

Datagrundlag for spildevandsovervågning af SARS-CoV-2 i Danmark

1. Hvor måles SARS-CoV-2 i spildevandet?	1
1.1. Omfang af spildevandsovervågningen	1
2. Hvordan måles SARS-CoV-2 i spildevandet?	2
3. Hvordan beregnes det normaliserede mål for SARS-CoV-2 koncentrationen i spildevandet?.....	2
4. Kvalitetskontrol af spildevandsdata fra Eurofins Miljø A/S - foretaget af SSI:	3
4.1 Afvigende fæcesindikatorer	3
4.2 Outlier kontrol af de fæcesnormaliserede SARS-CoV-2 værdier	4
4.2.1 Prædiktion af outlier	4
5. Hvordan opgøres de endelige resultater af spildevandsmålingerne?	5
5.1 Ugentlig vægtet gennemsnit	5
5.1.1 Incidens.....	5
5.2 Tendens beregning (vækstrate)	5
5.2.1 Kategorisering og visualisering af vækstrater	6
6. Overvågning af SARS-CoV-2-varianter i spildevand	7

1. Hvor måles SARS-CoV-2 i spildevandet?

I den nationale overvågning af SARS-CoV-2 i spildevand udtages der aktuelt 87 spildevandsprøver fra 83 rensesanlæg i hele Danmark, idet der udtages, prøver fra flere indløb på tre rensesanlæg. På store rensesanlæg, der renser spildevand fra mange borgere (mere end 150.000), udtages der desuden spildevandsprøver ude i kloaksystemet (på pumpestationer og i brønde) for at opdele området - der udtages aktuelt 7 decentrale prøver.

Endeligt udtages der spildevandsprøver fra Kastrup, Aarhus, Billund og Aalborg lufthavn med særligt fokus på overvågning af SARS-CoV-2 varianter.

1.1. Omfang af spildevandsovervågningen

- I perioden **01.01.2022 til 08.07.2022** blev der udtaget 202 prøver fra 198 rensesanlæg samt 26 prøver fra decentrale prøvetagningssteder tre gange ugentligt. Yderligere seks prøver blev udtaget tre gange ugentligt fra de fire ovennævnte lufthavne.
- I perioden **09.07.2022 og frem til dags dato** udtages der 87 prøver fra 83 rensesanlæg to gange om ugen. Derudover er der aktuelt inkluderet syv decentrale prøvetagningssteder med to ugentlige prøver. Lufthavnene indgår med seks prøver to gange ugentlig fra de fire lufthavne, frem til den 10.02.2022 blev der taget prøver dagligt fra lufthavnene.



2. Hvordan måles SARS-CoV-2 i spildevandet?

- Genkopier (RNA) fra virussen SARS-CoV-2 udskilles med afføringen hos ca. halvdelen af de smittede personer og kan derfor måles i spildevandet.
- Spildevandsprøverne udtages ved hjælp af en automatisk prøveopsamler, der opsamler små prøver af spildevand over ca. 24 timer. Spildevandsprøven transporteres derefter nedkølet til det laboratorium, der foretager analyserne. I laboratoriet forbehandles og oprenses spildevandet, hvorefter det analyseres med PCR-test (RT-qPCR) for antal RNA-kopier af SARS-CoV-2 (N1, N2, RdRp) pr. liter spildevand samt for to andre ufarlige og naturligt forekommende vira/bakteriofager (PMMoV og CrAssphage), der begge udskilles i afføringen. PMMoV og CrAssphage kan derfor bruges som et indirekte mål for mængden af afføring i spildevandet (fæces indikatorer). Ved at normalisere den målte SARS-CoV-2 koncentration med fæcesindikatorerne kan der i resultaterne højde for såvel fortynding af spildevandet eks. på grund af regnvand som for antal brugere af kloaksystemet i de enkelte oplande.
- Laboratorieresultaterne af spildevandsanalyserne rapporteres i RNA kopier/L og sendes til Statens Serum Institut (SSI), hvor de vurderes og indgår i analyser. Resultaterne præsenteres på SSI's hjemmeside.

3. Hvordan beregnes det normaliserede mål for SARS-CoV-2 koncentrationen i spildevandet?

Analyserne af N1-genet har været ustabile, hvorfor dette gen ikke indgår i analyserne. Alle værdier \log_{10} transformeres inden nedenstående beregninger og analyser foretages.

