

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

УДК 616.98: 578.834.1: 614.4777: 614.2

### ЗНАЧИМОСТЬ МОНИТОРИНГА РНК - ВИРУСОВ В СТОЧНЫХ ВОДАХ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

Мусабаев Э.И., Тошбаева Н.С., Исмаилова З.М.

Научно-исследовательский институт вирусологии Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, г. Ташкент

#### XULOSA

*Oqova suvlar orqali virus monitoringi shuni ko'rsatdiki, aholi zich joylashgan hududlarda oqova suvlarni tahlil qilish epidemiyalarni aniqlashga yordam beradi. Bu ifloslangan oqova suvlar odamlar tomonidan chiqariladigan patogen viruslarning, jumladan, najas, siydik va so'lak bilan bog'liq muhim rezervuarini tashkil etadi. Ushbu viruslarning mavjudligi epidemiologik xavfdan tashqari, populyatsiyada virus aylanishining ishonchli ko'rsatkichi bo'lib xizmat qiladi. Oqova suvlarni tahlil qilish epidemiologik vaziyatni kompleks baholashning kuchli vositasidir. U an'anaviy yondashuvlarning kamchiliklarini bartaraf etib, individual testlarga arzon, kengaytiriladigan va kamroq invaziv muqobillikni taklif qilishi mumkin. Biroq uni keng miqyosda joriy etish uchun ham uslubiy, ham institutsional to'siqlarni yengib o'tish zarur. Umumjahon standartlarini ishlab chiqish va mavjud sog'liqni saqlash tizimlari bilan integratsiya qilish keyingi ilmiy va amaliy tadqiqotlarda ustuvor vazifa bo'lishi lozim.*

**Xulosalar.** Oqava suvlarni tahlil qilish birinchi klinik holatlar qayd etilishidan bir necha kun yoki hafta oldin viruslarning aylanishini aniqlaydi, bu esa uni erta epidemiologik ogohlantirishning istiqbolli vositasiga aylantiradi; oqava suvlarni monitoring qilish tizimlarini joriy etish sanitariya-epidemiologik nazorat samaradorligini sezilarli darajada oshirishi mumkin, ayniqsa yuqori xavfli hududlarda – kasalxonalar; internatlar; aholi zich joylashgan joylarda; infeksiyaning yashirin tarqalishini baholashga imkon beradi; namuna olish va tahlil qilish usullarini standartlashtirishni talab qiladi.

**Kalit so'zlar:** RNK-viruslar; oqova suvlar; epidemiologiya, pandemiya, ekologik monitoring.

Мониторинг РНК вирусом в сточных водах является важным эпидемиологическим инструментом, который позволяет отслеживать интенсивность циркуляции вирусов среди людей. Это помогает в раннем выявлении вспышек заболеваний, картировании

#### SUMMARY

*Viral monitoring through wastewater has shown that in regions with high population density, wastewater analysis can help identify epidemics. These polluted wastewater represent an important reservoir of pathogenic viruses released by humans, including feces, urine, and saliva. The presence of these viruses, in addition to the epidemiological risk, serves as a reliable indicator of viral circulation in the population. Wastewater analysis is a powerful tool for a comprehensive assessment of the epidemiological situation. It is able to make up for the shortcomings of traditional approaches by offering an inexpensive, scalable and less invasive alternative to individual testing. However, for its large-scale implementation, it is necessary to overcome both methodological and institutional barriers. The development of universal standards and integration with existing healthcare systems should be a priority in further scientific and applied research.*

**Conclusions.** Wastewater analysis detects the circulation of viruses several days or weeks before the registration of the first clinical cases, which makes it a promising tool for early epidemiological warning; the introduction of wastewater monitoring systems can significantly improve the effectiveness of sanitary and epidemiological control, especially in high-risk areas – hospitals, boarding schools, densely populated areas; allows you to assess the latent spread of infection; requires standardization of sampling and analysis methods.

