα αρχικά των σταδίων ήτοι Sewage (λύματα), Salt (χλωριούχο νάτριο), Silica (Πυρίτιο) & SARS COV – 2. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση χλωριούχου νατρίου, την παστερίωση βάσει θερμότητας, τη διήθηση, την καταβύθιση σε αιθανόλη και τη δέσμευση του ιικού RNA μέσω σπυλών βάσει του διοξειδίου του πυριτίου. Όλα τα ανωτέρω επιτρέπουν την ανάκτηση του ιικού RNA δίχως μάζα και μέγεθος από άλλα βιολογικά σωματίδια από τα λύματα.

Επιπλέον μέσω της 4S σταθεροποιούνται τα νουκλεϊκά οξέα στα λύματα με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου και εδετικού οξέος και επειδή υπάρχει συμβατότητα με τη θερμική παστερίωση, τα δείγματα καθίστανται πιο ασφαλή για περαιτέρω επεξεργασία.

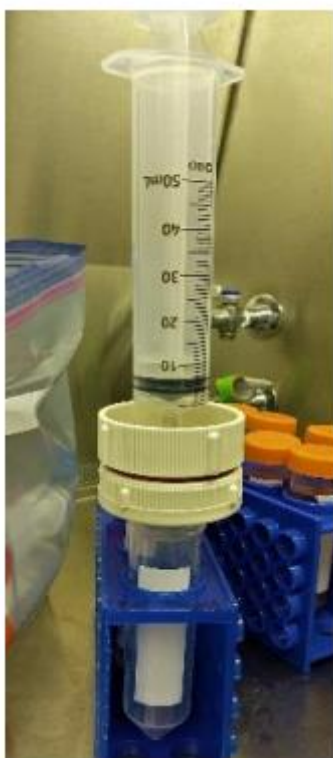
Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τους Whitney και συνεργάτες έγινε εντός 24 ωρών και προέρχονταν από το εργοστάσιο επεξεργασίας λυμάτων του East Bay Municipal Utility District των ΗΠΑ. Αυτά τα δείγματα για να διατηρηθούν κατά τη μεταφορά τους, τοποθετήθηκαν σε πάγο στους 4°C ενώ για την επεξεργασία τους στο εργοστάσιο διατηρήθηκαν στους -80°C.

Για την εξαγωγή του ιικού RNA, πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία: Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε στήλη πυριτίου για την εκχύλιση του ιικού RNA. Έπειτα, τα λύματα υποβλήθηκαν σε διάσπαση, προσθέτοντας χλωριούχο νάτριο με συγκέντρωση 4 M και

εδετικό οξύ σε συγκέντρωση 1 mM. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε θερμική απενεργοποίηση στους 70°C για περίπου 45 λεπτά και ακολούθησε διήθηση χρησιμοποιώντας ειδική μεμβράνη και φίλτρο σύριγγας.

Τα δείγματα πέρασαν μέσα από στήλες πυριτίου και έγινε έκπλυσή τους με δύο διαλύματα. Το πρώτο διάλυμα περιελάβανε χλωριούχο νάτριο σε συγκέντρωση 25 ml και 20% αιθανόλης, ενώ το δεύτερο είχε νάτριο σε συγκέντρωση 50 ml και 80% αιθανόλης. Στη συνέχεια, προστέθηκε πυρίτιο υπό μορφή πολτού στο διηθημένο προϊόν και αφέθηκε για επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο εναιώρημα λύματος-πυριτίου, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στις 4000 x g για 5 λεπτά, με αποτέλεσμα το RNA των λυμάτων να δεσμευτεί στα σωματίδια του πυριτίου.

Ακολούθησε έκπλυση και φυγοκέντριση, με σκοπό το διαχωρισμό του RNA και του πυριτικού σφαιριδίου. Τα δείγματα διαιρέθηκαν σε κλάσματα των 40 ml και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντριση στα 4700 x g για μισή ώρα σε κάδο με ρότορα. Τέλος, ο τελικός όγκος των συμπυκνωμένων δειγμάτων μειώθηκε σε 250 μl. Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του ιικού RNA, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR).



Εικόνα 4. 3: Ρύθμιση φίλτρου μέσω σύριγγας που σημαίνει ότι τα λύματα φιλτράρονται μέσω μιας επαναχρησιμοποιημένης μεμβράνης φίλτρου 47mm (<https://www.protocols.io/>, 2023)



Εικόνα 4. 4: Μembrάνη ειδική για τη διήθηση (Μαρκόπουλος , 2021)



Εικόνα 4. 5: Στήλες πυριτίου Zymto–IIIIP για απευθείας συλλογή RNA (Μαρκόπουλος , 2021)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της εν λόγω μεθόδου, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της αντίστοιχης μεθόδου για την ανάκτηση RNA του ιού PMMoV ήτοι Pepper Mild Mottle Virus καθώς και την ανίχνευση και την ανάκτηση του

ανθρώπινου RNA στα λύματα. Διαπιστώθηκε πως κατά τη μέθοδο 4S ανακτήθηκε 6 φορές περισσότερο ιικό RNA σε σύγκριση με τον ιό PMMoV ενώ για την δεύτερη μέθοδο επιβεβαιώθηκε η ανίχνευση του ριβωσομικού RNA στα μολυσμένα λύματα.

Εν κατακλείδι, η μέθοδος 4S ήταν αποτελεσματικότερη για την εξαγωγή του ιού SARS COV-2 μέσα από τα λύματα και συνδυαστικά με την RT-qPCR υπήρξε μια ορθή και υψηλής ευαισθησίας παρακολούθησης της πορείας για την πανδημία Covid-19. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η μέθοδος 4S είναι προσιτή για την εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα με στόχο την ανίχνευση και την εξαγωγή του ιού μέσω αυτών (Whitney, et al., 2020).

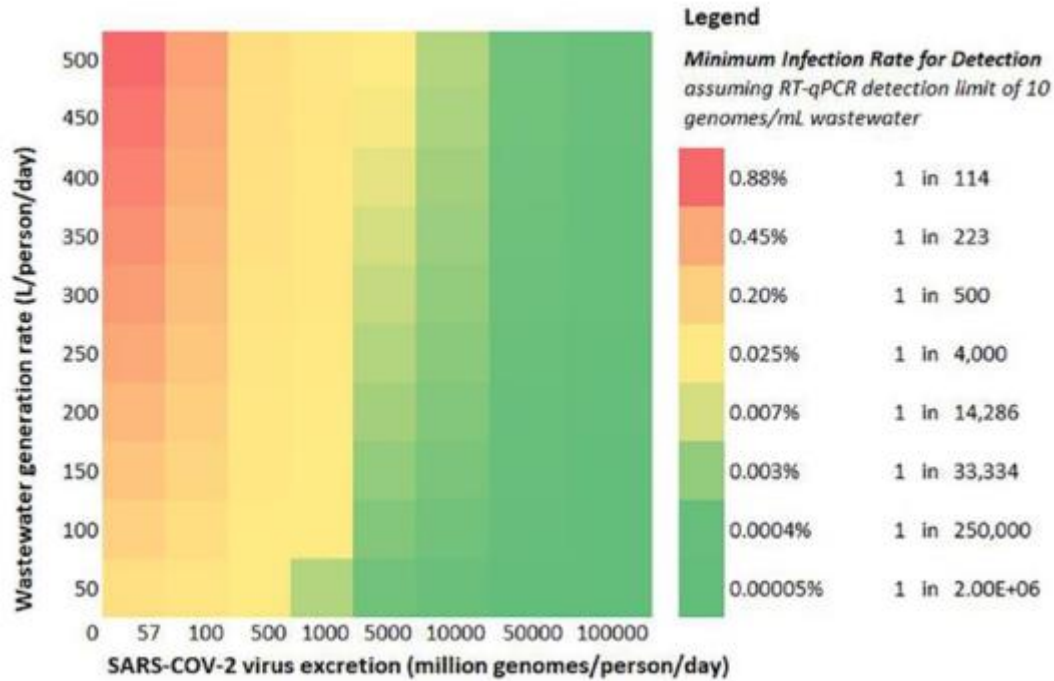
#### **4.4 Ανίχνευση του Ιού SARS – COV -2 με βάση την Υπολογιστική Ανάλυση**

Το 2020, οι Hart et. al., (2020) πραγματοποίησαν μια έρευνα προκειμένου να διαπιστώσουν εάν ήταν εφικτό να ανιχνευτεί η εξάπλωση του ιού σε μια κοινότητα/περιοχή βάσει των αναλύσεων από τα λύματα της περιοχής/κοινότητας. Τα κυριότερα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται παρακάτω (Hart & Halden, 2020).

Με βάση τα παραδείγματα που δίνονται, αν αναλογιστούμε ότι το όριο ανίχνευσης για τον ιό στα λύματα είναι 10 γονιδιώματα RNA του κορονοϊού ανά mL λυμάτων και δεν υπάρχουν πρόσθετες εισροές ομβρίων, εμπορικών και βιομηχανικών ροών στο αποχετευτικό σύστημα, η επιτυχημένη ανίχνευση του SARS-CoV-2 με qRT PCR σε πλήρως ομογενοποιημένα λύματα θα απαιτήσει στη χειρότερη περίπτωση έως και 0,88% του πληθυσμού σε ένα ελεγχόμενο αποχετευτικό δίκτυο να είναι μολυσμένο (1 στα 114 άτομα). Στην καλύτερη περίπτωση, μόνο το 0,00005% του πληθυσμού θα είναι μολυσμένο (1 μολυσμένο κρούσμα σε περίπου 2 εκατομμύρια μη μολυσμένα άτομα) (Hart & Halden, 2020).

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται το ελάχιστο ποσοστό μόλυνσης για την ανίχνευση του ιού.



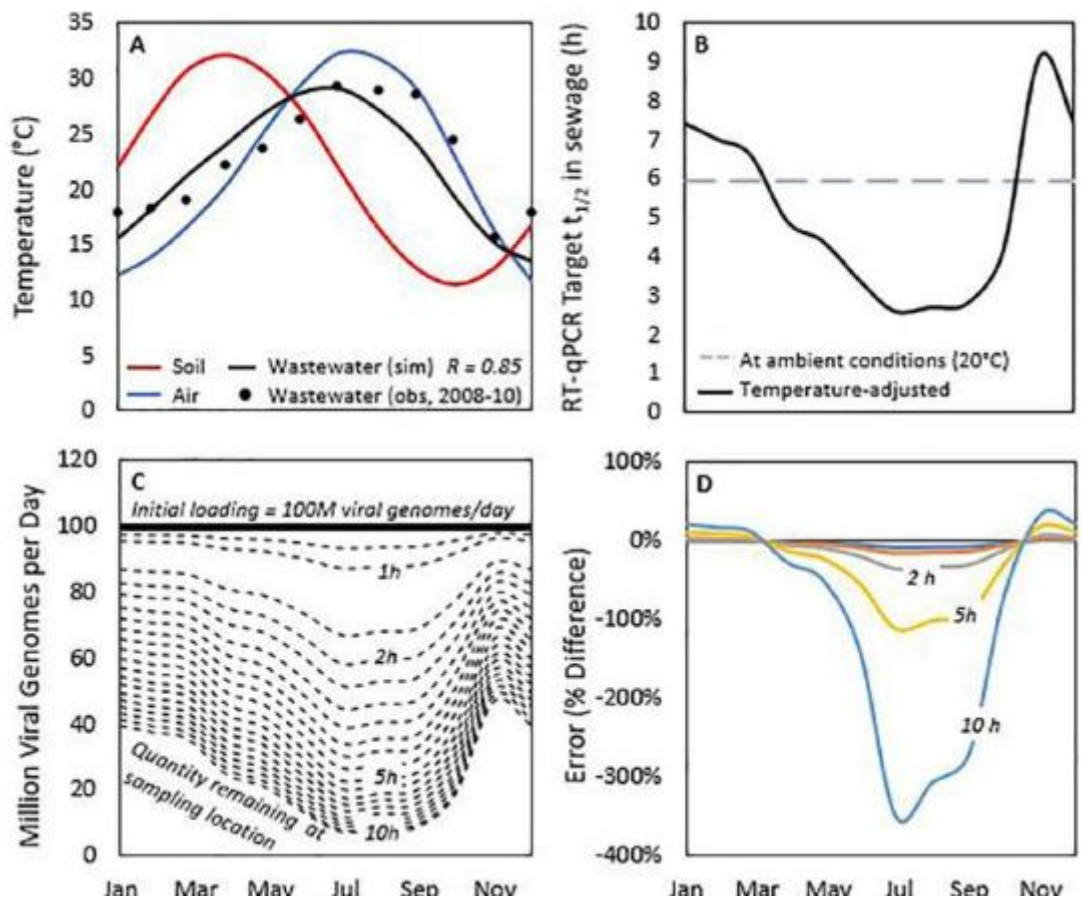


Εικόνα 4. 6: Ελάχιστο ποσοστό μόλυνσης για ανίχνευση (Hart & Halden, 2020)

Σε περιβαλλοντικές συνθήκες (20°C), ο χρόνος ημιζωής του SARS-COV-2 εκτιμάται να κυμαίνεται μεταξύ περίπου 4,8 και 7,2 ωρών. Αυτές οι τιμές είναι σε παρόμοια μεγέθη με τους τυπικούς υδραυλικούς χρόνους παραμονής των αστικών λυμάτων στα περισσότερα αποχετευτικά συστήματα παγκοσμίως. Συνεπώς, σε περιβάλλοντα όπου η ροή των λυμάτων είναι σε θερμοκρασία 20°C, τουλάχιστον το 25% του φορτίου του ιού εξακολουθεί να παραμένει ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ο μέσος χρόνος διαδρομής εντός του αποχετευτικού δικτύου είναι μεγάλος (π.χ. 10 ώρες) και η σταθερότητα του ιού είναι σχετικά χαμηλή ( $t_{0,5} = 4,8$  ώρες).

