

## МОНИТОРИНГ SARS-COV-2 В СТОЧНЫХ ВОДАХ КАК ИНСТРУМЕНТ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

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

*Tahlil natijalari oqova suvlarni o'rganishga asoslangan epidemiologik monitoring usulining aholi orasida SARS-CoV-2 aylanishini kuzatish kontekstida yuqori ma'lumotga ega ekanligini ko'rsatmoqda. Biroq, odatda, ishlov berilmagan namunalarga ustunlik beriladi, chunki ularda virus yuklamasi yuqori bo'lib, bu virus RNKsini aniqlash ehtimolini oshiradi. Tahlilning asosiy bosqichi virus RNKsini ajratib olish bo'lib, uning samaradorligi barcha bosqichlarda – konsentratsiyadan tortib PCR usuli bilan kuchaytirishgacha bo'lgan natijalarning ishonchliligiga ta'sir qiladi. Tahlil natijalari oqova suvlarni o'rganishga asoslangan epidemiologik monitoring usulining aholi orasida SARS-CoV-2 aylanishini kuzatish kontekstida yuqori ma'lumotga ega ekanligini ko'rsatmoqda. RT-qPCR usulidan namunalarni tanlash va konsentratsiyalashga to'g'ri yondashuv bilan birgalikda foydalanish nafaqat virus RNK mavjudligini qayd etish, balki kasallik holatlari klinik tasdiqlanishidan ancha oldin epidemik vaziyat dinamikasini baholash imkonini beradi. Olingan ma'lumotlar oqova suvlardagi virus konsentratsiyasi an'anaviy sog'liqni saqlash tizimlarida aniqlangan kasallanish darajasi bilan aniq bog'liqligini tasdiqlaydi. Binobarin, oqova suvlar jamiyatlardagi virus faolligining o'ziga xos «ko'zgusi»ga aylanib bormoqda. Ayniqsa, SARS-CoV-2 genetik materialini rasmiy holatlar qayd etilishidan oldin aniqlash mumkinligi juda muhim, bu esa erta ogohlantirish tizimlarini yaratish imkonini beradi.*

**Xulosalar.** RT-qPCR usulidan foydalanish oqova suvlardagi virus RNKsini samarali aniqlash va miqdoriy baholash imkonini beradi, bu Niderlandiyadagi tozalash stansiyalari misolida SARS-CoV-2 uchun tasdiqlangan.

**Kalit so'zlar:** viruslar, SARS-CoV-2, oqova suvlar, epidemiologiya, pandemiya, ekologik monitoring.

Пандемия COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, продемонстрировала ограниченность традиционных систем эпидемиологического надзора, основанных преимущественно на клинической диагностике [1,4]. Значительная доля бессимптомных и малосимптомных случаев, а также задержки тестирования приводят к недооценке реального уровня циркуляции инфекции в популяции [2,3].

В этих условиях особую значимость приобретает мониторинг сточных вод (wastewater-based

### SUMMARY

*Viruses pose a serious threat to public health, causing both local outbreaks and global pandemics. To monitor viruses in wastewater, including SARS-CoV-2, samples of various types are used: from untreated to partially or completely treated wastewater. However, preference is usually given to untreated samples, as they contain a higher viral load, which increases the likelihood of viral RNA detection. The key stage of the analysis is the extraction of viral RNA, the effectiveness of which determines the reliability of the results at all stages – from concentration to PCR amplification. The results of the analysis indicate that the method of epidemiological monitoring based on wastewater research is highly informative in the context of tracking the circulation of SARS-CoV-2 in the population. The use of RT-qPCR in combination with a competent approach to sampling and concentration of samples allows not only to detect the presence of viral RNA, but also to assess the dynamics of the epidemic situation long before clinical confirmation of cases of the disease. The data obtained confirm that the concentrations of the virus in wastewater clearly correlate with the incidence rate found in traditional healthcare systems. Consequently, wastewater becomes a kind of «mirror» of viral activity in communities. It is especially valuable that the detection of SARS-CoV-2 genetic material is possible even before official cases are registered, which opens up prospects for the creation of early warning systems.*

**Conclusions.** The RT-qPCR method makes it possible to effectively detect and quantify viral RNA in wastewater, which has been confirmed for SARS-CoV-2 using the example of wastewater treatment plants in the Netherlands.