Resultatet af PCR-testen kan være;

- 1) SARS-CoV-2 kan ikke detekteres dvs. er under Limit of Detection (LOD)
- 2) SARS-CoV-2 kan detekteres men ikke kvantificeres Limit of Quantification (LOQ)
- 3) SARS-CoV-2 kan kvantificeres

Grænserne for LOD og LOQ svinger fra prøve til prøve og oplyses for hver enkelt prøve. I tilfælde af, at en prøves resultat på ét eller begge SARS-CoV-2 gener, er under LOD eller LOQ behandles det på følgende måde:

$$< LOQ = \frac{LOD + LOQ}{2} \quad (3.1)$$

$$< LOD = \frac{LOD}{2} \quad (3.2)$$



De tre gener på SARS-CoV-2 samt de to fæcesindikatorer analyseres på to PCR-kits (Kit 1; RdRp + Crassphage og kit 2; N1, N2 + PMMoV), for hver enkelt prøve foretages der derfor en kit-vis normalisering af henholdsvis N2 og RdRp.

$$\text{Kit 1: } RdRp_{crAss} = \log_{10} \left(\frac{RdRp_{copies}}{L} \right) - \log_{10} \left(\frac{crAss_{copies}}{L} \right) \quad (3.3)$$

$$\text{Kit 2: } N2_{PMMoV} = \log_{10} \left(\frac{N2_{copies}}{L} \right) - \log_{10} \left(\frac{PMMoV_{copies}}{L} \right) \quad (3.4)$$

$$\log_{10} RNA_{faecal_normalised} = \frac{RdRp_{crAss} + N2_{PMMoV}}{2} \quad (3.5)$$

For hver prøve er det endelige mål for SARS-CoV-2 i spildevandet den gennemsnitlige værdi af de to fæcesnormaliserede gener (N2 og RdRp) målt i RNA kopier/L spildevand.

Inden de gennemsnitlige normaliserede værdier præsenteres i grafer tilbagetransformeres værdierne fra log10 til normalskala. Ved tilbagetransformationen benyttes desuden en skaleringsfaktor - udregningen er som følger:

$$RNA_{faeces_mean} = 10^{\log_{10} RNA_{faeces_normalised}} * 10e6, (svarer til 10^7) \quad (3.6)$$

4. Kvalitetskontrol af spildevandsdata fra Eurofins Miljø A/S - foretaget af SSI:

Alle værdier log10 transformeres inden nedenstående beregninger og analyser foretages.

Der pågår en løbende dialog mellem SSI og Eurofins Miljø A/S vedrørende kvalitetskontrol og sikring af spildevandsdata. Følgende faste kvalitetskontroller bliver foretaget af SSI med henblik på at ekskludere data med større afvigelse end den forventede variation. Derudover inspiceres og undersøges data løbende efter behov.

- Afvigende fæcesindikatorer
- Outlier kontrol af de fæcesnormaliserede SARS-CoV-2 værdier Prædiktion af outlier

4.1 Afvigende fæcesindikatorer

Formålet med denne kontrol er at ekskludere spildevandsprøver, der ikke er repræsentative for spildevandet fra prøveudtagningsstedet, vurderet på baggrund af fæcesindholdet i prøven. Såfremt gennemsnittet af PMMoV og crAssphage (fæcesindikatorerne) afviger mere end ± 3 standard afvigelser (SD) fra det historiske gennemsnit, ekskluderes prøven fra de efterfølgende beregninger. Denne kontrol er udført på data fra d. 01.01.2022 og til dags dato.