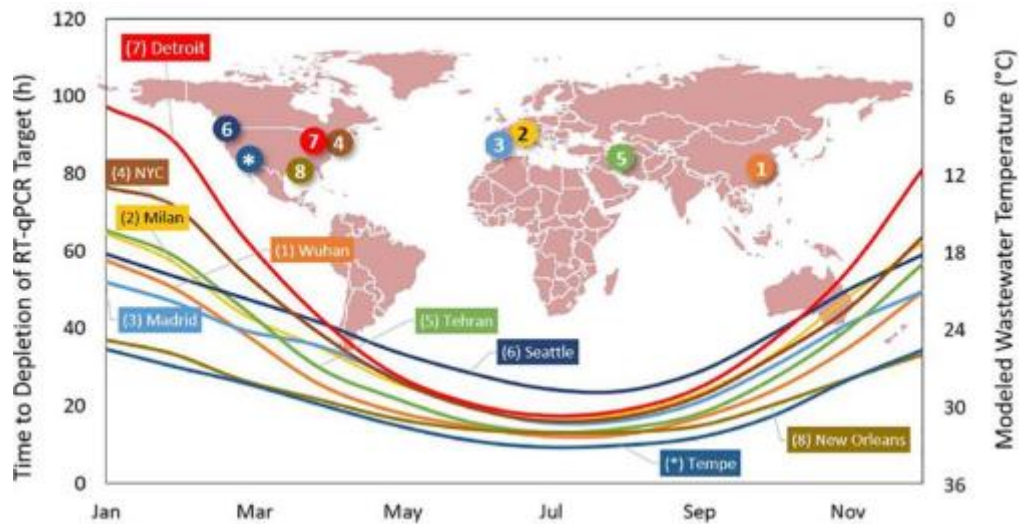
Η θερμοκρασία επηρεάζει άμεσα την αποικοδόμηση του ιού. Επειδή η θερμοκρασία των υγρών αποβλήτων υπόκειται σε εποχιακές μεταβολές, είναι λογικό να λάβουμε υπόψη αυτόν τον εξωτερικό παράγοντα ως μεταβλητή κατά την ανίχνευση του ιού στα υγρά απόβλητα. Για παράδειγμα μέσω προσομοιώσεων διάφορων εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, παρατηρήθηκε, ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες των λυμάτων στην πόλη του Ντιτρόιτ των ΗΠΑ, το χειμώνα, επιτρέπουν την ανίχνευση του ιού ακόμη και μετά από σχεδόν 100 ώρες παραμονής εντός του αποχετευτικού δικτύου. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, η ανιχνευσιμότητα θα μειωνόταν στις 20 ώρες. Αν και οι μεταβολές που σχετίζονται με τη θερμοκρασία στην ανιχνευσιμότητα του SARS - COV-2 ήταν λιγότερο έντονες στη Μαδρίτη της Ισπανίας και στο Tempe των ΗΠΑ, οι υψηλότερες θερμοκρασίες νερού έχουν ως αποτέλεσμα μέγιστους χρόνους παραμονής πριν από την απώλεια σήματος

38 ώρες ή λιγότερο και στις δύο τοποθεσίες. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων στην κάτωθι εικόνα.



Εικόνα 4. 7: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάλογα την εποχή για την ανίχνευση ιών στα υγρά απόβλητα (Hart & Halden, 2020)

Τα δείγματα που λαμβάνονται στις εξόδους των λεκανών κατά το χειμώνα απεικονίζουν μια καλύτερη αντιπροσώπηση του ιού σε έναν πληθυσμό που καλύπτεται από όλο το αποχετευτικό δίκτυο. Ωστόσο κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών, οι δειγματοληψίες λυμάτων στην εκροή απεικονίζουν μόνο την κατάσταση της υγείας των ατόμων που ζουν κοντά στη θέση της δειγματοληψίας. Ως εκ τούτου, οι εν λόγω μετρήσεις περιθωριοποιούν ή μάλλον δεν αποτυπώνουν σε μεγάλο βαθμό όλους τους κατοίκους (Hart & Halden, 2020).



Εικόνα 4. 8: Μεταβολή του χρόνου εξάντλησης του ιού σε ετήσια βάση σε αποχετεύσεις για 8 πόλεις που επλήγησαν από την πανδημία COVID-19 (Hart & Halden, 2020)

#### 4.4.1 Υπολογιστική Προσέγγιση Προσομοίωσης Monte Carlo

Οι Ahmed et. al., (2021) στην εργασία τους υπολόγισαν τις ποσότητες των ατόμων που μολύνθηκαν από τον ιό μέσω της συσχέτισης αντιγράφων RNA που ανιχνεύθηκαν στα λύματα και τα αντίγραφα RNA που υπολογίστηκαν ανά γραμμάριο μολυσμένων περιττωμάτων από ανθρώπους. Προκειμένου να μειωθεί η αβεβαιότητα και η μεταβλητότητα στις ανεξάρτητες μεταβλητές, έγινε εφαρμογή της προσομοίωσης Monte Carlo στο σημείο Oracle Crystal Ball.

Τα αντίγραφα RNA από τα υγρά απόβλητα μοντελοποιήθηκαν ως σημειακές εκτιμήσεις για την κάθε ημερομηνία ανίχνευσης και με ομοιόμορφη κατανομή ανάμεσα στις ελάχιστες και μέγιστες μετρήσεις που παρατηρήθηκαν. Ο ρυθμός ροής λυμάτων σε ημερήσια βάση υπολογίστηκε και αυτός σημειακά με τη χρήση του γινομένου του πληθυσμού στο σπίτι της λεκάνης απορροής καθώς και του παρατηρούμενου μέσου ρυθμού λυμάτων ανά κεφάλι σε 250lt ανά άτομο ανά ημέρα. Η ημερήσια μάζα κοπράνων σε  $\log_{10}$  g/άτομο μοντελοποιήθηκε με κανονική κατανομή (μέση τιμή 2.11 και τυπική απόκλιση 0.25). Επιπλέον, ο ρυθμός έκχυσης αντιγράφων RNA του ιού ανά γραμμάριο κοπράνων μοντελοποιήθηκε με λογαριθμοποιημένη ομοιόμορφη κατανομή, από 2.56 έως 7.67, όπως είχε παρατηρηθεί κατά τις περιόδους μεγαλύτερης έξαρσης μεταξύ των ήπιων κρουσμάτων COVID-19 στη Γερμανία (Ahmed et al., 2021).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα άτομα τα οποία μολύνθηκαν με SARS COV-2 καθώς και η εκτίμηση του επιπολασμού στην περιοχή Queensland της Αυστραλίας.

Πίνακας 4. 1: Διασπορά του ιού SARS COV -2 και ποσοστά επιπολασμού σε μολυσμένα άτομα στο Queensland της Αυστραλίας που εκτιμήθηκε μέσω της ανίχνευσης αντιγράφων του ιικού RNA σε λύματα μέσω της μοντελοποίησης Monte Carlo (Ahmed et. al., 2021)

Αντίγραφα RNA/100ml	Αριθμός λοιμώξεων μέση τιμή (95% CI)	Επιπολασμός (%) (95% CI)
12 ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ/100 ML (27/3/20)	1090 (748-1460)	0.181 (0.124-0.249)
1.9 ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ/100 ML (1/4/20)	171 (122-233)	0.028 (0.019-0.039)
ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ: 1.9-12 ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ/100 ML	563 (391-764)	0.096 (0.064-0.142)

Η παρακολούθηση των λυμάτων καθώς και η προσομοίωση Monte Carlo έδειξαν ότι ο μέσος επιπολασμός κατά τη διάρκεια των έξι ημερών παρακολούθησης των λυμάτων κυμαίνονταν στο 0.096% στη λεκάνη απορροής του Queensland. Αριθμητικά, αυτό σημαίνει περίπου 450 κρούσματα την ημέρα στη συγκεκριμένη λεκάνη απορροής. Έχοντας όμως υπόψιν ότι η εν λόγω μέθοδος έχει το ανώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95% γύρω από τη διάμεσο, από την παρακολούθηση των έξι ημερών κυμαίνεται στα 764 συνολικά κρούσματα δηλαδή 40% των λοιμώξεων παρέμεινε αδιάγνωστο. Άρα λοιπόν, η διάμεση τιμή αποτελεί ένα μέτρο συντηρητικό που απεικονίζει τη λογική συμφωνία με τις κλινικές εικόνες.

#### 4.5 Παγκόσμιες Εμπειρίες στην Επιτήρηση του SARS-COV-2 μέσω της Ανάλυσης των Λυμάτων

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπίσει η επιστημονική και ιατρική κοινότητα, την τρέχουσα περίοδο είναι η πρόληψη, ο περιορισμός καθώς και η αντιμετώπιση της πανδημίας του κορονοϊού. Όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια, ο εν λόγω ιός εξαπλώνεται με ταχύτατους ρυθμούς σε παγκόσμια κλίμακα και μολύνει όλο και περισσότερους ανθρώπους με αρκετά εκατομμύρια θανάτους οφειλόμενους στον Covid-19. Οι έρευνες που πραγματοποιούνται για την αντιμετώπιση και έλεγχο του ιού, επιβεβαίωσαν πως ο ιός υφίσταται στα λύματα ενώ μέσω μελέτης δύναται να προσδιοριστεί το μέγεθος της εξάπλωσης του. Ως εκ τούτου, ο εντοπισμός και η γρήγορη σχετικά αντιμετώπιση της παρούσας πανδημίας πραγματοποιείται μέσω ενός ισχυρού εργαλείου, αυτό της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα.

Στην παρούσα ενότητα πραγματοποιείται εκτενής αναφορά για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 στα λύματα σε διάφορες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας καθώς και τη σχετική νομοθεσία για την προστασία της δημόσιας υγείας

#### **4.5.1 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Ελλάδα**

Τα μέτρα αντιμετώπισης κατά της πανδημίας στην Ελλάδα, εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά στις 10/03/2020 με την άμεση αναστολή λειτουργίας των εκπαιδευτικών ιδρυμάτων (Σχολεία και Πανεπιστήμια) ενώ στις 16/03/2020 ήτοι σχεδόν μια εβδομάδα αργότερα, τίθεται αναστολή λειτουργίας (ολικό lockdown) για σχεδόν όλα τα καταστήματα (εκτός σούπερ μάρκετ, φαρμακεία, βενζινάδικα, ψιλικατζίδικα), καθώς και μουσεία, γυμναστήρια και άλλα σημεία μαζικής προσέλευσης. Τα σκληρά μέτρα συνεχίστηκαν, με αποκορύφωμα την απαγόρευση της κυκλοφορίας στις 23/03/2020, η οποία διήρκησε μέχρι τις 04/05/2020. Από τις 4 Μαΐου έως και τις 15/06/2020, η λειτουργία των σχολείων, πανεπιστημίων, καταστημάτων, γυμναστηρίων κ.α. άρχισε σταδιακά.

