



(51) МПК
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
G01N 33/18 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/70 (2021.02); *C12Q 1/6806* (2021.02); *G01N 33/18* (2021.02); *G01N 33/569* (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2020140957, 11.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 11.12.2020

Дата регистрации:
 24.02.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2020

(45) Опубликовано: 24.02.2021 Бюл. № 6

Адрес для переписки:

420008, рес. Татарстан, г. Казань, ул.
 Кремлевская, 18, стр. патентно-лицензионный
 отдел, Назмиеву Ильдару Анасовичу

(72) Автор(ы):

Галицкая Полина Юрьевна (RU),
 Селивановская Светлана Юрьевна (RU),
 Рудакова Майя Анатольевна (RU),
 Карамова Камала Октай кызы (RU),
 Курынцева Полина Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Казанский (Приволжский)
 федеральный университет" (ФГАОУ ВО
 КФУ) (RU),
 Галицкая Полина Юрьевна (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: GONZALEZ R. et al, COVID-19
 surveillance in Southeastern Virginia using
 wastewater-based epidemiology // Water
 Research, 13.08.2020, 186, p. 1 - 9. BAZ-LOMBA
 J.A. et al. Comparison of pharmaceutical, illicit
 drug, alcohol, nicotine and caffeine levels in
 wastewater with sale, seizure and consumption
 data for 8 European cities // BMC Public (см.
 прод.)

(54) Способ мониторинга заболеваемости COVID-19 с использованием анализа сточных вод

(57) Реферат:

Изобретение относится к области вирусологии. Предложен способ мониторинга заболеваемости COVID-19. Способ включает определение представляющего нижний предел определения уровня заболеваемости поправочного коэффициента (m) и мониторинг заболеваемости COVID-19. Для определения m берут аликвоты образцов экскрементов пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 и разбавляют модельной сточной водой для получения образцов № 1...№ p, проводят серийные разведения образцов № 1...№ p до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ, усредняют и рассчитывают

среднеарифметическое значение максимальных степеней разведения, определяют m как отношение 100 к среднеарифметическому значению. Для мониторинга выделяют РНК из образцов сточных вод, анализируют пробы на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2, где при отрицательном результате уровень заболеваемости равен 0%, а при положительном результате готовят серийные разведения образцов сточных вод до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ, определяют максимальную степень разбавления сточных вод (k), рассчитывают значения уровня заболеваемости COVID-19 (N, %) по формуле N

= к * м. Изобретение обеспечивает повышение анализа проб. 2 пр., 5 ил.
точности результатов и снижение длительности

(56) (продолжение):

Health, 2016, 16, p. 1 - 11. AHMED W. et al. 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, 18.04.2020, 728, p. 1- 8. WO 2011/049886 A1, 28.04.2011. RU 2572227 C2, 27.12.2015.

R U 2 7 4 3 6 8 7 C 1

R U 2 7 4 3 6 8 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
G01N 33/18 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/70 (2021.02); C12Q 1/6806 (2021.02); G01N 33/18 (2021.02); G01N 33/569 (2021.02)(21)(22) Application: **2020140957, 11.12.2020**(24) Effective date for property rights:
11.12.2020Registration date:
24.02.2021

Priority:

(22) Date of filing: **11.12.2020**(45) Date of publication: **24.02.2021** Bull. № 6

Mail address:

**420008, res. Tatarstan, g. Kazan, ul. Kremlevskaya,
18, str. patentno-litsenzionnyj otdel, Nazmievu
Ildaru Anasovichu**

(72) Inventor(s):

**Galitskaya Polina Yurevna (RU),
Selivanovskaya Svetlana Yurevna (RU),
Rudakova Majya Anatolevna (RU),
Karamova Kamalya Oktaj kyzy (RU),
Kuryntseva Polina Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Kazanskij (Privolzhsnij)
federalnyj universitet" (FGAOU VO KFU) (RU),
Galitskaya Polina Yurevna (RU)**(54) **METHOD OF MONITORING COVID-19 MORBIDITY WITH THE USE OF WASTEWATER ANALYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: virology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of virology. Disclosed is a method for monitoring COVID-19 morbidity. According to the method, it's necessary to determine a correction factor (m) representing a lower limit for determining the morbidity rate and monitoring COVID-19 morbidity. To determine m, aliquots of fecal samples of patients with a confirmed diagnosis of COVID-19 are taken and diluted with model wastewater to obtain samples № 1 ... No p. Samples № 1 ... No p undergo a serial dilution until the lower limit of determination of the real-time RT-PCR method is reached. After that the arithmetic mean value of the maximum degrees of dilution is averaged and calculated. The correction factor m is defined as the