4.2 Outlier kontrol af de fæcesnormaliserede SARS-CoV-2 værdier

I de tilfælde, hvor kun det ene af de to fæcesnormaliserede SARS-CoV-2 gener afviger er det muligt at identificere eventuelle outliers. Kontrollen foretages på pladeniveau¹. For hver prøve er der beregnet en logaritmisk forskel mellem de to gener, med RdRp som baseline.

$$\log_{10}_{diff} = \log_{10}(RdRp_{crAssphage}) - \log_{10}(N2_{PMMoV}) \quad (4.1)$$

Herefter findes der en median af denne forskel på hver plade.

$$median_{plade} = median(\log_{10}_{diff}) \quad (4.2)$$

Medianerne benyttes til at beregne den vægtede median af alle plader de seneste fire uger, samt den vægtede øvre (Q3) og nedre (Q1) kvartil. Alle vægtes med antallet af prøver på hver plade - log10 transformeret.

$$w.median_{4uger} = weighted.median(median_{plade}), w = \log_{10}(\#prøver) \quad (4.3)$$

Der beregnes et interquartile range (IQR) ved:

$$IQR = Q3 - Q1 \quad (4.4)$$

Der opstilles en øvre og nedre outlier grænse baseret på den beregnede IQR og de tilhørende øvre (Q3) og nedre (Q1) kvartiler.

$$IQR_{lo} = Q1 - 1.5 * IQR \quad (4.5)$$

$$IQR_{hi} = Q3 + 1.5 * IQR \quad (4.6)$$

Såfremt en plade opfylder ét af nedenstående kriterier, kategoriseres den som en outlier.

$$median_{plade} > IQR_{hi} \quad (4.7)$$

$$median_{plade} < IQR_{lo} \quad (4.8)$$

Altså bliver hver enkelt plades median sammenholdt med medianen af de 4 foregående uger.

4.2.1 Prædiktion af outlier

For hver plade, der er kategoriseret som en outlier identificeres hvilket af generne, der afviger. Dette gøres ved at se på, hvilket af de to gener der har haft den største ændring for hvert prøvested, siden seneste prøve der ikke var en outlier (max syv dage imellem prøverne). Derefter beregnes Sum of Squares (SSQ) for hver plade, SSQ er udtryk for hvilket gen, der varierer mest. Det gen med den største SSQ, er det gen som prædikteres.

Prædiktionen sker på baggrund af det andet gen samt den vægtede median af de to gener over de seneste fire uger. De to fæcesnormaliserede gener vil herefter prædikteres på følgende måde:

$$RdRp_{præd} = N2_{PMMoV} + w.median_{4uger} \quad (4.9)$$

$$N2_{præd} = RdRp_{crAss} - w.median_{4uger} \quad (4.10)$$

¹ PCR-tests foretages på plader med flere spildevandsprøver. Eventuelle usikkerheder ved PCR-test knytter sig derfor til den specifikke plade og ikke til eksempelvis datoen for spildevandsprøven



Herefter indgår de prædikterede værdier på samme vis i de videre beregninger som beskrevet i afsnit 3, ligning 3.5. Denne outlier detektion og prædiktion er implementeret d. 21.11.2022 med bagudrettet effekt på data tilbage fra 01.01.2022.

5 Hvordan opgøres de endelige resultater af spildevandsmålingerne?

Spildevandsresultaterne vises fra 01.01.2022 og fortløbende. Resultaterne præsenteres samlet for hele landet, for de fem regioner samt for hvert prøveudtagningssted. Alle beregninger relateret til spildevandsmålingerne foretages på baggrund af logaritmetransformerede (\log_{10}) værdier.

Der indgår to overordnede kategorier af spildevandsresultaterne:

- Ugentligt vægtet gennemsnit af viruskoncentrationen af SARS-CoV-2 i spildevandet.
- Vækstrate der beskriver væksten (stigende, stabil eller faldende) baseret på de tre seneste ugers spildevandsdata.

5.1 Ugentlig vægtet gennemsnit

- Viruskoncentrationen af SARS-CoV-2 i spildevandet opgøres som det gennemsnitlige ugentlige antal SARS-CoV-2 RNA-kopier, i forhold til de tidligere omtalte fæcesindikatorer (PMMoV og CrAssphage), som beskrevet i afsnit 2 og 3.
- I de overordnede grafer (nationalt og regionalt) vægtes resultaterne fra hvert renselanlæg efter antal indbyggere i oplandet (\log_{10} indbyggere).

5.1.1 Incidens

- Den ugentlige incidens er beregnet som summen af det antal borgere pr. 100.000, der er testet positive for SARS-CoV-2 (PCR-test) i de foregående syv dage til og med udtagning af spildevandsprøven. Incidensen repræsenterer den andel af befolkningen som dækkes af spildevandsovervågningen. Spildevandsresultater samt incidens fra decentrale prøveudtagningssteder og lufthavne indgår ikke i de overordnede grafer. Incidensen vises sammen med SARS-CoV-2 koncentrationen i spildevandet i grafer.

