

## Datagrundlag for spildevandsovervågning af SARS-CoV-2 i Danmark

1. Hvor måles SARS-CoV-2 i spildevandet? .....	1
1.1. Omfang af spildevandsovervågningen .....	1
1.2. Laboratorieanalyse .....	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. Hvordan opgøres de endelige resultater af spildevandsmålingerne? .....	4
4.1. Ugentlig vægtet gennemsnit .....	4
4.2. Tendensberegning (vækstrate) .....	4
4.2.1. Kategorisering og visualisering af vækstrater .....	4
4.3. Niveauvurdering .....	5
5. Laboratoriebestemmelser af detektionsgrænser og kvantifikationsgrænser .....	6
6. Databehandling .....	6
6.1. Detektionsgrænse .....	6
6.2. Kvantifikationsgrænse .....	6

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

I den nationale overvågning af SARS-CoV-2 i spildevand udtages der aktuelt 29 spildevandsprøver fra 28 renseanlæg i hele Danmark, idet der udtages prøver fra to indløb på et renseanlæg (Lynetten).

#### 1.1. Omfang af spildevandsovervågningen

- I perioden 04.02.2023 og frem til dags dato udtages der 29 prøver fra 28 renseanlæg to gange om ugen.
- I perioden 09.07.2022 til 03.02.2023 blev der udtaget 87 prøver fra 83 renseanlæg to gange om ugen. Derudover var der inkluderet syv decentrale prøvetagningssteder med to ugentlige prøver.
- I perioden 01.01.2022 til 08.07.2022 blev der udtaget 202 prøver fra 198 renseanlæg samt 26 prøver fra decentrale prøvetagningssteder tre gange ugentligt.

#### 1.2. Laboratorieanalyse

- Frem til 31.03.2023 varetog Eurofins Miljø A/S laboratorieanalyserne.



- Fra den 01.04.2023 varetages laboratorieanalyserne af TestCenter Danmark, Statens Serum Institut.

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

- SARS-CoV-2-virus 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. Spildevandsprøverne transporteres derefter nedkølet til Statens Serum Institut, hvor laboratorieanalyserne foretages af TestCenter Danmark (TCDK). I laboratoriet koncentrerer og oprenses virus fra spildevandet, hvorefter det analyseres med PCR-test (RT-qPCR) for antal RNA-kopier af udvalgte SARS-CoV-2-gener pr liter spildevand samt for en anden ufarlig og naturligt forekommende virus Pepper mild mottle virus (PMMoV), der ligeledes udskilles i afføringen. PMMoV kan derfor bruges som et indirekte mål for mængden af afføring i spildevandet. Ved at normalisere den målte SARS-CoV-2-koncentration med PMMoV kan der i resultaterne tages højde for såvel fortynding af spildevandet fx på grund af regnvand som for antal brugere af kloaksystemet i de enkelte oplande.
- Laboratorieresultaterne af spildevandsanalyserne rapporteres til Infektionsepidemiologisk afdeling på Statens Serum Institut (SSI), hvor de vurderes og indgår i statistiske analyser. Resultaterne præsenteres på SSI's hjemmeside [National overvågning af SARS-CoV-2 i spildevandet \(ssi.dk\)](https://www.ssi.dk/national-overvaegning-af-sars-cov-2-i-spildevandet).

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

For hver spildevandsprøve (oprensning af prøven) laves i alt fire PCR-analyser fordelt på to PCR-kits;

- Kit 1; SARS-CoV-2-generne N1 og E,
- Kit 2; SARS-CoV-2-genet N2 og den fækale indikator PMMoV.

PCR-analyserne udføres som tekniske triplikater, dvs. hvert gen analyseres ved tre uafhængige PCR-tests fra samme oprensning. Dette gøres for at øge præcisionen og robustheden af testresultaterne. N1, N2 og PMMoV indgår i nedenstående analyser og datahåndtering. Resultaterne af analyserne af E-genet anvendes ikke, da de er forbundet med stor usikkerhed.

Resultatet af PCR-testene opgøres som antal SARS-CoV-2-kopier eller antal PMMoV kopier pr brønd, dvs. pr den mængde oprenset materiale der er PCR-testet. PCR-testen har et signal hvis der påvises RNA i brønden. Et manglende signal i en eller flere af de tre PCR-tests tildeles værdien 0 kopier pr brønd. Idet der i analysen tages udgangspunkt i triplikater er det vurderet at både kvantifikations- og detektionsgrænsen for gennemsnittet af triplikaterne er 3 kopier pr brønd. Se baggrund i bilag 1.