ratio of 100 to the arithmetic mean. RNA is isolated from wastewater samples with the purpose of monitoring. The samples are analyzed for the presence of SARS-CoV-2 viral particles. If the result is negative, the morbidity rate is 0%. If the result is positive, serial dilutions of wastewater samples are prepared until the lower limit of determination of the real-time RT-PCR method is reached. After that the maximum degree of dilution of wastewater (k) is determined. The value of the morbidity rate of COVID-19 (N,%) is calculated in accordance with the formula $N = k * m$.

EFFECT: improved accuracy of results and reduced duration of sample analysis.

1 cl, 2 ex, 5 dwg

Заявленное изобретение относится к вирусологии, а также к способам измерения или испытания, использующим ферменты или микроорганизмы для мониторинга заболеваемости COVID-19 с использованием анализа сточных вод.

На дату подачи настоящей заявки количество зарегистрированных случаев COVID-19 в мире растет, а некоторые страны сообщают о второй волне пандемии. Поэтому для принятия управленческих решений в затронутых пандемией странах, регионах и муниципалитетах необходима точная и актуальная информация об эпидемиологической ситуации. Для тестирования наличия заболевания вирусом COVID-19 на данный момент применяется целый комплекс методов, основанных на определении вирусных частиц в биологических жидкостях и тканях организма, например в слюне, мазке из носа, носоглотки и / или ротоглотки, в воде бронхиального лаважа, полученной с помощью фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж), носоглоточного аспирата, мокроты, биопсии или аутопсии легких, цельной крови, сыворотки или антител в крови не может дать релевантную информацию о количестве заболевших COVID-19 в сообществе, поскольку одновременное тестирование всего сообщества технически невозможно, информация, полученная при тестировании определенных групп, не является оперативной, к тому же массовое тестирование предполагает существенные материальные затраты, трудности при отборе, доставке и хранении образцов.

Далее в тексте заявителем приведены термины, которые необходимы для облегчения однозначного понимания сущности заявленных материалов и исключения противоречий и/или спорных трактовок при выполнении экспертизы по существу.

COVID-19 - потенциально тяжёлая острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 - оболочечный одноцепочный РНК-вирус, относящийся к роду Betacoronavirus, подроду Sarbecovirus, вызывающий опасное инфекционное заболевание - COVID-19

SARS-CoV-2-положительный – например, проба, анализ, разведение, для которых установлено наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ.

SARS-CoV-2-отрицательный – например, проба, анализ, разведение, для которых не установлено наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ.

ПЦР - метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени (или количественная ПЦР) представляющая собой лабораторный метод, основанный на методе ПЦР, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий.

ОТ-ПЦР-РВ – метод одностадийной реакции обратной транскрипции, совмещённой полимеразная цепная реакция в реальном времени, позволяющий амплифицировать специфический фрагмент рибонуклеиновой кислоты (РНК) и измерять количество её копий.

Разведение - суспензии или растворы, полученные путем смешивания определенного объема исходного образца с кратным объемом разбавителя.

Серийные разведения - суспензии или растворы, полученные путем смешивания определенного объема исходной суспензии с кратным объемом разбавителя и повторения этой процедуры до тех пор, пока не будет получена серия кратных разведений, пригодных для дальнейшего анализа

Наименьшее разведение – наименьшее разведение сточных вод, в которых любыми

сертифицированными методами детектируется наличие вирусных частиц SARS-CoV-2.

Алгоритм разведения сточных вод – разработанная последовательность действий по приготовлению серийных разведений образцов

5 Коммерческий набор – готовый к использованию сертифицированный набор, включающий в себя все реактивы, расходные материалы, инструкцию для проведения работ, для которых предназначен данный коммерческий набор.

Уровень заболеваемости COVID-19 – доля населения на данной территории, заболевшего COVID-19, вызванного, вирусом SARS-CoV-2, выраженная в процентах от общей численности населения, проживающего на данной территории

10 Нижний предел определения - низшее значение, которое позволяет определить метод, используемый для анализа.

Поправочный коэффициент - нижний предел определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ.

15 Экскременты – фекалии и моча человека.