Όσον αφορά την πόλη της Θεσσαλονίκης, ο Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (εφεξής ΕΟΔΥ), κατέγραψε για τον μήνα Απρίλιο (2020), συνολικά 51 θετικούς κατοίκους στον ιό Covid-19, ενώ το μήνα Ιούνιο του ίδιου έτους μόνο 3 θετικούς κατοίκους.

Η μελέτη σκόπευε στη συλλογή δειγμάτων από ένα κανάλι στην είσοδο της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων στη Θεσσαλονίκη. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν είχαν περίπου 25 φορές μικρότερο ρυθμό ροής φρέσκων λυμάτων τα οποία εμπεριέχαν αρκετά αιωρούμενα στερεά αλλά υψηλό φορτίο οργανικής ύλης. Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τρεις φορές από τις 21/04/2020 έως και τις 03/05/2020 και μεταφερόντουσαν στο εργαστήριο με πάγο. Μέρος των δειγμάτων υποβλήθηκαν σε άμεση επεξεργασία ενώ τα λοιπά δείγματα παρέμειναν ανεπεξέργαστα στους 4°C μέχρι την επεξεργασία τους που πραγματοποιούνταν εντός της ημέρας (Petala, et al., 2021).

Εν συνεχεία, τα δείγματα αναλύθηκαν χημικά με την αρωγή ειδικού εργαστηριακού εξοπλισμού προκειμένου να προσδιοριστούν όλοι εκείνοι οι παράγοντες που έπαιζαν ρόλο στην προσρόφηση του SARS-CoV-2 στα αιωρούμενα στερεά. Οι παράμετροι αφορούσαν το pH, το σύνολο των αιωρούμενων στερεών (TSS), τη ζήτηση του βιοχημικού οξυγόνου πέντε ημερών (BOD<sub>5</sub>), τη COD, τον διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC), την απορρόφηση UV στα 254nm καθώς και την ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου (DO) (Petala, et al., 2021).

Προκειμένου να ανιχνευτεί ποιοτικά το ιικό RNA εφαρμόστηκαν δομικές με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, ήτοι RT-qPCR.

Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε 50ml μέσω του αρχικού διαλύματος στις 3000rpm στους 4°C για μια ώρα με σκοπό να αφαιρεθούν τα στερεά υλικά. Τα στερεά που απομακρύνθηκαν ήταν 40ml τα οποία και συμπυκνώθηκαν ενώ ο τελικός όγκος των συμπυκνωμένων στερεών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του ιικού RNA έφτασε τα 300ml (Petalá, et al., 2021).

Μέσω της RT-qPCR πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της παρουσίας του γονιδίου RNA του ιού στα δείγματα με τη χρήση του κιτ «SuperScript III Platinum One-Step RT-qPCR ThermoScientific LSG, Cat No 11732-088». Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμασίες που στόχευαν αφενός στα γονίδια του ιού και αφετέρου στο ανθρώπινο RNA προκειμένου να μειωθούν τα ψευδή αποτελέσματα. Το εκάστοτε δείγμα αναλύθηκε με τη σειρά του τρεις φορές. Η θετικότητα του δείγματος για να θεωρηθεί ότι υφίσταται ο ιός SARS-CoV-2, θα πρέπει να ήταν μικρότερη ή ίση με 37. Πιο συγκεκριμένα, έχοντας ως βάση τα αποτελέσματα της RT-qPCR, θεωρήθηκε ότι η κάθε δοκιμασία του γονιδιώματος του ιού με τιμή δείκτη  $C_t$  θα ήταν μικρότερη ή ίση με 37. Έτσι, ο προσδιορισμός του ιικού φορτίου από τα δείγματα προέκυψε από τα αποτελέσματα της RT-qPCR ενώ ο προσδιορισμός του ιού φορτίου ανά ml δείγματος προέκυψε από τον αρχικό όγκο του δείγματος που είχε συγκεντρωθεί. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι μοντέλων, ήτοι με το φυσικοχημικό μοντέλο και το τοπολογικό μοντέλο.

Αναφορικά με το φυσικοχημικό μοντέλο, εξετάστηκε η δυναμική της προσρόφησης τμημάτων του ιού SARS-CoV-2 στα αιωρούμενα στερεά κατά μήκος της ροής στο αποχετευτικό σύστημα της πόλης. Το φυσικοχημικό μοντέλο χαρακτηρίζεται απλό προκειμένου να περιγράψει το πρόβλημα. Η προσρόφηση τμημάτων του ιού δύναται να υπολογιστεί με την κάτωθι εξίσωση:

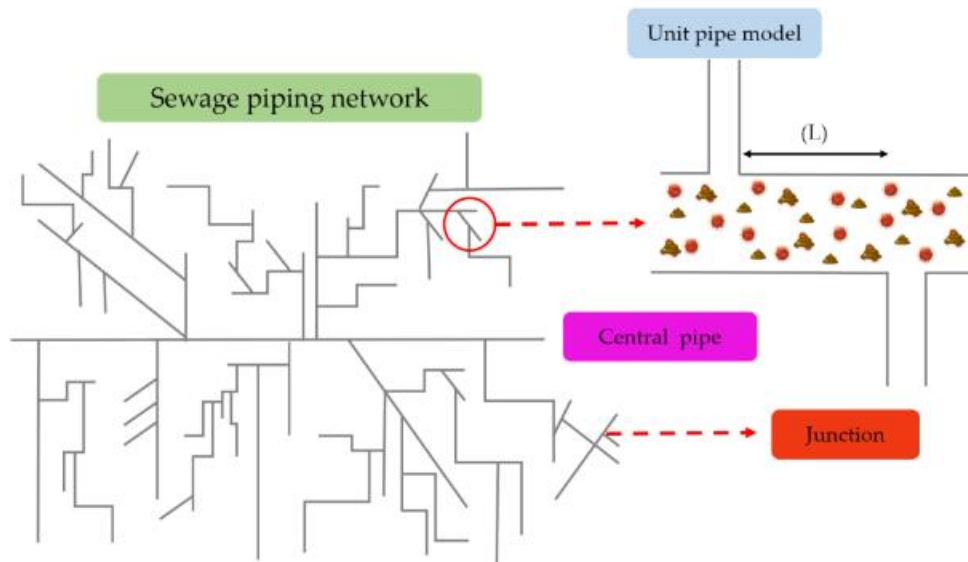
$$q = I(C)$$

Όπου,

$q$  είναι η προσροφημένη μάζα του ιού ανά μονάδα μάζας στερεών

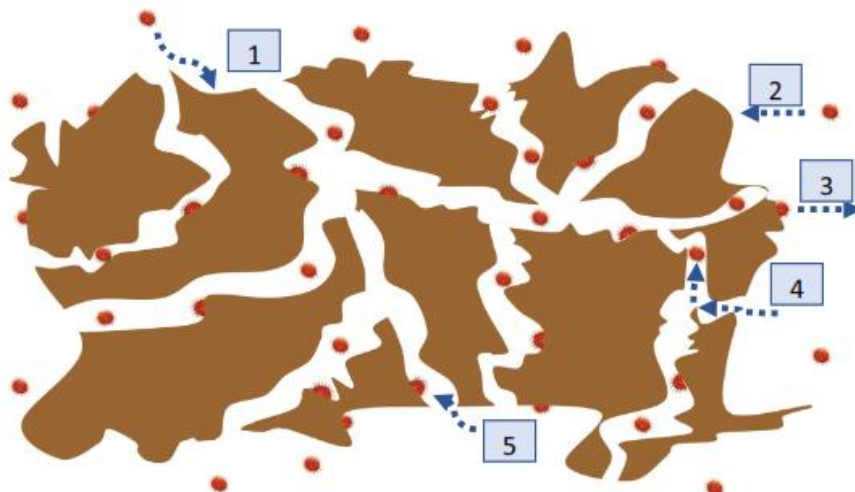
$C$  είναι η συγκέντρωση του ιικού γονιδιώματος κατά την υγρή φάση

Στο τοπολογικό μοντέλο θα πρέπει να είναι διαθέσιμη η τοπολογική περιγραφή του συστήματος σωληνώσεων της πόλης που μελετάται. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση του τοπολογικού μοντέλου. Στην πάνω δεξιά γωνία της Εικόνας 3.1 διαφαίνεται η εισαγωγή του ιού στα λύματα με τα μεμονωμένα μέρη του ιού και τα στερεά σωματίδια.



Εικόνα 4. 9: Τοπολογικό μοντέλο πλήρης ανάλυσης για το κάθε τμήμα σωλήνα και διασταυρώσεων στο δίκτυο αποχέτευσης. Στην πάνω δεξιά γωνία απεικονίζεται ο σωλήνας της μονάδας με τα μεμονωμένα μέρη του ιού και τα στερεά σωματίδια με προσροφημένα ιικά σωματίδια που ρέουν στα λύματα (Petala, και συν., 2021)

Οι εν λόγω μέθοδοι ανάλυσης των λυμάτων έδειξαν ότι τα δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν μεταξύ 21/04/2020 και 03/05/2020 έδειξαν μείωση στη συγκέντρωση του ιού SARS-CoV-2, στα λύματα. Παρόλα αυτά, στις 03/06/2020 έως και τις 21/06/2020, ο ιός έκανε την εμφάνιση του αλλά σταθερά (είχε γίνει άρση των μέτρων σταδιακά από τα τέλη Μαΐου). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το συνδυαστικό σύστημα αποχέτευσης της Θεσσαλονίκης έπαιξε ρόλο μείζονος σημασίας σε αυτές τις διακυμάνσεις του ιικού φορτίου. Επιπλέον κατά την ίδια περίοδο, το ποσοστό των αιωρούμενων στερεών καθώς και το οργανικό φορτίο παρέμενε υψηλό λόγω της ανακυκλοφορίας των στραγγισμάτων στα σημεία που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Ωστόσο, η εφαρμογή των δύο αυτών μεθόδων οδήγησε στο χαμηλό εύρος τιμών του ποσοστού παραγωγής του ιού στα λύματα της Θεσσαλονίκης (Petala, και συν., 2021).



Εικόνα 4. 10: Σχηματική αναπαράσταση πιθανών μηχανισμών αλληλεπίδρασης σωματιδίων/θραυσμάτων ιού με ένα πορώδες στερεό σωματίδιο που αιωρείται στα λύματα. 1: μεταφορά μάζας (συναγωγή και διάχυση) από το υγρό περιβάλλον, 2: προσρόφηση, 3: εκρόφηση, 4: διάχυση πόρων και 5: διάχυση στην επιφάνεια (Petalà, και συν., 2021)

Τον Αύγουστο του 2023 (32<sup>η</sup> εβδομάδα του έτους), επιδημιολογική μελέτη με βάση τα λύματα που πραγματοποιήθηκε από τον ΕΟΔΥ παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του ιού ενώ ο αριθμός των εισαγωγών με COVID-19 παρουσίασε αύξηση σε σχέση με την προηγούμενη εβδομάδα (31<sup>η</sup> εβδομάδα) και αύξηση 71% σε σχέση με το μέσο εβδομαδιαίο αριθμό νέων εισαγωγών κατά τις προηγούμενες 4 εβδομάδες. Η επιτήρηση του ιικού φορτίου στα αστικά λύματα έδειξε αύξηση της κυκλοφορίας του ιού SARS-CoV-2 σε 9 από τις 10 περιοχές που ελέγχθηκαν (ΕΟΔΥ, 2023).

#### 4.5.2 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Ευρώπη

Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα έχει εφαρμοστεί επίσης σε διάφορες χώρες της Ευρώπης. Στην Ιταλία, για παράδειγμα, μια μελέτη που διεξήχθη στο Μιλάνο ανέδειξε τη δυνατότητα ανίχνευσης του ιικού RNA του SARS-CoV-2 στα λύματα πριν από την εμφάνιση κλινικών κρουσμάτων. Αυτό έδωσε τη δυνατότητα να παρακολουθηθεί η εξάπλωση του ιού και να ληφθούν προληπτικά μέτρα. Επίσης, στην Ολλανδία, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Άμστερνταμ ανέδειξε τη συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των αναλύσεων λυμάτων και της επιδημιολογικής κατάστασης στην πόλη. Η ανίχνευση του ιικού RNA στα λύματα επιτρέπει την παρακολούθηση της εξάπλωσης του ιού και την πρόβλεψη της δυνητικής εμφάνισης κλινικών κρουσμάτων.