**Keywords:** RNA viruses, wastewater, epidemiology, pandemic, environmental monitoring.

территорий с вирусами и оценке эпидемической ситуации. Методы мониторинга, такие как ПЦР, позволяют детально изучать структуру возбудителей и их распространение, что может быть особенно полезно в условиях пандемии COVID-19.

Сточные воды, включающие в себя бытовые, промышленные и городские источники, являются важным источником загрязнения патогенами, в том числе вирусами. Многочисленные исследования изучали устойчивость энтерических вирусов человека, таких как норовирусы, энтеровирусы, аденовирусы, ротавирусы и вирусы гепатита А/Е, которые передаются фекально-оральным путём, в сточных водах [1,2,3].

Эпидемиология, основанная на анализе сточных вод, начинает рассматриваться как перспективный инструмент для оценки степени распространения вирусных инфекций среди населения, в том числе SARS-CoV-2 [2]. Такой подход предлагает структурированную методологию, включающую ключевые этапы (рис. 1). Из-за высокой заразности и быстрой передачи SARS-CoV-2 индивидуальное тестирование в клинических условиях оказалось затруднительным [7]. Случаи с лёгкими или отсутствующими симптомами часто остаются незамеченными, что приво-

дит к неточностям в эпидемиологических моделях и оценке распространенности болезни. Учитывая эти ограничения, крайне важно углубить понимание механизмов распространения вирусных заболеваний на уровне сообществ для обеспечения оперативного и эффективного реагирования на вспышки [6].

Мониторинг РНК – вирусов с помощью анализа сточных вод стал в этом контексте мощным и ценным инструментом. Этот метод предоставляет косвенную, но исчерпывающую оценку уровня инфицирования в популяции, охватывая как симптоматических, так и бессимптомных носителей. Эти данные объединяются с информацией о случаях из системы здравоохранения для проведения эпидемиологического моделирования и построения прогнозов на уровне сообщества. Также крайне важно учитывать этические аспекты, чтобы избежать стигматизации и неправильной интерпретации результатов анализа сточных вод.



Рис. 1. Структурированный подход к эпидемиологии на основе анализа сточных вод для мониторинга вирусов. Источник: Polo D. et al., Water Research, 2020.

В связи вышесказанным, была поставлена цель провести обзор методов вирусного мониторинга в сточных водах и выявить их применение в практике общественного здравоохранения. С этой целью, был представлен аналитический обзор современной научной литературы, посвящённой вирусному мониторингу в сточных водах. В качестве источников использовались рецензируемые статьи, отчёты международных исследовательских групп, а также данные, опубликованные в специализированных базах научных публикаций, включая *PubMed*, *Scopus*, *ScienceDirect* и *Web of Science*. Отдельное внимание уделено описанию молекулярных методов диагностики, таких как обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (RT-PCR) и количественная ПЦР в реальном времени (RT-

qPCR), применяемых для обнаружения генетического материала РНК – вирусов. При отборе материалов учитывались как лабораторные протоколы, так и практические аспекты внедрения указанных методов в системах санитарного надзора разных стран.

Вирусный мониторинг через сточные воды показал, что в регионах с высокой плотностью населения анализ сточных вод может способствовать выявлению эпидемий. Эти загрязнённые сточные воды представляют собой важный резервуар патогенных вирусов, выделяемых людьми – в том числе с фекалиями, мочой и слюной. Присутствие этих вирусов, помимо эпидемиологического риска, служит достоверным индикатором вирусной циркуляции в популяции [4].

Одним из первых известных примеров использования анализа сточных вод стало выявление вируса полиомиелита. В начале XXI века учёные начали применять этот метод для более широкого спектра вирусов как показатель состояния общественного здравоохранения – таких как вирус гепатита, ротавирус, аденовирус и другие возбудители заболеваний дыхательной и желудочно-кишечной систем. Такого рода исследования приобретают особую значимость во время вспышек РНК-вирусов, которые могут быть совершенно в разных регионах земного шара, начиная от Африки до США, при этом в 2020 году La Rosa et al. впервые сообщили об обнаружении SARS-CoV-2 в сточных водах Италии, подтвердив возможность использования данного метода как эпидемиологического индикатора на ранних этапах пандемии [8].