For SARS-CoV-2-generne beregnes det gennemsnitlige antal kopier målt i de tre PCR-tests. I tilfælde af, at der foreligger resultater for færre end tre af triplikaterne, tages der sammen med laboratoriet stilling til om resultatet for det pågældende gen kan bruges. For godkendte prøver bestemmes det gennemsnitlige antal kopier på nedenstående måde:

- Ved signal i mindst to af de tre triplikater & et gennemsnitlig antal kopier  $\geq 3$ , benyttes gennemsnittet direkte i de videre beregninger.
- Ved signal i mindst to af de tre triplikater & et gennemsnitlig antal kopier  $< 3$ , bestemmes det gennemsnitlige antal kopier til 1,5.
- Ved signal i kun en af de tre PCR-tests bestemmes det gennemsnitlige antal kopier til 0,5.
- Ved manglende signal i alle de tre PCR-tests bestemmes det gennemsnitlige antal kopier til 0,25<sup>1</sup>.

Derefter omregnes antallet af RNA kopier pr brønd til antal kopier pr liter spildevand ved brug af udtrykket

$$RNA_{kopier\_l} = RNA_{kopier\_per\_brønd} * 20 * 100.$$

Faktoren 20 korrigerer for at der benyttes 0,005mL af en oprensning på 0,1mL i PCR-reaktionen. Faktoren 100 korrigerer for at der oprenses fra 10mL spildevand.

Antal RNA-kopier pr liter spildevand  $\log_{10}$  transformerer. Derefter foretages nedenstående beregninger og analyser.

For hver prøve er målet den fæcesnormaliserede koncentration af SARS-CoV-2 i spildevandet. Koncentrationen findes ved at beregne et gennemsnit af SARS-CoV-2-RNA-kopier pr liter spildevand, målt med de to SARS-CoV-2 gener. Derefter normaliseres SARS-CoV-2-gennemsnittet med fækalieindikatoren PMMoV. Dette giver at

$$\log_{10}(RNA_{faeces\_mean\_normalised}) = \frac{\log_{10}(N1) + \log_{10}(N2)}{2} - \log_{10}(PMMoV).$$

Inden de gennemsnitlige normaliserede værdier præsenteres i grafer, tilbagetransformerer værdierne fra  $\log_{10}$  skala til normalskala. Ved tilbagetransformationen benyttes desuden skaleringsfaktoren  $10^7$ , som er indført for at gøre resultaterne lettere at aflæse og forstå. Dette giver at

$$\widehat{RNA}_{faeces\_mean\_normalised} = 10^{\log_{10}(RNA_{faeces\_mean\_normalised})} * 10^7 = RNA_{faeces\_mean\_normalised} * 10^7$$

---

<sup>1</sup> Da værdierne i de efterfølgende beregninger bliver logaritmetransformeret, sættes det gennemsnitlige antal kopier ved manglende signal i alle tests til 0,25 fremfor 0.



## 4. Hvordan opgøres de endelige resultater af spildevandsmålingerne?

Spildevandsresultaterne 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, som beskrives nedenfor.

### 4.1. Ugentlig vægtet gennemsnit

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

### 4.2. Tendensberegning (vækstrate)

På nationalt niveau beregnes 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 koncentrationen henover de seneste tre uger. Vækstraten er beregnet ved at benytte en mixed-effects model med renselanlæg som random effect.

Estimatet fra modellen omregnes til den gennemsnitlige ugentlige procentvise ændring ved

$$\text{gennemsnitlig ugentlig tilvækst} = (10^{\text{vækstrate} \cdot 7} - 1) * 100\%.$$

#### 4.2.1. Kategorisering og visualisering af vækstrater

Vækstraten klassificeres ved en af de syv kategorier i Tabel 1.

Tabel 1: Kategorisering af vækstrater

Kategori	Gennemsnitlig ugentlig tilvækst	
Meget kraftig stigning	$\geq 50\%$	
Kraftig stigning	25 % til 49 %	
Stigning	10 % til 24 %	
Stabilt niveau	-9 % til 9 %	
Fald	-24 % til -10 %	
Kraftigt fald	-49 % til -25 %	
Meget kraftigt fald	$\leq -50\%$	



Vækstraten vises i figuren over de normaliserede koncentrationer af SARS-CoV-2 i spildevandet. De seneste tre uger, som estimatet for vækstraten baseres på, er farvet efter den kategori som vækstraten falder inden for, sammen med det faktiske numeriske estimat for vækstraten. Dette kan ses i den ugentlige offentliggørelse af spildevandsresultater på [hjemmesiden for den nationale overvågning af SARS-CoV-2 i spildevandet](#).