COVID-19 вызывается вирусными частицами SARS-CoV-2, характеризуется длительным инкубационным периодом и различным течением заболевания – от тяжелого до бессимптомного.

20 На дату подачи настоящей заявки основным мониторинга эпидемиологической ситуации по COVID-19 в мире является тестирование пациентов с характерным набором симптомов с использованием метода ПЦР и статистический анализ полученных результатов.

25 Диагностика методом ПЦР основана на определении последовательности РНК SARS-CoV-2, кодирующей ген N, ген E, ген Orf1ab, ген RdRp или фрагменты этих генов. В диагностических лабораториях на дау представления заявочных материалов для диагностики COVID-19 методом ПЦР в основном используют коммерческие наборы, например, TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1 (Thermo Fisher Scientific, США), Coronavirus (COVID-19) CE IVD (Primerdesign Ltd, Великобритания), GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) (Gold Standard Diagnostics Corp, USA), Labotaq SL, (Испания); Biosan, (Латвия); 30 GeneProod, (Чешская Республика), которые доступны по всему миру и упрощают процедуру анализа.

В России разработан коммерческий набор реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov», основанный на обнаружении фрагментов гена Orf1ab, который официально зарегистрирован и используется в лабораторных условиях [<https://www.syntol.ru/catalog/naboru-reagentov-dlya-ptsr-v-realnom-vremeni/nabor-reagentov-ptsr-rv-2019-ncov.html>]. 35

Из исследованного уровня техники заявителем выявлено изобретение, демонстрирующее применение методов ПЦР для диагностики заболевания COVID-19 по патенту РФ 2731390 «Тест-система и способ для выявления РНК вирусных частиц коронавируса SARS-COV-2, вируса - возбудителя коронавирусного заболевания 2019 40 COVID-19, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Варианты)». Сущностью является тест-система для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 путем проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени, включающая праймер SBT0017, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-GCTGGCACAGACTTAGAAGGT-3', праймер SBT0018, имеющий нуклеотидную 45 последовательность 5'-AGCAGCGTACAACCAAGCTAA-3', и зонд SBT0019, имеющий последовательность 5'-GTTGACAGGCAAACAGCACAAGCAGCTG-3', а также для положительного контроля прохождения всех этапов анализа, включающая специфичные к гену домашнего хозяйства человека GAPDH праймер SBT0014, имеющий нуклеотидную

последовательность 5'-ТССААААТСААГТГГГГСГА-3', праймер SBT0015, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-TGATGACCSTTTTGGCTCCC-3', и зонд SBT0016, имеющий последовательность 5'-CGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTG-3', или включающая специфичные к гену домашнего хозяйства человека АСТВ праймер SBT0011, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-CGTCTTCCCCTCCATCGTG-3', праймер SBT0012, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-AGGGTGAGGATGCCTCTCTT-3', и зонд SBT0013, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-GATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGATTC-3'. (Вариант 1).

Тест-система для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 путем проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени, включающая праймер SBT003, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-GTTTCGCATTCACCAGGACAG-3', праймер SBT004, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-АСТТСТААГТСТГТГССАГС-3', и зонд SBT0026, имеющий последовательность 5'-СТГГТГТТАССААТГТГСТАТГАГГССС-3', а также для положительного контроля прохождения всех этапов анализа включающая специфичные к гену домашнего хозяйства человека GAPDH праймер SBT0014, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-ТССААААТСААГТГГГГСГА-3', праймер SBT0015, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-TGATGACCSTTTTGGCTCCC-3', и зонд SBT0016, имеющий последовательность 5'-CGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTG-3', или включающая специфичные к гену домашнего хозяйства человека АСТВ праймер SBT0011, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-CGTCTTCCCCTCCATCGTG-3', праймер SBT0012, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-AGGGTGAGGATGCCTCTCTT-3', и зонд SBT0013, имеющий нуклеотидную последовательность 5'-GATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGATTC-3'. (Вариант 2).