Концентрация вируса в сточных водах зависит от множества факторов, таких как географическое положение, климат, уровень развития, состояние здоровья населения и системы управления водными ресурсами. Мониторинг сточных вод включает отбор проб на разных стадиях очистки – на жилых, промышленных и коммерческих объектах, с последующим анализом на станциях очистки. Системы мониторинга проектируются с учётом различий между городскими и сельскими регионами: в то время как городские сети позволяют получить обобщённую картину общественного здоровья, в сельской местности, часто не имеющей централизованных систем, требуется применение таких методов, как моделирование водосборных бассейнов. Адаптация подходов к местным особенностям имеет решающее значение для оперативного выявления эпидемий [4,5].

РНК-вирусы с липидной оболочкой более чувствительны к разрушению в окружающей среде, чем вирусы без оболочки. Тем не менее, он может сохраняться в сточных водах или других водных средах в течение нескольких дней в зависимости от условий. Polo et al. показали, что вирус способен сохраняться в сточных водах на протяжении нескольких дней при комнатной температуре. Его стабильность зависит от факторов, таких как pH, температура и наличие органических веществ. Например, при температуре 20 °C РНК-вирусы могут оставаться жизнеспособными в неочищенных сточных водах примерно 3 дня, тогда как в питьевой воде или на открытом воздухе период их выживания значительно уменьшается [7].

Для мониторинга вирусов в сточных водах, включая РНК вирусы, применяются пробы различных типов: от необработанных до частично или полностью очищенных сточных вод. Однако предпочтение, как правило, отдаётся необработанным пробам, поскольку они содержат более высокую вирусную нагрузку, что повышает вероятность обнаружения вирусного РНК.

Medema et al. (2020) рекомендуют использовать 24-часовые композитные пробы, так как они сглажи-

вают суточные колебания состава сточных вод и позволяют получить более репрезентативные данные. В целом, при сборе проб для вирусного мониторинга используются два основных подхода, выбор между которыми зависит от целей исследования, технических возможностей и доступных ресурсов:

- Единичный отбор пробы (Grab Sampling) – забор пробы в конкретный момент времени. Этот метод прост в реализации и требует минимального оборудования. Однако он чувствителен к кратковременным флуктуациям вирусной концентрации, что снижает его точность при оценке средних значений. Так, Ahmed et al. (2020) показали, что единичные пробы могут давать искажённое представление о вирусной нагрузке, особенно при наличии значительных суточных вариаций.

- Композитный отбор пробы (Composite Sampling) – объединение нескольких проб, собранных в течение определённого периода (обычно 24 часа). Такой подход позволяет получить усреднённую концентрацию вируса за сутки, что делает данные более стабильными и надёжными. Medema et al. (2020) подчёркивают, что именно этот метод является наиболее предпочтительным для целей эпидемиологического мониторинга, поскольку он уменьшает вариабельность результатов.

В исследовании Medema et al. рассматривалась система мониторинга РНК-вирусов в сточных водах Нидерландов. С февраля по март 2020 года пробы отбирались на станциях очистки, обслуживающих крупные и средние города, а также главный международный аэропорт. Использовались 24-часовые композитные пробы объёмом 250 мл, которые хранились при температуре 4 °C до проведения анализа. Это позволило исследователям выявить циркуляцию вируса уже на ранних этапах эпидемии. В последующем отбор проб проводился на 1-й, 2,5-й и 4-й неделе после начала эпидемии. По мере ухудшения эпидемиологической ситуации в программу были включены дополнительные станции, в том числе в наиболее пострадавших регионах, таких как Тилбург [2,7].

*Концентрирование проб и извлечение вирусной РНК.* Для чувствительного и надёжного обнаружения вирусов в сточных водах необходимо предварительное концентрирование проб, что позволяет увеличить содержание вирусных частиц и повысить эффективность их дальнейшего выделения. Наиболее широко используемым методом в этом процессе является ультрафильтрация, обеспечивающая высокую степень концентрации и совместимость с последующими этапами анализа.