## **Ιρλανδία**

Στο Δουβλίνο το 2022, πραγματοποιήθηκε έρευνα με βάση τα αστικά λύματα προκειμένου να εντοπιστούν τα κρούσματα του ιού SARS-CoV-2 στο δίκτυο αποχέτευσης κατά τη διάρκεια της περιόδου αιχμής μόλυνσης. Από την έρευνα προέκυψαν διάφορα ερωτήματα όπως ο σκοπός της επιτήρησης των αστικών λυμάτων, εάν δύναται η παρατήρηση των αστικών λυμάτων να προειδοποιήσουν έγκαιρα για νέα κρούσματα μόλυνσης, εκτίμηση του επιπλασμού της μόλυνσης στον πληθυσμό, την ανίχνευση νέων παραλλαγών ή εντοπισμός των θέσεων μόλυνσης κλπ. Κατά την έρευνα επίσης διαπιστώθηκε πως ο τύπος παρακολούθησης που πραγματοποιείται εξαρτάται συχνά από τον διαθέσιμο προϋπολογισμό όπως και τον προσδιορισμό των κατάλληλων θέσεων δειγματοληψίας. Ως εκ τούτου, η συνολική αβεβαιότητα στην επιδημιολογία με βάση τα λύματα προκειμένου να επιτηρηθούν διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του κορονοϊού είναι αρκετά υψηλή. Ορισμένες από τις αβεβαιότητες δύναται να μειωθούν με τη χρήση της εξειδικευμένης μηχανικής γνώσης που συχνά υπάρχει όσον αφορά τη διάταξη και την υδραυλική μοντελοποίηση των δικτύων αποχέτευσης στις πόλεις. Ωστόσο, πρέπει να γίνει μεγαλύτερη ενσωμάτωση αυτού του είδους εμπειρογνώμοσύνης και γνώσης στη διαδικασία WBE για την αντιμετώπιση των ειδικών αναγκών από την άποψη της WBE. Οι μέθοδοι κανονικοποίησης που χρησιμοποιούνται για τα δειγματοληπτικά δεδομένα είναι υψίστης σημασίας για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με άλλα δεδομένα για τη νόσο, όπως τα αποτελέσματα κλινικών εξετάσεων, οι αριθμοί νοσηλείας κ.λπ. και προκειμένου να δοθεί μια καλή εκτίμηση του επιπολασμού της νόσου στον πληθυσμό-στόχο. Οι εκτιμήσεις που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς του επιπολασμού, όπως η ροή των λυμάτων, η παραγωγή κοπράνων ανά άτομο και τα φορτία ιικής έκχυσης στα κόπρανα, τα εύρη των οποίων ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό στη βιβλιογραφία, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στα αποτελέσματα (Mac Mahon, Monleon, Gill, O'Sullivan, & Meijer, 2022).

## **Ηνωμένο Βασίλειο**

Το Ηνωμένο Βασίλειο ξεχωρίζει από τις άλλες χώρες, καθώς έχει επενδύσει στην έρευνα και την ανάπτυξη της αυτοματοποιημένης επιτήρησης λυμάτων για την παροχή WBE από τις αρχές του 2021. Παρά αυτό το εθνικό όραμα για τη βιοεπιτήρηση, ένα σύστημα τέτοιο ακόμη δεν έχει ακόμη τεθεί σε λειτουργία. Πολλά τεχνολογικά εμπόδια παραμένουν για την παροχή ενός κατάλληλου για το σκοπό αυτό, συμπεριλαμβανομένων καινοτόμων εργαλείων απόκτησης λυμάτων κατά της συρρίκνωσης, έξυπνων βημάτων συγκέντρωσης, λύσης και καθαρισμού και μιας ποικιλίας εξαιρετικά ειδικών και ευαίσθητων αισθητήρων,

με δυνατότητα πολυπλεξίας, υπερπλεξίας και αλληλουχίας. Βρισκόμαστε σε έναν αγώνα δρόμου ενάντια στο χρόνο για την ανάπτυξη αυτών των επεκτάσιμων πρωτοτύπων E2E (end to end) για ένα διεθνές δίκτυο βιοπαρακολούθησης πριν από την επόμενη παγκόσμια βιολογική απειλή (Singer, et al., 2023).

### **Ιταλία**

Η Ιταλία συγκαταλέγεται στις χώρες που έχουν πληγεί περισσότερο από την πανδημία του COVID-19. Η πραγματικότητα είναι πως, στις 20/04/2020, ο συνολικός αριθμός των κρουσμάτων στην Ιταλία, που αναφέρθηκαν στις αρχές ήταν 181,228, με 108,237 ενεργά κρούσματα. Η πλειοψηφία των κρουσμάτων εντοπίστηκαν κυρίως στη Βόρεια Ιταλία και συγκεκριμένα στην περιοχή της Λομβαρδίας, καθώς και τις γειτονικές περιοχές Emilia-Romagna και Piedmont (La Rosa, et al., 2020).

Λόγω του μεγάλου αριθμού των μη συμπτωματικών κρουσμάτων στην Ιταλία, η διερεύνηση στα λύματα, παρείχε πολύτιμες πληροφορίες για τη μέτρηση της κυκλοφορίας του ιού στον πληθυσμό καθώς οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δέχονται το σύνολο των αποβλήτων και αποτελούν κατάλληλα σημεία μιας δειγματοληψίας. Οι La Rosa et. al., (2020), παρουσίασαν τα αποτελέσματα του ελέγχου για την παρουσία του ιού SARS-CoV-2 σε δείγματα λυμάτων που συλλέχθηκαν από τα τέλη Φεβρουαρίου έως τις αρχές Απριλίου του 2020 από μια εγκατάσταση επεξεργασίας στο Μιλάνο στη Βόρεια Ιταλία και την κεντρική Ρώμη.

Μεταξύ των ημερομηνιών 03/02/2020 και 02/04/2020 συλλέχθηκαν 12 δείγματα ακατέργαστων λυμάτων από τις τρεις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων που βρίσκονταν στο Μιλάνο (δύο ξεχωριστές μονάδες που αναφέρονται ως Α και Β) και μια εγκατάσταση στη Ρώμη (αναφερόμενη ως Γ). Ο συνολικός αριθμός των κατοίκων που εξυπηρετήθηκαν από αυτές τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (εκφρασμένοι ως ισοδύναμα πληθυσμού) ήταν 1.050.000, 1.050.000 και 900.000, για τις εγκαταστάσεις Α, Β και Γ, αντίστοιχα. Συλλέχθηκαν σύνθετα δείγματα, που αντιπροσώπευαν μια περίοδο 24 ωρών από την εισροή των εγκαταστάσεων και αποθηκεύτηκαν αμέσως στους -20 °C και απεστάλησαν κατεψυγμένα στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας για ανάλυση. Πριν από τη συγκέντρωση του ιού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία 30 λεπτών στους 56 °C για να αυξηθεί η ασφάλεια του αναλυτικού πρωτοκόλλου για το προσωπικό του εργαστηρίου και το περιβάλλον.

Το 2020 ελλείπει τυποποιημένων μεθόδων για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε περιβαλλοντικά δείγματα, τα RNA δοκιμάστηκαν για την παρουσία του ιού χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές ένθετες δοκιμασίες RT-PCR και μία ανάλυση qPCR σε πραγματικό χρόνο. Οι δοκιμασίες παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα.

Πίνακας 4. 2: Οι τρεις διαφορετικές ένθετες δοκιμασίες που προέβησαν οι La Rosa et al., (2020) για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2 στα λύματα

Target	Region	Primer name	Nucleotide sequence	Orientation	Usage	Amplicon size (bp)	Reference
Broad-range coronavirus	ORF1ab	Bat-CoV pol 15197	GGTGGGAYTAYCCWAARTGTGA	+	First PCR	440	Ar Gouilh et al. (2018)
		Bat-CoV pol 15635	CCATCRTCMGAHARAATCATCATA	-	Nested PCR	218	
		Bat-CoV pol 15419	GTGCTAAACCACCGCTG	+			
		Bat-CoV pol 15635	CCATCRTCMGAHARAATCATCATA	-			
SARS-CoV-2	ORF1ab	2274 - CO-FW1	GTGCTAAACCACCGCTG	+	First PCR	368	This study
		2275 - CO-REV1	CAGATCATGGTTGTTGTAGGT	-	Nested PCR	332	
		2276 - CO-FW2	CGCCTGGAGATCAATTTAAACAC	+			
		2277 - CO-REV2	ACCTGTAAAACCCCAATTGTGA	-			
SARS-CoV-2	S	WuhanCoV-spk1-f	TGGCAAAATTCAAAGACTCACTT	+	First PCR	547	Nao et al. (2020)
		WuhanCoV-spk2-r	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTGTG	-	Nested PCR	493	
		NIID_WH-1_F24381	TCAAGACTCACTTCTTCCAC	+			
		NIID_WH-1_R24873	ATTTGAAACAAGACACCTTCAC	-			
SARS-CoV-2	RdRP	RdRP_SARSr-F2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	+	Real-time	-	Corman et al. (2020)
		RdRP_SARSr-R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	-	RT-qPCR		
		RdRP_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ1	-			

Όλα τα δείγματα δοκιμάστηκαν ξανά για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με τις μεθόδους Α, Β και Γ (από τον Πίνακα 3.1). Οι απόρροιες PCR εντοπίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης 2% και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας πλάκα φίλτρου μικροβυθίσματος Montage PCRm96 και στη συνέχεια αναλύθηκαν απευθείας και στους δύο κλώνους (BioFab Research, Ρώμη, Ιταλία). Οι αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν ως προς την πλησιέστερη αλληλουχία ομολογίας χρησιμοποιώντας το BLAST. Όλες οι ιταλικές αλληλουχίες γονιδιώματος SARS-CoV-2 που ήταν διαθέσιμες τη στιγμή της ανάλυσης ανακτήθηκαν από το GISAID<sup>3</sup>.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως το 50% των δειγμάτων λυμάτων ήτοι 6 από τα 12 δείγματα, έδειξε θετικά αποτελέσματα για το RNA του SARS-CoV-2 και η πρόσφατα σχεδιασμένη ανάλυση στο γονίδιο RdRp έδειξε υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τη δοκιμασία που στοχεύει το γονίδιο ακίδας. Τόσο τα δημοσιευμένα όσο και τα πρόσφατα σχεδιασμένα σετ ειδικών εκκινητών SARS-CoV-2 ανίχνευσαν ζώνες του αναμενόμενου μεγέθους και επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχιση. Εν αντιθέσει, μόνο μη ειδικές απόρροιες εντοπίστηκαν με ανάλυση ευρέος φάσματος για τον κορονοϊό. Κατά τη σύγκριση των εκκινητών ευρείας κλίμακας με το γονιδίωμα SARS-CoV-2, παρατηρήθηκε ότι έδειξαν μόνο

<sup>3</sup> GISAID: Η πρωτοβουλία GISAID προωθεί την ταχεία ανταλλαγή δεδομένων από όλους τους ιούς της γρίπης και τον κορονοϊό που προκαλεί το COVID-19. Αυτό περιλαμβάνει γενετική αλληλουχία και σχετικά κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα που σχετίζονται με ανθρώπινους ιούς, καθώς και γεωγραφικά και ειδικά για είδη δεδομένα που σχετίζονται με ιούς πτηνών και άλλους ζωικούς ιούς, για να βοηθήσουν τους ερευνητές να κατανοήσουν πώς οι ιοί εξελίσσονται και εξαπλώνονται κατά τη διάρκεια επιδημιών και πανδημιών (<https://gisaid.org/about-us/mission/>).

77,1 έως 91,3% ταυτότητα nt, γεγονός που εξηγεί γιατί δεν ήταν σε θέση να ενισχύσουν τον νέο κορονοϊό. Δεν λήφθηκαν θετικά αποτελέσματα με RT-qPCR σε πραγματικό χρόνο, επομένως δεν μπόρεσαν να παρασχεθούν ποσοτικά δεδομένα για τα θετικά δείγματα. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την ευαισθησία του προσδιορισμού RdRp που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη.