Способ выявления РНК вируса SARS-CoV-2, включающий выделение РНК из биологического материала, синтез кДНК и проведение ПЦР-РВ, отличающийся тем, что синтез кДНК проводят при 45°C в течение 30 минут, после чего MMLV ревертазу инактивируют прогреванием при 95°C в течение от 2 до 5 минут, далее полученную кДНК амплифицируют в ПЦР-РВ с участием специфичной к вирусному гену 3CLpro тест-системы по п. 1 или 2, причем в качестве контроля в той же или параллельной, но с тем же образцом, реакции амплифицируется кДНК гена домашнего хозяйства GAPDH с участием пары праймеров и зонда или кДНК гена домашнего хозяйства АСТВ с участием пары праймеров и зонда, при этом температурный режим ПЦР-РВ включает следующие этапы: прогревание при 95°C в течение от 2 до 5 минут, совмещенное с инактивацией MMLV ревертазы, и от 45 до 49 циклов амплификации 95°C – от 5 до 15 с, 55°C – от 20 с до 1 мин, а детекцию флуоресценции проводят в ходе каждого цикла при температуре 55°C по каналам HEX/VIC для вирусной последовательности и FAM для последовательности гена домашнего хозяйства, при этом результаты интерпретируют на основании появления характерной кинетической кривой и ее пересечения с пороговой линией.

Известное техническое решение использовано в заявленном техническом решении в качестве инструмента выявления наличия РНК вирусных частиц SARS-CoV-2.

Известны методы мониторинга эпидемиологической ситуации COVID-19, которые включают данные о количестве заболевших на основании анализа клинической картины заболевания пациента медицинскими работниками и поставленного диагноза. Среди диагностических признаков выделяют группы симптомов: распространенные - лихорадка, сухой кашель, усталость, менее распространенные - боль в горле, диарея, конъюнктивит, головная боль, потеря вкуса или запаха, кожная сыпь или изменение

цвета пальцев рук или ног, и редкие, обычно наблюдаемые в тяжелых случаях - затрудненное дыхание или одышка, боль или давление в груди, потеря речи или движения [Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports...; La Rosa et al., 2020; Mao et al., 2020]. На основании поставленных таких методом диагнозов и диагнозов, установленных методом ПЦР, проводится статистический анализ данных и устанавливается уровень заболеваемости, что позволяет отслеживать эпидемиологическую ситуацию.

Общим недостатками известных методов является то, что они позволяют оценить уровень заболеваемости только для части населения, обратившегося за медицинской помощью в связи с развитием симптомов.

Соответственно, метод, основанный на анализе клинической картины пациента, не позволяет в принципе установить количество бессимптомных больных. И пул данных о заболеваемости на основе тестов ПЦР в рамках такого подхода также в большей степени содержит данные о людях с выраженными симптомами.

При этом, у 18-31% людей болезнь протекает бессимптомно (Haramoto. et al., 2020).

Применение массовой диагностики при помощи метода ПЦР могло бы компенсировать приведенные недостатки, но проведение массовых тестов для большого количества людей связано с огромными затратами ресурсов, включая материальные, и времени.

К тому же в режиме массового тестирования диагностические лаборатории оказываются перегруженными, что помимо прочего приводит к увеличению сроков выполнения анализов.

Соответственно, при мониторинге эпидемиологической ситуации данные о результатах анализов предоставляются несвоевременно, что приводит к понижению эффективности и оперативности мониторинга.

Указанные недостатки приводят к искажению и недостоверности результатов мониторинга эпидемиологической ситуации и, как следствие, не могут рассматриваться как основа для принятия адекватных ситуации управленческих решений.

Альтернативой массовому тестированию населения является анализ сточных вод на содержание вирусных частиц SARS-CoV-2. Известно, что источником вирусных частиц в сточных водах являются экскременты заболевших людей (Wu et al., 2020; Wurtzer et al., 2020; Medema et al., 2020; Ahmed et al., 2020; Haramoto. et al., 2020).

Способ мониторинга, построенный на анализе сточных вод по содержанию биомаркеров (психоактивных веществ, гормонов, токсикантов, вирусных частиц, патогенных бактерий, антибиотиков и антибиотикоустойчивых бактерий) активно применяется в практике и называется «wastewater based epidemiology» или “эпидемиология сточных вод” (WBE).

Такой подход нашел свое применение на территории Китая для контроля оборота наркотиков (Мао и др., 2020), для контроля распространения антибиотикорезистентности у бактерий в Европейских странах, США и Австралии (Sims and Kasprzyk-Hordern, 2020). Благодаря использованию современных методов аналитической химии и молекулярной биологии, включающие методы ПЦР, такой способ характеризуется высокой специфичностью по отношению к биомаркеру.