Ключевым этапом анализа является извлечение РНК-вируса, от эффективности которого зависит достоверность результатов на всех стадиях – от концентрирования до амплификации методом ПЦР. Для контроля этого процесса нередко применяются контрольные фаги, такие как F-специфические, которые позволяют оценить эффективность извлечения.

Однако важно учитывать, что такие фаги могут завышать оценку эффективности в случае оболочечных вирусов, из-за различий в структуре и устойчивости к внешним условиям. Это указывает на необходимость разработки более специфичных и надёжных контрольных систем, адаптированных именно к особенностям оболочечных вирусов [2,6].

Методы фильтрации также играют значимую роль, однако большинство традиционных подходов демонстрируют низкую эффективность в отношении вирусов с липидной оболочкой. Это объясняется их повышенной чувствительностью к изменениям температуры, pH среды и воздействию органических растворителей, таких как хлороформ или хлорид цезия. Фильтры, применяемые для концентрирования, подразделяются на электроотрицательные и электроположительные. Последние, как правило, более эффективны при работе с неокружёнными вирусами, такими как энтеровирусы, обеспечивая высокий уровень восстановления вирусной РНК. Тем не менее, согласно данным Wang et al. (2005), электроположительные фильтры могут быть успешно использованы и для оболочечных вирусов, включая представителей рода SARS-CoV, что расширяет потенциал их применения в системах вирусного мониторинга.

*Количественный анализ вирусов в сточных водах*

Для РНК-содержащих вирусов основными методами обнаружения являются RT-PCR (обратная транскрипция с последующей ПЦР) – для качественного анализа, и RT-qPCR (обратная транскрипция с количественной ПЦР в реальном времени) – для количественного определения вирусной РНК.

В исследовании Medema et al. использовались четыре набора праймеров и зондов: три (N1, N2 и N3), нацеленных на разные участки гена нуклеокапсида (N), и один – от Corman et al., направленный на ген оболочечного белка (E). Он позволяет фиксировать пики концентрации вирусов, которые могут предшествовать вспышкам заболевания. Такой подход даёт возможность заблаговременно реагировать на угрозы. [6,7].

Важно, что вирусная РНК была обнаружена ещё до официального подтверждения первых случаев COVID-19 в Нидерландах: образцы от 6 февраля 2020 года были отрицательными, а уже 4–5 марта в Утрехте зафиксированы положительные сигналы (14–30 копий/мл) [1,5]. Например, с 15 марта 2020 года вирусная РНК определялась уже на всех очистных станциях (кроме одного исключения для праймера N1 в Апелдорне) в концентрациях от 8 до 2200 копий/мл. Эти данные подтверждены высокоразрешающей электрофорезной техникой. Праймеры N1–N3 продемонстрировали схожие количественные результаты, с наименьшей чувствительностью у N2. Таким образом, мониторинг сточных вод предоставляет возможность: выявлять вирус ещё до регистрации клинических случаев; отслеживать динамику инфекции в режиме реального времени; использовать данные

для раннего предупреждения и принятия мер.

В дополнение к RT-qPCR активно развиваются и другие технологии: Мультиплексная ПЦР и секвенирование нового поколения (NGS) позволяют одновременно обнаруживать несколько вирусов, что повышает эффективность мониторинга. Например, Hamza et al. (2014) и Di Bonito et al. (2017) успешно применяли мультиплексную ПЦР для одновременно выявления энтерических вирусов в сточных водах.

Биосенсоры на основе микрофлюидных бумажных устройств ( $\mu$ PAD) предоставляют экспресс-методы обнаружения вирусов в полевых условиях без сложной пробоподготовки. [1,2]. Согласно ряду исследований, состав и концентрация вирусов в сточных водах значительно варьируются в зависимости от географического региона и времени года. Так, уровень обнаружения аденовирусов (HAdV) колеблется от 27,3% на Тайване до более 90% в Польше и Норвегии. Ротавирусы выявляются в 10% проб в Уругвае и до 90% – в Испании. Норовирусы встречаются в 82% образцов, при этом наибольшая вирусная нагрузка фиксируется весной и зимой, что указывает на ярко выраженную сезонность их распространения.