Η πραγματικότητα είναι ότι σε πρόσφατες συγκριτικές μελέτες, η ευαισθησία αυτής της ανάλυσης αποδείχθηκε χαμηλή σε σύγκριση με άλλες που αναπτύχθηκαν από εργαστήρια παραπομπής του ΠΟΥ (Etievant, et al., 2020). Ειδικότερα, το όριο ανίχνευσης (LOD) αυτής της δοκιμασίας υπολογίστηκε σε 316 ιικά γονιδιωματικά ισοδύναμα ανά αντίδραση από τους (Nalla, et al., 2020) και πάνω από 500 αντίγραφα γονιδιώματος ανά αντίδραση από τους (Vogels, et al., 2020) καθώς και των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας, ότι η συγκέντρωση του ιού ήταν κάτω από το LOD της ανάλυσης. Ωστόσο, ο εξωτερικός έλεγχος αναστολής που συσχετίστηκε με αυτήν τη δοκιμασία ήταν χρήσιμος για την επιβεβαίωση των αποδεκτών επιπέδων αναστολών PCR, καθώς όλα τα δείγματα ήταν κάτω από το κριτήριο αποδοχής (διάμεση αναστολή 29,1%, εύρος 8,7%–51,4%). Τα ανωτέρω απεικονίζονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4. 3: Ευρήματα του ιού SARS-CoV-2 στα λύματα από τις τρεις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Όπου, x: δεν εντοπίστηκε ο ιός, ο: εντοπισμός του ιού (ORFlab), ●: εντοπισμός του ιού (spike) (La Rosa, και συν., 2020)

Πόλη	Μονάδα επεξεργασίας λυμάτων	Ημερομηνία συλλογής δειγμάτων							
		03/02	19/02	23/02	24/02	26/02	28/02	31/03	02/04
Μιλάνο	Μονάδα Α		X		ο	x	x		
Μιλάνο	Μονάδα Β	x		x		x	ο●		
Ρώμη	Μονάδα Γ1							ο	ο
Ρώμη	Μονάδα Γ2							ο	ο●

Τονίζεται ότι στις 24 και 28 Φεβρουαρίου, όταν συλλέχθηκαν τα θετικά δείγματα για SARS-CoV-2 στο Μιλάνο, οι λοιμώξεις από τον COVID-19 εξακολουθούσαν να είναι περιορισμένες στην Ιταλία, ενώ το πρώτο ιταλικό θετικό κρούσμα SARS-CoV-2 είχε αναφερθεί μόνο λίγες μέρες νωρίτερα ήτοι στις 21 Φεβρουαρίου. Στις 28 Φεβρουαρίου, ο συνολικός αριθμός των ατόμων θετικοί στον SARS-CoV-2 που αναφέρθηκαν σε όλη την Ιταλία ήταν μόνο 888, με 531 (57%) στη Λομβαρδία, την πιο πληγείσα περιοχή της χώρας. Ωστόσο, εκείνη την εποχή, η συντριπτική πλειονότητα των κρουσμάτων στη Λομβαρδία καταγράφηκε στις επαρχίες Lodi, Cremona και Bergamo (182, 123 και 103 κρούσματα, αντίστοιχα). Συγκριτικά, στην

επαρχία του Μιλάνου (μια ακόμη μεγαλύτερη περιοχή σε σύγκριση με τη μητροπολιτική περιοχή που εξυπηρετείται από τις αναφερόμενες μονάδες επεξεργασίας λυμάτων) είχαν αναφερθεί μόνο 29 περιπτώσεις (La Rosa, και συν., 2020).

Ακόμη μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε πιο πρόσφατα (2022) στη Σικελία της Ιταλίας, αφορούσε τη μελέτη των αστικών λυμάτων προκειμένου να εντοπιστεί ο ιός στα πρώιμα στάδια και τη μείωση της διασποράς του ιού. Η μελέτη διεξήχθη στη Σικελία, το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο νησί της Μεσογείου με περίπου 5 εκατομμύρια κατοίκους. Επιλέχθηκαν εννέα ΕΕΛ που βρίσκονταν σε 8 πόλεις και τέσσερις διαφορετικές επαρχίες της κεντρικής και δυτικής Σικελίας, οι οποίες εξυπηρετούν συνολικά 574.107 κατοίκους (από 7062 έως 241.206- 11,2% του συνόλου των κατοίκων του νησιού). Τα δείγματα λυμάτων (N = 206) συλλέχθηκαν κάθε 15 ημέρες για περίπου 12 μήνες (μεταξύ 21 Ιουλίου 2020 και 16 Αυγούστου 2021). Για κάθε ΕΕΛ, συλλέχθηκε 1 L ενός 24ωρου σύνθετου δείγματος ακατέργαστων λυμάτων από μια αυτόματη συσκευή δειγματοληψίας. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν μεταφέρθηκαν σε πάγο στο εργαστήριο, αποθηκεύτηκαν στους +4°C και αναλύθηκαν για την ανίχνευση του RNA SARS-CoV-2 εντός 12 ωρών από τη δειγματοληψία. Σε τέσσερις περιπτώσεις, στις οποίες δεν ήταν δυνατή η ταχεία μεταφορά, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν αμέσως στους -20°C και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο ακόμη κατεψυγμένα εντός 15 ημερών από την ημερομηνία συλλογής (Maida, et al., 2022).

Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι ο SARS-CoV-2 ανιχνεύθηκε σε όλες τις παρακολουθούμενες περιοχές, τόσο σε μικρές όσο και σε μεγάλες μονάδες επεξεργασίας. Επιπλέον, η πιθανότητα ανίχνευσης των ιών σε δείγματα λυμάτων μεταβλήθηκε σε σχέση με τον αριθμό των κρουσμάτων SARS-CoV-2 που ανιχνεύθηκαν στον πληθυσμό. Η ανάλυση επέτρεψε την εκτίμηση με ακρίβεια 78,3% της παρουσίας περισσότερων από 133 ενεργών κρουσμάτων/100.000 κατοίκους (ίσο με 9,5 νέα κρούσματα ανά ημέρα ανά 100.000) όταν ανιχνεύθηκε θετικό δείγμα λυμάτων. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, θα μπορούσε να χρειαστεί ανάλογη αύξηση της συχνότητας των δειγματοληψιών όταν τα αναμενόμενα ενεργά κρούσματα SARS-CoV-2 θα μπορούσαν να είναι πολύ χαμηλά (Maida, et al., 2022).

### **Ισπανία**

Στην Ισπανία πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες για την εξέταση του SARS-CoV-2 με βάση τα λύματα. Οι μελέτες διεξήχθησαν μεταξύ Φεβρουαρίου και Μαΐου του 2020 όπου και ανιχνεύθηκαν μεγάλα ποσοστά του ιού στα RNA δείγματα. Μάλιστα τα ποσοστά άγγιξαν το 83% και αφορούσε τα πρώιμα στάδια των επιδημιών. Και στην Ισπανία, το ιικό

RNA από τα υγρά απόβλητα αντιστοιχούσε στον εκτιμώμενο αθροιστικό αριθμό των κλινικών κρουσμάτων

### Γερμανία

Στη Γερμανία, μια έρευνα πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο του 2020 και εξέτασε εννέα Επεξεργαστικές Εγκαταστάσεις Λυμάτων (ΕΕΛ) ταυτόχρονα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 100,0% του ανιχνεύσιμου ιικού RNA του SARS-CoV-2 βρέθηκε σε αυτά τα εννέα ΕΕΛ.

#### **4.5.3 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Αμερική**

Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα χρησιμοποιείται και στις Ηνωμένες Πολιτείες ως ένα εργαλείο για την παρακολούθηση της επιδημίας του SARS-CoV-2. Αρκετές πόλεις των ΗΠΑ έχουν υιοθετήσει αυτήν την προσέγγιση για να παρακολουθούν τη διάδοση του ιού και να λαμβάνουν αποφάσεις βασιζόμενες σε επιδημιολογικά δεδομένα. Οι αρχές υγείας και επιδημιολογίας συλλέγουν δείγματα λυμάτων από αποχετευτικά συστήματα ή από εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού και τα αναλύουν για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2. Η παρουσία του ιού στα λύματα μπορεί να υποδείξει την επιδημιολογική κατάσταση μιας περιοχής, ακόμη και πριν εμφανιστούν συμπτώματα σε ανθρώπους ή πριν γίνει εκτεταμένη διάγνωση με μοριακή εξέταση σε ατομικό επίπεδο.

Η ανάλυση των λυμάτων μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την εκτίμηση της επιδημιολογικής κατάστασης της κοινότητας, την παρακολούθηση της εξέλιξης της επιδημίας και την ανίχνευση πιθανών επιδημιολογικών εστιών. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό περιοχών μεγαλύτερης διασποράς του ιού και να δώσει ευκαιρίες για πρόληψη και παρέμβαση σε επιδημιολογικά επίπεδα.

Στη Βραζιλία, η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα έχει εφαρμοστεί κυρίως στις νοτιοανατολικές και νότιες πολιτείες. Τον Απρίλιο του 2020, το RNA του SARS-CoV-2 εντοπίστηκε σε ποσοστό 41,7% των δειγμάτων λυμάτων που ελέγχθηκαν στο Niterói<sup>4</sup>, το οποίο αντικατοπτρίζει τον αριθμό των αναφερόμενων περιστατικών COVID-19 κατά την αντίστοιχη περίοδο. Από τον Αύγουστο του 2020, παρατηρήθηκε μια πτωτική τάση, συμβαδίζοντας με την επίπτωση στον τοπικό πληθυσμό.

---

<sup>4</sup> Το Niterói είναι μια πόλη που βρίσκεται στην περιοχή της μητροπολιτικής περιοχής του Ρίο ντε Τζανέιρο στη Βραζιλία. Είναι γνωστή για τον αρχιτεκτονικό της θησαυρό, συμπεριλαμβανομένου του Μουσείου Σύγχρονης Τέχνης του Ρίο ντε Τζανέιρο, σχεδιασμένο από τον Όσκαρ Νιεμάιερ. Όσον αφορά την επιδημιολογική προσέγγιση με βάση τα λύματα, στο Niterói παρατηρήθηκε ότι το RNA του SARS-CoV-2 ανιχνεύθηκε σε ένα υψηλό ποσοστό των δειγμάτων λυμάτων που ελέγχθηκαν τον Απρίλιο του 2020. Αυτό αντανάκλα τον αριθμό των κρουσμάτων COVID-19 που αναφέρθηκαν κατά την περίοδο αυτή στην περιοχή.

Στις πόλεις Belo Horizonte και Contagem που βρίσκονται στην πολιτεία Minas Gerais<sup>5</sup>, διεξήχθησαν συνεχείς έρευνες για τον SARS-CoV-2 σε δείγματα λυμάτων από 24 σημεία λήψης, που εξυπηρετούν περίπου 2,2 εκατομμύρια κατοίκους. Τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια τάση με τα κλινικά περιστατικά που καταγράφηκαν στην περιοχή. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία του ιού στα δείγματα λυμάτων αντικατοπτρίζει την επιδημιολογική κατάσταση και τη δυναμική της εξάπλωσης του COVID-19 στην περιοχή της Minas Gerais.

Στην πόλη Florianopolis που είναι η πρωτεύουσα του κρατιδίου Santa Catarina στη Βραζιλία ,πραγματοποιήθηκε ανάλυση ακατέργαστων δειγμάτων λυμάτων από τον Οκτώβριο του 2019 έως τον Μάρτιο του 2020 και τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία ιικού RNA σε ποσοστό 66,6% των δειγμάτων. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα συμφωνούν με την επιδημιολογική κατάσταση της Βραζιλίας. Αυτό υποδηλώνει ότι ο ιός ήταν παρόν στην κοινότητα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, μελέτες ανάλυσης λυμάτων για την εξαγωγή επιδημιολογικών συμπερασμάτων έχουν διεξαχθεί σε πολλές πολιτείες, όπως Μασαχουσέτη, Νέα Υόρκη, Κονέκτικατ, Μοντάνα, Βιρτζίνια και Λουιζιάνα. Η ανίχνευση ιικού RNA κυμάνθηκε από 13,0% έως 100,0% μεταξύ των μελετών και συμφώνησε με τα τοπικά επιδημιολογικά δεδομένα.

Στη Χιλή, πραγματοποιήθηκε μια έρευνα όπου δείγματα ακατέργαστων λυμάτων από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων La Farfana και El Trebal, οι οποίες εξυπηρετούν περίπου το 85,0% των λυμάτων του Σαντιάγο, αναλύθηκαν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, το RNA του SARS-CoV-2 δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο και τον Απρίλιο.