**Keywords:** viruses, SARS-CoV-2, wastewater, epidemiology, pandemic, environmental monitoring.

epidemiology, WBE) как инновационный и высокочувствительный инструмент популяционного надзора. Известно, что вирус SARS-CoV-2 выделяется с фекалиями инфицированных лиц, включая бессимптомных носителей, что позволяет выявлять циркуляцию патогена в сообществе независимо от обращаемости за медицинской помощью.

Актуальность данной темы обусловлена следующими факторами, такими как ранняя диагностика вспышек, мониторинг сточных вод позволяет вы-

являть рост вирусной нагрузки за 5-14 дней до увеличения клинически подтвержденных случаев, обеспечивая раннее предупреждение эпидемических подъёмов, охват всей популяции. В отличие от индивидуального тестирования, WBE отражает состояние здоровья всего населения, подключённого к системе канализации, включая: бессимптомных носителей; недообследованных пациентов; социально уязвимые группы и экономическая эффективность [5,7]. Метод требует значительно меньших ресурсов по сравнению с массовым тестированием, что особенно актуально для стран с ограниченными возможностями системы здравоохранения.

Анализ сточных вод также позволяет выявлять циркуляцию различных штаммов SARS-CoV-2 и отслеживать их распространение на ранних этапах для поддержки управленческих решений. Полученные данные могут использоваться для прогнозирования эпидемиологической ситуации, оптимизации карантинных мер, распределения медицинских ресурсов и для универсальности подхода [6].

Метод применим не только к SARS-CoV-2, но и к другим патогенам (энтеровирусы, норовирусы, вирусы гепатита), что делает его перспективным инструментом долгосрочного эпидемиологического надзора. Следовательно, актуальность исследования обусловлена необходимостью совершенствования методов эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями в условиях высокой доли бессимптомных форм и ограниченной эффективности традиционных диагностических подходов. Мониторинг SARS-CoV-2 в сточных водах представляет собой инновационный, чувствительный и экономически эффективный инструмент раннего выявления циркуляции вируса в популяции, что имеет важное значение для своевременного принятия управленческих решений в системе общественного здравоохранения [3].

В связи с этим целью исследования является проведение мониторинга SARS-CoV-2 в сточных водах как инструмент эпидемиологического надзора. С этой целью был проведен обзор современной научной литературы, посвящённой вирусному мониторингу в сточных водах, в частности SARS-CoV-2. Для этого были использованы 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 вирусов, включая SARS-CoV-2. При отборе материалов учитывались как лабораторные протоколы, так и практические аспекты внедрения указанных методов в системах санитарного надзора разных стран [5].

Результаты аналитического обзора показали, что подобные исследования приобрели особую актуальность во время пандемии COVID-19. 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].

Методы мониторинга SARS-CoV-2 в сточных водах позволили выявить, что 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 [6].

SARS-CoV-2 как вирус с липидной оболочкой более чувствителен 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 SARS-CoV-2 может оставаться жизнеспособным примерно 3 дня в неочищенных сточных водах, тогда как срок его выживания сокращается в питьевой воде или на открытом воздухе [8].

Для мониторинга вирусов в сточных водах, включая SARS-CoV-2, применяются пробы различных типов: от необработанных до частично или полностью очищенных сточных вод. Однако предпочтение, как правило, отдается необработанным пробам, поскольку они содержат более высокую вирусную нагрузку, что повышает вероятность обнаружения вирусного РНК.