Интересно, что в исследовании Choi et al. было также обнаружено присутствие вирусных частиц, не характерных для водного пути передачи [1,3,9]. Среди них – вирусы денге, жёлтой лихорадки и Нипах. Это говорит о потенциально более широком спектре циркулирующих патогенов в окружающей среде, чем ранее предполагалось.

Полученные данные подтверждают, что концентрации РНК – вирусов в сточных водах чётко коррелируют с уровнем заболеваемости, выявленным в традиционных системах здравоохранения. Следовательно, сточные воды становятся своеобразным «зеркалом» вирусной активности в сообществах. Тем не менее, интерпретация результатов анализа сточных вод требует учёта ряда факторов. Например, погодные условия, тип канализационной системы, плотность населения, привычки по водопользованию и методы очистки сточных вод могут существенно влиять на уровень вирусной РНК, обнаруживаемой в пробах. Также следует учитывать нестабильность вирусов с липидной оболочкой, таких как SARS-CoV-2, при контакте с агрессивными физико-химическими условиями окружающей среды.

Не менее важным аспектом является необходимость унификации методов отбора и анализа проб. На сегодняшний день отсутствуют глобально принятые протоколы, что затрудняет сравнение результатов между различными регионами и странами. Особую роль здесь играют контрольные системы и стандарты качества, особенно в части концентрирования вирусов и извлечения РНК. Подходы, применимые к неокружённым вирусам, часто неэффективны при работе с вирусами, чувствительными к условиям внешней среды. Кроме того, социальные и этические последствия внедрения подобных мониторинговых

систем также требуют тщательной проработки. Хотя сточные воды являются анонимным источником информации, возможна стигматизация отдельных районов или учреждений при неверной трактовке данных. Поэтому наряду с техническим развитием необходимы механизмы правовой и этической регламентации использования полученной информации.

Таким образом, анализ сточных вод представляет собой мощный инструмент комплексной оценки эпидемиологической обстановки. Он способен восполнить недостатки традиционных подходов, предложив недорогую, масштабируемую и менее инвазивную альтернативу индивидуальному тестированию. Однако для его широкомасштабного внедрения необходимо преодоление как методологических, так и институциональных барьеров. Разработка универсальных стандартов и интеграция с существующими системами здравоохранения должны стать приоритетом в дальнейших научных и прикладных исследованиях.

#### ВЫВОДЫ

Анализ сточных вод выявляет циркуляцию вирусов за несколько дней или недель до регистрации первых клинических случаев, что делает его перспективным инструментом раннего эпидемиологического предупреждения; внедрение систем мониторинга сточных вод может существенно повысить эффективность санитарно-эпидемиологического контроля, особенно в зонах высокого риска – больницах, интернатах, густонаселённых районах; позволяет оценить

скрытое распространение инфекции; требует стандартизации методов пробоотбора и анализа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bleotu C., et al. Viruses in Wastewater—A Concern for Public Health and the Environment. *Microorganisms*, 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12071430
2. Choi P. M., et al. Wastewater-based epidemiology biomarkers and viral detection. *Water Res.*, vol. 174, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115555
3. Corpuz M. V. A., et al. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci. Total Environ.*, vol. 745, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140910
4. Di Bonito P., et al. Surveillance of enteric viruses in sewage and shellfish. *Food Environ Virol.*, 2017. DOI: 10.1007/s12560-016-9263-6
5. Hamza I. A., et al. Detection of human viruses in rivers in Germany. *J. Virol. Methods*, 2014. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.07.032
6. Medema G., et al. Presence of SARS-CoV-2 RNA in Sewage and Correlation with Prevalence. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2020. DOI: 10.1021/acs.estlett.0c00357
7. O'Brien E., Xagorarakis I. A water-focused one-health approach for early detection of viral outbreaks. *One Health*, 2019. DOI: 10.1016/j.onehlt.2019.100094
8. Polo D., et al. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19. *Water Res.*, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116404