Στη Βραζιλία, η επιδημιολογία με βάση τα λύματα χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να καταστήσει ορατές τις ομάδες πληθυσμού που δεν είχαν καταγραφεί από τα δεδομένα των κλινικών εξετάσεων. Αυτό ήταν απαραίτητο σε μια χώρα όπου η αντιεπισημονική πολιτική ήταν υπεύθυνη για την ανεπαρκή εξέταση του πληθυσμού και την αδυναμία υποστήριξης βασικών μέτρων ελέγχου της πανδημίας, όπως η κοινωνική αποστασιοποίηση, η χρήση μάσκας και ακόμη και ο εμβολιασμός. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα επίσημα στοιχεία δείχνουν ότι οι συνολικοί θάνατοι από τον ιό COVID-19 στη χώρα έφτασαν τις 700 χιλιάδες τον Απρίλιο του 2023, δεύτεροι μετά τις Ηνωμένες Πολιτείες, αν και ο πραγματικός συνολικός αριθμός των θανάτων από τον ιό COVID-19 πιστεύεται ότι είναι πολύ

---

<sup>5</sup> Η Minas Gerais είναι μια πολιτεία στην ανατολική περιοχή της Βραζιλίας. Είναι η δεύτερη μεγαλύτερη πολιτεία της χώρας από άποψη πληθυσμού

μεγαλύτερος. Οι ιδιαίτερα ευάλωτοι πληθυσμοί, οι οποίοι εξαρτώνται από τα πολυσύχναστα μέσα μαζικής μεταφοράς για τις μετακινήσεις τους, εργάζονται σε χαμηλά αμειβόμενες βασικές θέσεις εργασίας, ζουν σε μικρές κατοικίες υψηλής χωρητικότητας και έχουν περιορισμένη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη, εξετάστηκαν για COVID-19 και, ως εκ τούτου, ελήφθησαν υπόψη στις επίσημες στατιστικές μόνο όταν νοσηλεύτηκαν ή πέθαναν. Όπως και σε άλλες αναπτυσσόμενες χώρες, μόνο ένα μικρό μέρος αυτού του πληθυσμού εξυπηρετείται από αποχετευτικούς αγωγούς. Ελλείπει επαρκών δεδομένων εξέτασης κατά τη διάρκεια της πανδημίας, η αποκεντρωμένη επιτήρηση του SARS-CoV-2 στα συστήματα αποχέτευσης που εξυπηρετούν ευάλωτες γειτονιές αποκάλυψε τις επιπτώσεις των έντονων ανισοτήτων και της περιβαλλοντικής αδικίας. Τα δεδομένα δημόσιας υγείας που βασίζονται σε WBE και συλλέγονται σε κλίμακα υπο-συλλογής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τον εντοπισμό και την αντιμετώπιση των απειλών για την υγεία σε ιδιαίτερα ευάλωτες περιοχές, γεγονός που ελπίζεται ότι θα μπορούσε να οδηγήσει στην έναρξη απτών, στοχευμένων δράσεων ελέγχου της πανδημίας, συμπεριλαμβανομένων των κλινικών δοκιμών, ειδικών μέτρων κοινωνικής απομάκρυνσης και απομόνωσης, καθώς και μεταφοράς και στέγασης έκτακτης ανάγκης για την ελαχιστοποίηση της μετάδοσης (Singer, et al., 2023).

#### **4.5.4 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Ασία**

Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα έχει χρησιμοποιηθεί και στην Ασία για την ανίχνευση και την παρακολούθηση του SARS-CoV-2. Ορισμένες χώρες στην Ασία έχουν εφαρμόσει αυτήν την προσέγγιση με επιτυχία για την παρακολούθηση της εξάπλωσης του ιού και την πρόληψη της διάδοσής του.

Παραδείγματα περιλαμβάνουν την Κίνα, όπου οι επιστήμονες έχουν χρησιμοποιήσει την ανάλυση λυμάτων για να εντοπίσουν περιοχές με υψηλό κίνδυνο εξάπλωσης και να παρακολουθούν την επιδημιολογική κατάσταση.

Επίσης, η Ιαπωνία έχει χρησιμοποιήσει αυτήν την προσέγγιση για την παρακολούθηση της εξάπλωσης του ιού σε διάφορες περιοχές της χώρας. Μάλιστα, στην Ιαπωνία έχουν διεξαχθεί δύο μελέτες μεταξύ των μηνών Μάρτιο και Μάιο του 2020 όπου πάρθηκαν δείγματα από τα λύματα των πόλεων Ishikawa και Toyama. Δευτερογενή δείγματα από λύματα πάρθηκαν επίσης από την περιοχή Yamanashi. Η ποσότητα του ιικού φορτίου που βρέθηκε είχε ένα εύρος μεταξύ 20-57% ενώ στα δευτερογενή λύματα ο ιός ήταν σε ποσοστό 20%.



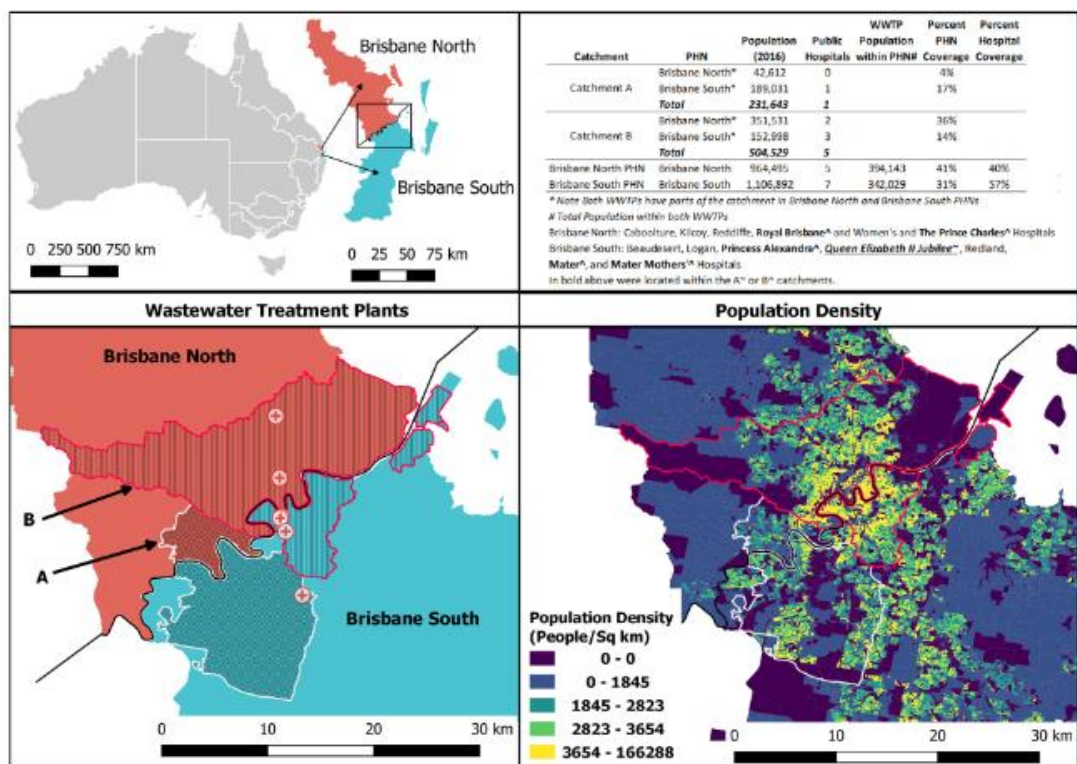
Τέλος, στην Ινδία μελέτες σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων έδειξαν υψηλό ιικό φορτίο μέσω του RNA. Επίσης, σε δείγματα που λήφθηκαν από νοσοκομεία μεταξύ των μηνών Μάιο και Ιούνιο του 2020 έδειξαν και αυτά υψηλής συχνότητας ανίχνευσης RNA του ιού. Δείγματα που πάρθηκαν από μη επεξεργασμένα λύματα, η παρουσία του ιού κυμαίνονταν σε ποσοστό 75-100% ενώ είχε προηγηθεί σημαντική αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων δύο εβδομάδες περίπου πριν.

Έρευνα των Tanimoto και συνεργάτες (2022), οι οποίοι μελέτησαν τα αστικά λύματα της πόλης Kobe στη Ιαπωνία κατά το 4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> κύμα κρουσμάτων του ιού SARS-CoV-2 το 2022, διαπίστωσαν πως ο τρόπος συγκέντρωσης του ιού από τα αστικά λύματα επηρεάζει τα αποτελέσματα ειδικά όταν υπάρχει βροχή. Παρά το γεγονός ότι η βροχόπτωση αναμένονταν να έχει μικρή επίδραση στις συγκεντρώσεις RNA, καθώς δεν παρατηρήθηκε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της βροχόπτωσης/ροής του αποχετευτικού δικτύου και του SARS-CoV-2 RNA σε στερεά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα σύνθετα δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν με στάθμιση της ροής για 24 ώρες, ήταν πιο ανιχνεύσιμα από τα δείγματα συλλογής για το SARS-CoV-2 RNA σε υγρά απόβλητα (Tanimoto, et al., 2022).

#### **4.5.5 Η προσέγγιση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα στην Αυστραλία**

Στην Αυστραλία, το πρώτο καταγεγραμμένο κρούσμα που βρέθηκε θετικό στον ιό του κορονοϊού ήταν στις 25/1/2020 και έως τις 13/04/2020 είχαν καταγραφεί πάνω από 6,300 θετικά κρούσματα. Στην Πολιτεία του Queensland έως τις 14/04/2020 είχαν καταγραφεί 998 θετικά κρούσματα ενώ το πρώτο κρούσμα καταγράφηκε στην πόλη Brisbane στις 21 Φεβρουαρίου του 2020. Στις 14/04/2020 είχαν καταγραφεί ήδη 541 κρούσματα στα πρωτοβάθμια κέντρα υγείας (PHN) που βρίσκονταν Βόρεια και Νότια του Brisbane.

Οι Ahmed et. al. (2020) μελέτησαν δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων που συλλέχθηκαν από το προαστιακό αντλιοστάσιο του Brisbane καθώς και από δύο εργοστάσια επεξεργασίας λυμάτων που αντιπροσωπεύουν ουσιαστικά δύο αστικές λεκάνες απορροής για το Νοτιοδυτικό Queensland. Μάλιστα τα εν λόγω εργοστάσια, επεξεργάζονται σχεδόν όλα τα λύματα που προέρχονται από τα πρωτοβάθμια κέντρα υγείας που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η Εικόνα 3.3 παρουσιάζει τους χάρτες των εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων και τα πρωτοβάθμια κέντρα υγείας Νότια και Δυτικά της πόλης Brisbane.



Εικόνα 4. 11: Χάρτες των λεκανών απορροής των εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων και των πρωτοβάθμιων κέντρων υγείας Νότια και Δυτικά του Brisbane (Ahmed, Angel, & Edson, 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, 2021)

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται επίσης οι ημερομηνίες δειγματοληψίας, ο αριθμός των περιπτώσεων SARS-CoV-2 και τα πιθανά «παράθυρα ανίχνευσης» μέσα σε διάστημα 28 ημερών.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν με δύο μεθόδους αυτοματοποιημένων τεχνικών δειγματοληψίας – είτε μέσω ενός συμβατικού αυτόματου δειγματολήπτη με ψύξη είτε μέσω ενός υποβρύχιου επιτόπιου αυτόματου δειγματολήπτη υψηλής συχνότητας. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές δειγματοληψίας με «αρπαγή» (*grab sampling techniques*). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι να αναλυθούν περαιτέρω.

Οι ιοί συγκεντρώθηκαν χρησιμοποιώντας δύο προηγούμενες δημοσιευμένες μεθόδους. Αυτές οι μέθοδοι αναφέρονται ως Μέθοδος Α (άμεση εξαγωγή RNA από ηλεκτραρνητικές μεμβράνες) (Ahmed, Harwood, Gyawali, Sidhu, & Toze, 2015) και ως Μέθοδος Β (υπερδιήθηση) (Ikner, Soto-Beltran, & Bright, 2011).