Соответственно, способ анализа сточных вод на содержание вирусных частиц SARS-CoV-2 является одним из вариантов WBE. Преимущества способа WBE состоит в его масштабируемости и практическом отсутствии ограничений по объему тестируемой выборки, поскольку для получения информации о количестве заболевших необходимо правильно организовать отбор проб сточных вод на выбранном уровне сообщества – начиная от отдельного многоэтажного дома, заканчивая городом или регионом. WBE позволяет проводить мониторинг населения “в реальном времени”, поскольку в

зависимости от типа биомаркера время получения результатов составляет от нескольких минут до максимум двух суток (Sims and Kasprzyk-Hordern, 2020).

Соответственно, способ WBE позволяет получать оперативную информацию об эпидемиологической ситуации, в том числе для больших выборок («Вода, санитария, гигиена и удаление отходов для SARS-CoV-2, вируса, вызывающего COVID-19»; Мао и др., 2020).

Дополнительные преимущества связаны с отсутствием необходимости организовывать массовые тестирования людей, соответственно, обеспечивать безопасность большого количество медицинского персонала, повышать нагрузку на 10 диагностические лаборатории, зависеть от менталитета и сознательности населения.

Благодаря указанным преимуществам, существенно снижается стоимость и повышается точность мониторинга, в том числе за счет получения информации о бессимптомных больных. При этом показано, что вирусные частицы SARS-CoV-2 присутствуют в кале инфицированных людей, в том числе в случае бессимптомного 15 течения заболевания, в количестве до 10^{10} копий/г (Wu et al., 2020; La Rosa et al., 2020; Kitajima et al., 2020), что оказывается достаточным для определения их методом ПЦР (Мао et al., 2020) в экскрементах больного человека COVID-19. На этом уровне достоверность, точность и специфичность проводимых тестов не уступает традиционным 20 методикам, например, анализу при помощи ПЦР мазка из зева (Kitajima et al., 2020).

Более того, известно, что в сточных водах населенных пунктов с наличием инфицированного населения также обнаруживают вирусные частицы, при этом считается, что преимущества этого подхода позволяют определить наличие вирусных 25 частиц SARS-CoV-2, если уровень заболеваемости тестируемого населения превышает 0,03% (Ahmed et al., 2020).

Так, например, вирусные частицы SARS-CoV-2 были обнаружены в сточных водах в Нидерландах, США, Австралии и Италии, даже до момента регистрации первого случая заболевания COVID-19 на исследованной территории (Wu et al., 2020; Medema et al., 2020; Ahmed et al., 2020; La Rosa et al., 2020).

Несмотря на естественное снижение количества вирусных частиц в сточных водах по сравнению с их количеством в экскрементах больного COVID-19 человека, 30 установлено, что количество вирусных частиц в сточных водах составляет 10^2 - 10^4 копий/л (Wu et al., 2020; Wurtzer et al., 2020; Medema et al., 2020; Ahmed et al., 2020; Haramoto et al., 2020).

Соотношение количества вирусных частиц в сточных водах и в экскрементах больного COVID-19 является основой для определения уровня заболеваемости в рамках WBE-способа.

Источником, который выбран заявителем в качестве прототипа, является техническое решение реализации WBE-способа для определения количества инфицированных COVID- 40 19 является публикация «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» («Первое подтвержденное обнаружение SARS-CoV-2 в неочищенных сточных водах в Австралии: подтверждение концепции надзора за сточными водами COVID-19 в сообществе») (авторы Warish Ahmed и др.) [<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720322816>]. Сущностью прототипа является количественное определение SARS-CoV-2 в сточных водах, которое дает возможность отслеживать количество 45 инфицированных людей с помощью WBE-способа. В прототипе РНК SARS-CoV-2 была сконцентрирована и выделена из пробы сточных вод с очистных сооружений в Австралии, количество копии вирусной РНК было подсчитано с использованием ОТ-