5.2 Tendens beregning (vækstrate)

På nationalt og regionalt niveau beregnes der en vækstrate der beskriver tendensen i SARS-CoV-2 koncentrationen baseret på de seneste tre ugers data. Vækstraten er således den gennemsnitlige ugentlige ændring i væksten gennem de seneste tre uger. Vækstraten er beregnet ved at benytte en mixed-effects model med hvert anlæg som random effect.










Estimatet fra modellen omregnes til den gennemsnitlige ugentlige procentvise ændring over de seneste tre uger som vist i formel (5.1)

$$vækstrate = (10^{estimate*7} - 1) * 100 \quad (5.1)$$

5.2.1 Kategorisering og visualisering af vækstrater

Der er opsat syv kategorier for at beskrive udviklingen der ses i spildevandsovervågningen.

Meget kraftig stigning	> 50%	
Kraftig stigning	25% til 49%	
Stigning	10% til 24%	
Stabilt niveau	-9% til 9%	
Fald	-24% til -10%	
Kraftigt fald	-25% til -49%	
Meget kraftigt fald	< -50%	

Vækstgraferne indeholder de seneste otte ugers spildevandsdata som beskrevet i afsnit 5.1. De seneste tre uger er farvet efter den kategori som vækstraten falder inden for, sammen med det faktiske numeriske estimat for vækstraten. Eksempel på dette kan ses i den ugentlig offentliggørelse af spildevandsresultater på <https://covid19.ssi.dk/overvagningsdata/overvaagning-af-sarscov2-i-spildevand>.



6 Overvågning af SARS-CoV-2-varianter i spildevand

Spildevandet undersøges for kendte SARS-CoV-2 varianter, som supplement til overvågningen af virusvarianter i personprøver. Hver uge udvælges den af de to prøver fra hvert renseanlæg eller pumpestation, der har det højeste virusload til yderligere analyse. Op til 50 af disse prøver sekventeres hver uge.

Resultater fra spildevandsovervågningen vises fra uge 14 og fortløbende. Før uge 28 er tallene baseret på op til 230 ugentlige sekventeringer fra samme antal prøvesteder med prøveudtagning tre gange om ugen. Fra uge 28 og frem er tallene baseret på prøver fra 94 renseanlæg og pumpestationer jvf. den vedtagne nedskalering i antallet af prøver og prøvesteder.

Der undersøges de varianter, som The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) til enhver tid vurderer er aktuelle variants of concern (VOCs) og variants of interest (VOIs). Analysen foregår ved at sekventere en del af spike-genet, der koder for spikeproteinet på overfladen af viruspartiklerne. Ud fra denne gen-sekvens kan man i vid udstrækning adskille og overvåge de forskellige SARS-CoV-2-varianter.

Resultaterne vises som et samlet resultat for hele landet samt for hver region.

Der udregnes en normaliseringsfaktor, som benyttes i de aggregerede resultater. Normaliseringsfaktoren udregnes ud fra forholdet mellem virus-RNA-koncentrationen i prøven og antal beboere i det tilhørende opland. De normaliserede værdier for hvert prøvested lægges herefter sammen for hver region eller for hele landet, og den procentdel, som en given variant udgør, kan derefter udregnes.

Eksklusion af enkelte uger skyldes tekniske udfordringer. Koncentrationen af SARS-CoV-2 er generelt lavere i spildevand end i personpodninger pga. det store spildevandsvolumen, og virus i spildevand bliver delvist nedbrudt på grund af længerevarende ophold i kloaknetværket. Sekventeringsanalysen har en lavere sensitivitet end den primære PCR-analyse, som har til formål at kvantificere antal RNA-kopier af SARS-CoV-2 i spildevandsprøverne. Dette skyldes, at sekventeringsanalysen kræver tilstedeværelse af længere genstykker end den primære PCR-analyse. Sammenlagt bevirker dette, at det ikke vil være muligt at få et variantanalyse-resultat for alle de prøver, der påviste tilstedeværelsen SARS-CoV-2 i de primære PCR-analyser.