### 4.3. Niveauvurdering

Med udgangspunkt i den højeste og den laveste observerede værdi af det vægtede ugentlige gennemsnit af SARS-CoV-2-koncentrationer i perioden 29.06.23 - 07.12.23, er der fastlagt fem niveauer. Grænserne mellem disse niveauer er fordelt ligeligt på en logaritmisk skala og beregnet således at den laveste og højeste koncentration falder i henholdsvis kategorierne ”Meget lavt niveau” og ”Meget højt niveau”. De fastsatte niveauer kan ses i Tabel 2.

Niveauerne er markeret som horisontale bånd i grafen over de normaliserede koncentrationer af SARS-CoV-2 i spildevandet, som ligger på [hjemmesiden](#) og opdateres ugentligt.

Tabel 2: Niveauer for den normaliserede SARS-CoV-2-koncentration i spildevandet

Niveau	Normaliseret SARS-CoV-2-koncentration (kopier / L)	
Meget højt niveau	$\geq 12800$	
Højt niveau	3200 til 12800	
Middel niveau	800 til 3200	
Lavt niveau	200 til 800	
Meget lavt niveau	$< 200$	



## Bilag

### 5. Laboratoriebestemmelser af detektionsgrænser og kvantifikationsgrænser

For at bestemme detektions- og kvantifikationsgrænser er der lavet tre uafhængige fortyndingsrækker for hvert SARS-CoV-2-gen. For hver fortynding er der lavet 24 tekniske gentagelser, så der i alt er 72 datapunkter pr koncentration for hvert gen.

Detektionsgrænsen sættes så der forventes detektion i mindst 95% af brøndene og kvantifikationsgrænsen sættes så variationskoefficienten er under 35%.

I forsøget blev der lavet fortyndinger, hvor der forventes 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 og 128 kopier pr brønd. På den baggrund er detektions- og kvantifikationsgrænserne valgt som de laveste koncentrationer, der opfylder kriterierne.

Tabel 3 viser de fundne grænser for de to SARS-CoV-2-gener som indgår i analyserne.

*Tabel 3: Detektions- og kvantifikationsgrænser for de to SARS-CoV-2-gener i enkeltbrønde*

	Detektionsgrænse (kopier pr brønd)	Kvantifikationsgrænse (kopier pr brønd)
N1-genet	4	8
N2-genet	2	16

### 6. Databehandling

Med udgangspunkt i ovenstående laboratoriebestemmelse af detektions- og kvantifikationsgrænser for enkelte brønde beskrives her baggrunden for de valgte grænser baseret på dataanalyse af de tekniske triplikater.

#### 6.1. Detektionsgrænse

Udgangspunktet for valg af detektionsgrænse er, at man vil være sikker på at få signal i 95% af de prøver der testes. Antal kopier i en brønd følger som udgangspunkt en Poisson-fordeling. Den teoretiske grænse er, givet Poisson-variationen, at der i gennemsnit skal være mindst 3 kopier pr brønd for at få signal i 95% af de analyserede prøver. Hvis man i stedet for at kigge på den enkelte brønd, kigger på tekniske triplikater, vil man ved 95% sandsynlighed for detektion i hver brønd have over 99% sandsynlighed for detektion i mindst to brønde. Såfremt der er signal i mindre end to brønde tages der udgangspunkt i antal brønde med signal for at give et estimat af antal kopier pr brønd.