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

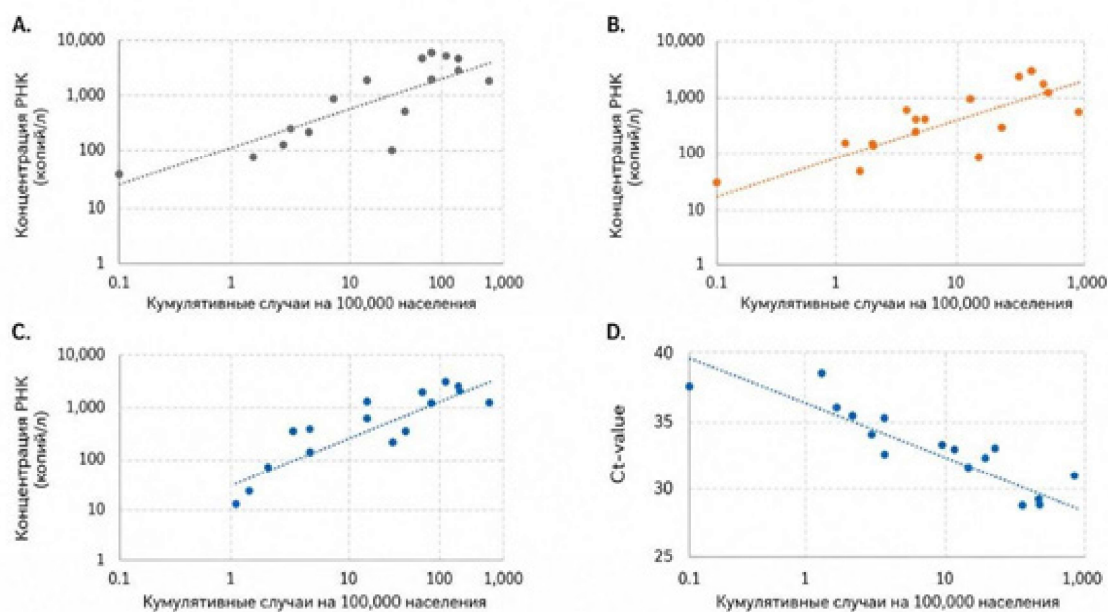
вирусов (например, SARS-CoV-2), из-за различий в структуре и устойчивости к внешним условиям. Это указывает на необходимость разработки более специфичных и надёжных контрольных систем, адаптированных именно к особенностям оболочечных вирусов [6].

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.

В исследовании Medema et al. рассматривалась система мониторинга SARS-CoV-2 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. Примечательно, что первые пробы были собраны за три недели до официальной регистрации первого случая COVID-19 в стране. 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 [6,7].



Корреляция между концентрацией РНК SARS-CoV-2 в сточных водах (по тестам на гены N1, N2, N3 и E) и числом зарегистрированных случаев COVID-19 (на 100 000 населения) по данным Medema et al. (2020).

Каждая точка соответствует среднему значению по очистной станции. А-С – результаты тестов на гены N1, N2, N3; D – результаты по гену E (в формате Ct). На рисунке представлены результаты анализа концентрации вирусной РНК SARS-CoV-2 в сточных водах, измеренной по четырём генетическим мишеням: N1, N2, N3 и E. Данные представлены в виде графиков зависимости между количеством вируса в сточных пробах и накопленным числом случаев COVID-19 (в расчёте на 100 000 человек) в зонах, обслуживаемых соответствующими очистными станциями. Видно, что по маркерам N1, N2 и N3

(графики А, В, С) наблюдается положительная корреляция между вирусной нагрузкой в сточных водах и распространённостью инфекции. По гену E (график D) также фиксируется связь, но с меньшей выраженностью, при этом ось Y отражает значение Ct – порог цикла, обратный концентрации. Это подтверждает возможность использования сточных вод в качестве индикатора эпидемиологической ситуации. 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 зафик-

сированы положительные сигналы (14-30 копий/мл) [1].

Следовательно, с 15 марта 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 [5,7].

Результаты анализа свидетельствуют о высокой информативности метода эпидемиологического мониторинга, основанного на исследовании сточных вод, в контексте отслеживания циркуляции SARS-CoV-2 в популяции. Использование RT-qPCR в совокупности с грамотным подходом к отбору и концентрированию проб позволяет не только фиксировать наличие вирусной РНК, но и оценивать динамику эпидемической ситуации задолго до клинического подтверждения случаев заболевания. Это особенно важно в условиях ограниченной доступности лабораторной диагностики или при высоком уровне бессимптомного носительства.

Полученные данные подтверждают, что концентрации вируса в сточных водах чётко коррелируют с уровнем заболеваемости, выявленным в традиционных системах здравоохранения. Следовательно, сточные воды становятся своеобразным «зеркалом» вирусной активности в сообществах. Особенно ценно то, что обнаружение генетического материала SARS-CoV-2 возможно ещё до регистрации официальных случаев, что открывает перспективы для создания систем раннего предупреждения.

## ВЫВОДЫ

Применение метода RT-qPCR позволяет эффективно обнаруживать и количественно оценивать вирусную РНК в сточных водах, что подтверждено для SARS-CoV-2 на примере очистных станций в Нидерландах.

## 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.