Η Μέθοδος Α ξεκίνησε με τη ρύθμιση του pH του δείγματος σε ~ 3,5 έως 4 χρησιμοποιώντας 2,0 N HCl. Τα δείγματα (100–200 ml) στη συνέχεια διοχετεύτηκαν μέσα σε

ηλεκτροαρνητικές μεμβράνες όπου οι πόροι είχαν μέγεθος 0,45μm και διάμετρο 90nm μέσω γυάλινης χοάνης και βάσης. Προκειμένου να εξαχθεί το RNA των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός δύο κιτ ήτοι των RNeasy PowerWater Kit και RNeasy PowerMicrobiome Kit, Qiagen, Hilden. Ένας σωλήνας σφαιριδίων των 5ml από το κιτ RNeasy PowerWater χρησιμοποιήθηκε για να φιλοξενήσει την ηλεκτραρνητική μεμβράνη. Ένας ομογενοποιητής ιστού τύπου Precellys 24 χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση των δειγμάτων σε συνθήκες που κυμαίνονται από 3\*20s στις 8000rpm σε διάστημα 10 δευτερολέπτων. Έτσι, το RNA εξήχθη χρησιμοποιώντας κιτ RNeasy Power Microbiome σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η Μέθοδος B αφορούσε την επεξεργασία των δειγμάτων μέσω φυγοκέντρησης. Τα δείγματα ήταν της τάξης των 100–200 ml και υπόκειται σε φυγοκέντρηση στα 4750g για 30 συνεχόμενα λεπτά. Εν συνεχεία, τα υπερκείμενα αφαιρέθηκαν με προσοχή προκειμένου να μη διαταραχθεί το ίζημα, και έπειτα πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση στα 3500g για 15 συνεχόμενα λεπτά μέσω του φυγοκεντρικού φίλτρου Centricon® Plus-70 με αποκοπή 10 kDa. Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο μείγμα αναποδογυρίστηκε και τοποθετήθηκε πάνω από το φίλτρο με νέα φυγοκέντρηση στα 1000g για ακόμη 2 λεπτά. Το συμπυκνωμένο δείγμα (~250 μL) συλλέχθηκε από το κύπελλο συλλογής συμπυκνώματος με μια πιπέτα. Το RNA εκχυλίστηκε απευθείας από το συμπύκνωμα χρησιμοποιώντας το κιτ RNeasy PowerMicrobiome. Μια πλατφόρμα QIAcube Connect χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή RNA σε τελικό όγκο 100 μL.

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα του ιού SARS-CoV-2 στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η RT-qPCR ανάλυση (όπως και στην περίπτωση της Θεσσαλονίκης). Πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις RT-qPCR ενώ τα θραύσματα γονιδίου gBlocks αγοράστηκαν από την Integrated DNA Technologies. Λόγω έλλειψης και περιορισμένων πληροφοριών χρησιμοποιήθηκαν μόνο αυτές οι δύο μέθοδοι και για την καλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Διεξήχθη ένα πείραμα για τον προσδιορισμό της παρουσίας αναστολής RT-qPCR σε RNA που εξήχθη από δείγματα λυμάτων χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Sketa22 σε πραγματικό χρόνο PCR (Haugland, Siefring, Wymer, Brenner, & Dufor, 2005).

Εν κατακλείδι, για τα δείγματα των λυμάτων που λήφθηκαν από την πρώτη λεκάνη απορροής, η μία μέθοδος έδειξε θετικά σήματα ανίχνευσης του ιού SARS-CoV-2 ενώ στη δεύτερη μέθοδο εξέτασης, το σήμα ήταν αρνητικό. Εν αντιθέσει, για τη δεύτερη λεκάνη απορροής που εξετάστηκε, τα αποτελέσματα για τα δείγματα των λυμάτων ήταν

αντίστροφα. Ωστόσο, συμπεραίνεται πως υφίσταται ο ιός SARS-CoV-2 στα ανθρώπινα λύματα (περιττώματα, ούρα) και επιβεβαιώθηκε επίσης, ότι δεν δύναται να μεταφερθεί ο ιός μέσω των λυμάτων αυτών (Ahmed et. al., 2020).

-

## Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Μέσω της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έγινε παρουσίαση των βασικών εννοιών και των μεθόδων της μικροβιολογίας καθώς και επιδημιολογίας με βάση τα αστικά λύματα (WBE). Επίσης παρουσιάστηκαν οι τρόποι ανίχνευσης του ιού SARS COV-2 με την αρωγή της WBE.

Η παρακολούθηση των λυμάτων σε περιπτώσεις πανδημίας χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη και η εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα είναι ικανή ώστε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με την πορεία της επιδημιολογίας στα λύματα. Από πολλές μελέτες έχει φανεί ότι η εφαρμογή της μεθόδου αυτής δύναται να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού SAR COV-2. Η εξέταση των αστικών λυμάτων στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων μπορεί να συμβάλει στον περιορισμό της διασποράς του ιού μειώνοντας φυσικά και τις αρνητικές συνέπειες μιας τέτοιας πανδημίας. Από τις βασικότερους μεθόδους είναι η εξέταση των ιών ήτοι επιδημιολογία με βάση τα λύματα.

Η μέθοδος αυτή έχει αποδείξει ότι είναι ένα ισχυρό και αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση των λοιμώξεων στα αστικά λύματα. Ωστόσο έως πρόσφατα δεν υπήρχε μια τυποποιημένη μέθοδος εντοπισμού του ιού στα αστικά λύματα. Για την επίτευξη αξιόπιστων αποτελεσμάτων θα πρέπει αρχικά να ακολουθηθούν ορθά οι μέθοδοι δειγματοληψίας, η αποθήκευση, η συγκέντρωση του ιού, της εκχύλισης και απομόνωσης του ιικού RNA και οι μέθοδοι της αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτής-αντίδρασης πολυμεράσης καθώς και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Στις σημαντικότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τη συγκέντρωση του ιού στα αστικά λύματα, συγκαταλέγονται η δειγματοληψία, η αποθήκευση, η συγκέντρωση, η εκχύλιση και η απομόνωση του ιικού RNA, η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτής-αντίδρασης πολυμεράσης, η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο καθώς και η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων με βάση την πολυαιθυλενογλυκόλη. Από τις ανωτέρω μεθόδους, η πιο χρησιμοποιούμενη ήταν αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Βέβαια θα πρέπει να αναφερθεί ότι για την επιτυχή εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα λαμβάνεται υπόψη το νομικό και ηθικό πλαίσιο αφού παρατηρούνται φαινόμενα παραβίασης προσωπικών δεδομένων καθώς και η απροθυμία ατόμων να

συνεργαστούν με τις ισχύουσες νομοθεσίες. Επίσης είναι το ίδιο σημαντικό να πραγματοποιείται μια ορθή μελέτη ώστε να εκτιμάται το κόστος εφαρμογής αφού στις χώρες που είναι οικονομικά ασθενέστερες είναι αρκετά δύσκολο να ανταπεξέλθουν σε ένα κόστος για να παρθούν δείγματα από τα λύματα και πόσο μάλλον για την εφαρμογή της μεθόδου.

Συνίσταται λοιπόν να αναπτυχθούν νέες τεχνολογίες αλλά και τεχνικές όπως είναι για παράδειγμα οι βιοαισθητήρες, η μέθοδος 4S κλπ. ώστε να γίνεται ανίχνευση και εξαγωγή του ιού από τα αστικά λύματα με στόχο την παραπάνω εξέλιξη και αποτελεσματικότητα της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα.

Κλείνοντας αναφέρεται ότι από την απαρχή της πανδημίας του Covid-19 η εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση αστικά λύματα αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο για την επιτήρηση των λοιμωδών νόσων στις κοινότητες. Η συγκεκριμένη τεχνική ενημερώνει έγκαιρα τις κοινότητες αναφορικά με την κατάσταση και τις τάσεις εξάπλωσης του ιού. Ωστόσο η εν λόγω μέθοδος είναι το μόνο εργαλείο το οποίο επιτρέπει την παρακολούθηση του ιού σε πραγματικό χρόνο σε μια ολόκληρη κοινότητα. Η επιδημιολογία με βάση τα λύματα έχει αποδειχθεί ότι είναι μια μέθοδος με στόχο που συμπληρώνει την κλινική επιτήρηση και δύναται να συμβάλλει στην καλύτερη των πόρων για την καταπολέμηση του ιού.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία (χ.χ.).

Cervantes-Avil'es, P., Moreno-Andrade, I., & Carillo-Reyes, J. (2021). Approaches applied to detect SARS-CoV-2 in wastewater and perspectives post-COVID-19. *Journal of Water Process Engineering*, σσ. 1-10.

271/91, K. O. (1991). *Επεξεργασία αστικών λυμάτων*. Ευρωπαϊκή Ένωση. Ανάκτηση 06 23, 2023, από <https://eur-lex.europa.eu/EL/legal-content/summary/urban-waste-water-treatment.html>

Aguiar-Oliveira, M., Campos, A., Matos, A., Rigotto, C., Sotero-Martins, A., Teixeira, P., & Siqueira, M. (2020). Wastewater-Based Epidemiology (WBE) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for COVID-19 Surveillance—A Brief Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9251. doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>

Ahmed, W., Angel, N., & Edson, J. (2021, 08 1). 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. *Science of The Total Environment*. Ανάκτηση 02 18, 2023, από <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720322816?via%3Dihub>

Ahmed, W., Harwood, V., Gyawali, P., Sidhu, J., & Toze, S. (2015). Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(6), 2042-2049. Ανάκτηση 02 16, 2023, από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25576614/>

Alygizakis, N., Markoy, M., Rousis, I., Galani, A., Avgeris, M., Adamopoulos, G., & Thomaidis, S. (2020). Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2. *Trends in Analytical Chemistry*, σσ. 1-7.

Apu, A. (2018, 04). INTRODUCTION TO SEWAGE TREATMENT. Gazipur: Asaduzzaman Apu. Ανάκτηση 02 14, 2023, από [https://www.researchgate.net/publication/324532324\\_INTRODUCTION\\_TO\\_SEWAGE\\_TREATMENT](https://www.researchgate.net/publication/324532324_INTRODUCTION_TO_SEWAGE_TREATMENT)

- Barcelo, B. (2020). Wastewater-Based Epidemiology to monitor COVID-19 outbreak: Present. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, σσ. 1-6.
- Behera, S., Rana, G., Satapathy, S., Mohanty, M., Pradhan, S., Panda, M., & Singh, Y. (2020). Biosensors in diagnosing COVID-19 and recent development. *Sensors International*, 1-8.
- Bijlsma, L., & et. al. (2018). *Análisis de aguas residuales con fines epidemiológicos: Aplicaciones a la estimación del consumo de sustancias de abuso y en salud pública en general*. RED.
- Castiglioni, S. (2015). Wastewater-based epidemiology (WBE): new approach to monitor drug use and emerging trends. *EMCDDA Conference* (σσ. 1-18). Lisbon: SCORE.
- CDC. (2023, 04 11). *How Infections Spread*. Ανάκτηση από Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/spread/index.html>
- Chan, J., Yuan, S., Kok, H., To, W., Chu, H., & Yang, J. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 395, σσ. 514-523.
- Choi, M., Tschärke, J., Donner, E., O'Brien, W., Grant, C., Kaserzon, L., . . . Mueller, F. (2018). Waste-water based epidemiology biomarkers: past, present and future. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 453-469. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>
- Corbett, K., Edwards, D., Leist, S., & et al. (2020). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, σσ. 567-571. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
- Daughton, C. (2020). Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. *Science of the total environment* , σσ. 8-9.
- Day, M. (2020). Covid-19: four fifths of cases are asymptomatic, China figures indicate. *BMI* 369. doi:<https://doi.org/10.1136/bmj.m1375>
- Doak, H., & Zoulikha, M. (2011). *Real-time reverse -transcription polymerase chain reaction: Technical condiseration for gene expression analysis*. New York: Springer.
- EMCDDA. (2020). *European Drug Report*. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA).