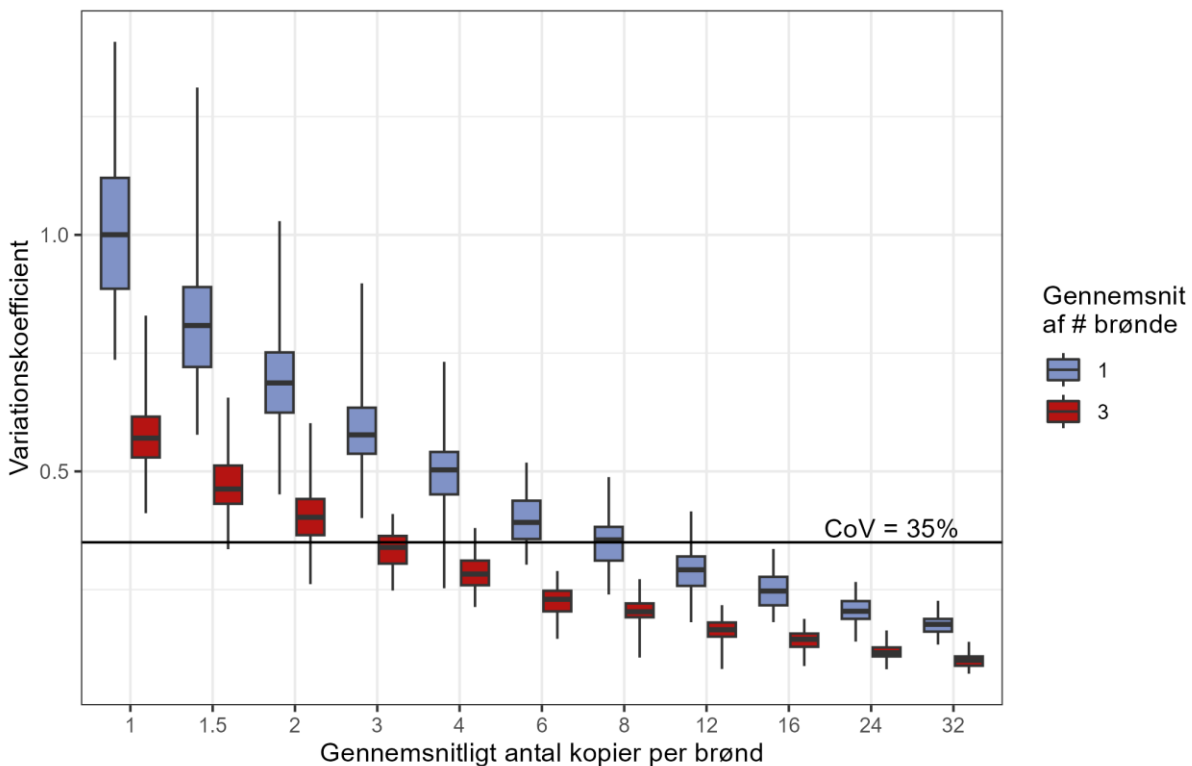
#### 6.2. Kvantifikationsgrænse

Kvantifikationsgrænsen er, som beskrevet ovenfor, valgt til at variationskoefficienten (CoV) skal være under 35% - igen er årsagen Poisson-variation. Ved at benytte gennemsnittet af de tre triplikater



reduceres denne variation. Figur 1 viser resultatet af et simulationsforsøg, som er lavet for at undersøge dette. For en række koncentrationer, udtrykt som forventet antal kopier pr brønd, er der lavet 100 gentagelser af beregning af CoV ved benyttelse af henholdsvis enkeltmålinger og triplikater. CoV er bestemt som standardafvigelsen divideret med gennemsnittet af 30 bestemmelser.

Figur 1 viser boxplot for de 100 gentagelser for hver koncentration og antal gentagelser. De blå bokse svarer til ovenstående forsøg. I forsøget med enkeltstående brønde er CoV bestemt til 8 eller 16 for de to gener. Der er ikke lavet forsøg med mellemliggende koncentrationer. På figur 1 ses det, at medianen ved 8 kopier pr brønd er tæt på kriteriet med  $CoV < 35\%$ . Hvis man gentager forsøget vil man altså i halvdelen af tilfældene bestemme CoV til 8 og ellers til 16, da der ikke undersøgt mellemliggende koncentrationer. Forsøget er altså i fuld overensstemmelse med de teoretiske forventninger. Hvis beregningerne af CoV i stedet baseres på gennemsnittet af triplikater (Rød) bliver kvantifikationsgrænsen 3, da medianen her ligger under 35%.



Figur 1: Simulerede variationskoefficienter (CoV) for forskellige koncentrationer og for enkeltbrønde og gennemsnit af tre tekniske triplikater.

Baseret på ovenstående er det valgt at acceptere kvantificeringer, hvor gennemsnittet af triplikaterne er over 3. I praksis kan der være flere årsager til at der ikke kommer detektion i en brønd. Derfor benyttes gennemsnittet ikke, hvis der kun er detektion i én af triplikaterne og heller ikke, hvis gennemsnittet er over 6, hvor sandsynligheden for at observere nul kopier i en brønd er meget lille. I disse tilfælde udelades observationen indtil der har været en dialog med laboratoriet om hvad der er bedst at gøre.