- Etievant, S., Bal, A., Escuret, V., Brengel-Pesce, K., Bouscambert, M., Cheynet, V., . . . Gaymard, A. (2020). Performance Assessment of SARS-CoV-2 PCR Assays Developed by WHO Referral Laboratories. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6). doi:10.3390/jcm9061871
- Golconda, Z. (2016, 01 31). Characteristics of sewage and treatment required. Gulbarga. Ανάκτηση 02 14, 2023, από [https://www.researchgate.net/publication/292407057\\_CHARACTERISTICS\\_OF\\_SEWAGE\\_AND\\_TREATMENT\\_REQUIRED](https://www.researchgate.net/publication/292407057_CHARACTERISTICS_OF_SEWAGE_AND_TREATMENT_REQUIRED)
- Gonzalez, R., Curtis, K., Bivins, A., Bibby, K., Weir, H., Yetka, K., & Gonzalez, D. (2020). COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Research*, σσ. 1-9.
- Hamouda, M., Mustafa, F., Maraqa, M., Rizvi, T., & Hassan, A. (2020). Waste-water surveillance for SARS-CoV-2: Lessons learnt from recent. *Science of the Total Environment*, σσ. 1-19.
- Hart, O., & Halden, R. (2020, Αύγουστος 15). Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges. *Science of The Total Environment*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138875>
- Haugland, A., Siefiring, S., Wymer, L., Brenner, K., & Dufor, A. (2005). Comparison of Enterococcus measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Resolution*, 559-568. doi:10.1016/j.watres.2004.11.011.
- Holdshue, L., DeBolt, C., Lindquist, S., Lofy, K., Wiesman, J., Bruce, H., . . . Pillai, K. (2020). First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N.Engl. J. Med*, 929-936.
- Hordern, B., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, de Voogt, P., Emke, E., & Thomas, K. (2014). Wastewater-based epidemiology for the public health monitoring. *Water & Sewerage Journal*, σσ. 25-26.
- <https://www.protocols.io/>. (2023). <https://www.protocols.io/>. Ανάκτηση από Filter the sample through a 5-um PVDF filter via syringe filtration or funnel top vacuum.: [https://www.protocols.io/view/direct-wastewater-rna-capture-and-purification-via-36wgq581ygk5/v1?step=6&version\\_warning=no](https://www.protocols.io/view/direct-wastewater-rna-capture-and-purification-via-36wgq581ygk5/v1?step=6&version_warning=no)

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and. *Nature Reviews Microbiology volume*, 141-154. Ανάκτηση 02 27, 2023, από <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
- Igwenyi, I., & Ibiam, O. (2012, 12 13). Sewage management and its benefits to man. *International Research Journal of Biotechnology*, σσ. 174-189. Ανάκτηση 02 14, 2023, από [https://www.researchgate.net/publication/353378719\\_Sewage\\_management\\_and\\_its\\_benefits\\_to\\_man](https://www.researchgate.net/publication/353378719_Sewage_management_and_its_benefits_to_man)
- Ikner, L., Soto-Beltran, M., & Bright, K. (2011, 05 27). New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for concentration of viruses from tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(10), 3500-3506. Ανάκτηση 02 16, 2023, από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21441329/>
- Jones, D., Baluja, M., & Graham, D. (2020). Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment based spread of Covid 19. *Sci. Total Environ.*, 749. Ανάκτηση 02 23, 2023, από <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720348932?via%3DiHub>
- Kordatou, M., Karaolia, P., & Kassinos, F. (2020). Sewage analysis as a tool for the pandemic response. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, σσ. 1-24.
- Kumar, R. (2023). *Characteristics of Sewage: 3 Characteristics | Waste Management*. Ανάκτηση 02 14, 2023, από <https://www.environmentalpollution.in/>: <https://www.environmentalpollution.in/waste-management/sewage/characteristics-of-sewage-3-characteristics-waste-management/5242>
- La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., Ferraro, G., Veneri, C., Bonadonna, L., . . . Suffredini, E. (2020). First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment*. doi: doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139652.
- Larsen, D., & Wigginton, K. (2020, 09 21). Tracking COVID-19 with wastewater. *Nature Biotechnology*, 38, σσ. 1151-1153. Ανάκτηση 02 18, 2023, από <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0690-1>

- Li, X., Zhang, S., & Shi, J. (2021, 07 1). Uncertainties in estimating SARS-CoV-2 prevalence. *Chemical Engineering Journal*(415). Ανάκτηση 02 12, 2023, από <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894721006318?via%3Dihub>
- Lu, D., Huang, Z., Luo, J., Zhang, X., & Sha, S. (2020). Primary concentration - The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini - review. *Science of the Total Environment*, 1-10.
- Mac Mahon, J., Monleon, A., Gill, L., O'Sullivan, J., & Meijer, W. (2022). Wastewater-based epidemiology (WBE) for SARS-CoV-2 – A review focussing on the significance of the sewer network using a Dublin city catchment case study. *Water Science and Technology*, 1402-1425.
- Maida, C., Amodio, E., Mazzuco, W., La Rosa, G., Lucentini, L., Suffredini, E., . . . Tramuto, F. (2022). Wastewater-based epidemiology for early warning of SARS-COV-2 circulation: A pilot study conducted in Sicily, Italy. *Int J Hyg Environ Health*.
- Mandal, H. (2014). Influence of Wastewater PH on Turbidity. *International Journal of Environmental Research and Development*, σσ. 105-114.
- Mao, K., Zhang, H., & Yang, Z. (2020). The potential of an integrated biosensor system with mobile health and wastewaterbased epidemiology (iBMW) for the prevention, surveillance, monitoring and intervention of the COVID-19 pandemic. *Biosensors and Bioelectronics*, 1-21.
- Medema, G., Heijen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., & Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 in Sewage. *MedRxiv*. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>
- Nalla, A., Casto, A., Huang, M., Perchetti, G., Sampoleo, R., Shrestha, L., . . . Greniger, A. (2020). Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. *Journal Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00557-20
- nature.com. (2023, 05 22). The potential of wastewater-based epidemiology. *Nat Water*, σ. 399. doi:<https://doi.org/10.1038/s44221-023-00093-6>

- Nghiem, D., Morgan, B., Donner, E., & Short, D. (2020). The COVID-19 pandemic: Considerations for the waste and wastewater services sector. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, σσ. 1-5.
- Orive, G., Lertxundi, U., & Barcelo, D. (2020). Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. *Science of the Total Environment* .
- Pandey, D., Verma, P., Mahanty, B., Dutta, K., Daverey, A., & Arunachalam, K. (2021). SARS-CoV-2 in wastewater: Challenges for developing countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, σσ. 1-8.
- Petala, M., Dafou, D., Kostoglou, M., Karapantsios, T., Kanata, E., Chatziefstathiou, A., . . . Papaioannou, N. (2021, 02 10). A physicochemical model for rationalizing SARS-CoV-2 concentration in sewage. Case study: The city of Thessaloniki in Greece. *Science of the Total Environment*, 755(Part 1). Ανάκτηση 02 12, 2023, από [10.1016/j.scitotenv.2020.142855](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142855)
- Pilevar, M., Kim, T., & Lee, H. (2020). Recent advances in biosensors for detecting viruses in water and wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 17-27.
- Polo, D., Quintela-Baluja, M., Corbishley, A., Jones, L., Singer, C., Graham, W., & Romalde, L. (2020). Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 –approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Research*, σσ. 1-8.
- Prichard, J., Hall, W., Zuccato, E., Voogt, P., Voulvoulis, N., Kummerer, K., . . . Castiglioni, S. (2015). *Ethical research guidelines for wastewater-based epidemiology and related fields*. Bath: SCORE.
- 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 Research*. Ανάκτηση 05 05, 2023, από <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135420304796?via%3DiHub>
- Reboud, J., Xu, G., Garrett, A., Adriko, M., Yang, Z., Tukahebwas, E., . . . Cooper, M. (2019, 02 19). Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource. *PNAS*, σσ. 4834-4842. Ανάκτηση 02 21, 2023, από <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1812296116>

- Sims, N., & Kasprzyk-Hordén, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring. *Environment International*, σσ. 1-13.
- Singer, A., Thompson, J., Filho, C., Street, R., Li, X., Castiglioni, S., & Thoas, K. (2023). A world of wastewater-based epidemiology. *Nature Water*, 408-415.
- Tanimoto, Y., Ito, E., Miyamoto, S., Mori, A., Morimoto, T., & Iwamoto, T. (2022). SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Was Highly Correlated With the Number of COVID-19 Cases During the Fourth and Fifth Pandemic Wave in Kobe City, Japan. *Front. Microbiol., Sec. Virology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.892447>
- Tran, N., Truong, G., Nguyen, T., Juang, S., Rinklebe, J., Bhatnagar, A., & Chao, P. (2020). SARS-COV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environmental Research*, 1-50.
- Verovšek, T., Matasic, K., Heath, D., & Heath, E. (2020). Site and even specific wastewater based epidemiology: current status and future perspectives. *Trends in environmental analytical chemistry*, σσ. 64-65.
- Vidyasagar, A. (2022, 05 13). *What are viruses?* Ανάκτηση από <https://www.livescience.com/>: <https://www.livescience.com/53272-what-is-a-virus.html>
- Vogels, C., Brito, A., Wyllie, A., Ott, I., Kalinich, C., . . . et., a. (2020). Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature Microbiology volume, 5*, 1299-1305. doi:<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- Whitney, N., Kennedy, C., Fan, V., Hinkle, A., Kantor, R., Greenwald, H., & Nelson, L. (2020). Sewage, Salt, Silica and SARS-CoV-2 (4S): An economical kit-free method for direct capture of SARS-CoV-2 RNA from wastewater. *Environmental Science & Technology*, σσ. 1-24. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.12.01.20242131>
- Wu, F., Xiao, A., & Zhang, J. (2020, 07 06). SARS-CoV-2 titers in wastewater foreshadow dynamics and clinical presentation of new COVID-19 Cases. *medRxiv*. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.06.15.20117747>
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, M., & Moulin, L. (2020). Time Course Quantitative Detection of SARS-CoV-2 in Parisian Wastewaters Correlates With COVID-19 Confirmed Cases. *MedRxiv preprint*. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>

Zahedi, A., Monis, P., Deere, D., & Ryan, U. (2021). Wastewater-based epidemiology—surveillance and early detection of waterborne pathogens with a focus on SARS-CoV-2, Cryptosporidium and Giardia. *Parasitology Research*, σσ. 1467- 4188. doi:<https://doi.org/10.1007/s00436-020-07023-5>

Zheng, S., Fan, J., Feng, B., Lou, B., Zou, Q., Xie, G., . . . Liang, T. (2020). Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China. *BMI* 369, 1443. doi:<https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>

Αναστασοπούλου, Κ. (2020). *Μικροβιολογία: Γενικά περί ιών*. Αθήνα: Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ. Ανάκτηση 04 28, 2023, από <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/MED833/%CE%9C%CE%91%CE%98%CE%97%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%91%20%CE%91%CE%9C%CE%A6%CE%99%CE%98%CE%95%CE%91%CE%A4%CE%A1%CE%9F%CE%A5/%CE%93%CE%B5%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AC%20%CF%80%CE%B5%CF%81%CE%AF%20%CE%B9%CF%8E%CE%>

ΕΜΠ. (2023). Προκλήσεις που προκύπτουν στη διαχείριση των αστικών λυμάτων από την επικείμενη αναθεώρηση της Οδηγίας 91/271. *Water: Innovation and Circularity Conference*. Αθήνα.

ΕΟΔΥ. (2023). *Εβδομαδιαία Έκθεση, Επιδημιολογικής Επιτήρησης Αναπνευστικών Λοιμώξεων, Εβδομάδα 32/2023 (07 Αυγούστου 2023 – 13 Αυγούστου 2023, Σύνοψη επιδημιολογικών δεδομένων – εβδομάδα 32/2023*. Αθήνα : ΕΟΔΥ.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο. (2023). *Πρόταση απόφασης (COM(2022)0541 – C9-6363/2022 – 2022/0345(COD)) - Επεξεργασία των αστικών λυμάτων*. Ευρωπαϊκή Ένωση. Ανάκτηση 09 25, 2023, από [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-9-2023-0276-AM-001-252\\_EL.pdf](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-9-2023-0276-AM-001-252_EL.pdf)

Ζαφειρόπουλος, Α., Καρακασιλιώτης, Ι., Μπελούκας, Α., Σουρβίνος, Γ., & Σπανάκης, Ν. (2020). Ιοί- Χαρακτηριστικά και Δομή. Στο Α. Ζαφειρόπουλος, Ι. Καρακασιλιώτης, Α. Μπελούκας, Γ. Σουρβίνος, & Ν. Σπανάκης, *Ιολογία Shors: Εξερευνώντας τους Ιούς*. Αθήνα : Ελληνικές Εκδόσεις.

Kasprzyk-Hordern, B. (2014). Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. *Water and Sewerage Journal*, 25-26.

Μαμάης, Δ. (2023). Προκλήσεις που προκύπτουν στη διαχείριση αστικών λυμάτων από την επικείμενη αναθεώρηση της Οδηγίας 91/271. (σσ. 1-22). Αθήνα : ΕΜΠ.

Μαρκόπουλος , Π. (2021, 05). Μικροβιολογία και επιδημιολογία λυμάτων στην εποχή της πανδημίας του Covid-19. Πάτρα: ΕΑΠ.

ΠΟΥ. (2023, 04 25). *Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts*. Ανάκτηση από Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>

Τζαβάρα, Ε. (2022, Φεβρουάριος). Επιδημιολογία και μικροβιακή αντοχή με βάση τα λύματα - Ειδική εστίαση στην πανδημία SARS-COV-2. Αθήνα: ΕΜΠ .