ПЦР-РВ. На основе установленного количества РНК SARS-CoV-2 в сточных водах и известных из уровня техники данных о количестве РНК SARS-CoV-2 в экскрементах людей, инфицированных COVID-19, было установлено количество людей, инфицированных COVID-19, проживающих в тестируемой области, и чьи бытовые стоки собираются на очистных сооружениях в тестируемой области. Учитывая информацию о характере распределения случаев заболевания COVID-19 и проведя моделирование при помощи метода Монте-Карло, авторы прототипа смогли оценить средний диапазон количества инфицированных людей 171-1090 чел. при населенности тестируемой области 600 000 чел. В результате сравнения полученных данных с данными официальной статистики по уровню заболеваемости в регионе, в которую входит тестируемая область, авторы прототипа делают вывод о хорошем соответствии с клиническими наблюдениями. Расчет уровня заболеваемости производится по формуле:

$$N = \frac{\left(\frac{\text{РНК копии}}{\text{литры сточной воды}} \right) * \left(\frac{\text{литры сточной воды}}{\text{сутки}} \right)}{\left(\frac{\text{граммы фекалий}}{\text{человек - день}} \right) * \left(\frac{\text{РНК копии}}{\text{граммы фекалий}} \right)}$$

Таким образом, нижний предел определения для способа прототипа составляет 0,03%, что позволяет авторам сделать вывод о применимости предложенного ими WBE-способа для мониторинга эпидемиологической ситуации по COVID-19.

Прототип описывает следующую последовательность действий по WBE:

- проводят отбор неочищенных сточных вод;
- проводят концентрирование образцов сточных вод;
- проводят выделение РНК;
- проводят анализ проб на наличие РНК вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью тестов на основе ПЦР с введением внешнего контроля - *Oncorhynchus keta* (10^4 ед./реакцию);
- в случае положительного результата на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 проводят оценку распространенности инфекции, с учетом результатов моделирования, выполненного в Oracle Crystal Ball (версия 11.1.2.4.600, Редвуд-Сити, Калифорния).

Недостатками прототипа по сравнению с заявленным техническим решением является:

- недостаточная точность результатов мониторинга. Нижний предел определения уровня заболеваемости для прототипа составляет 0,03%, для заявленного технического решения - 0,01%;
- большая длительность процедуры анализа проб в рамках мониторинга заболеваемости COVID-19. Например, длительность анализа 150 проб для прототипа составляет 2145 мин., для заявленного технического решения - 1170 мин. (см. Таблицу 4 на Фиг. 4)
- более высокая стоимость анализа проб в рамках мониторинга заболеваемости COVID-19. Например, стоимость анализа 50 проб для прототипа составляет 300 388,43 руб., для заявленного технического решения - 183 343,47 руб. (см. Таблицу 5 на Фиг. 5).

Целью и техническим результатом заявленного технического решения является устранение недостатков прототипа путем разработки способа мониторинга заболеваемости COVID-19 с использованием анализа сточных вод, позволяющего:

- повысить точность результатов мониторинга путем понижения значения нижнего предела определения уровня заболеваемости;
- снизить длительность процедуры анализа проб в рамках мониторинга уровня

заболеваемости COVID-19;

- снизить стоимость анализа проб в рамках мониторинга уровня заболеваемости COVID-19.

5 Сущностью заявленного технического решения является способ мониторинга заболеваемости COVID-19 с использованием анализа сточных вод, заключающийся в том, что

на этапе 1 проводят определение поправочного коэффициента m , который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ, для чего:

10 готовят модельную сточную воду,

проводят сбор экскрементов у r пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 на основе клинических данных и результатов диагностики мазка из зева методом ПЦР,

берут аликвоты образцов экскрементов r пациентов и разбавляют модельной сточной водой в соотношении, обеспечивающем содержание экскрементов в составе образцов
15 на уровне среднего содержания экскрементов в среднем стоке с 1 человека в сутки, смесь перемешивают механическим путем, получают образцы № 1...№ p ,

далее проводят серийные разведения образцов № 1...№ p , при этом на каждом этапе серийного разведения образцы № 1...№ p разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов
20 для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, серию разведений продолжают до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ,

далее проводят усреднение значений максимальных степеней разведения для образцов № 1...№ p , при которых достигнут нижний предел определения метода ОТ-ПЦР-РВ, далее проводят расчет среднеарифметического значения максимальных степеней
25 разведения, которое далее используется для расчета значения поправочного коэффициента m ,

определяют поправочный коэффициент m как отношение 100 к
30 среднеарифметическому значению максимальных степеней разведения SARS-CoV-2-положительной пробы модельного образца сточных вод, содержащего экскременты пациентов с COVID-19;

затем на этапе 2 проводят мониторинг заболеваемости COVID-19, для чего

определяют места отбора сточных вод и количество образцов сточных вод в зависимости от цели и объема тестируемой выборки для мониторинга заболеваемости населения COVID-19,

35 проводят отбор образцов сточных вод,

проводят выделение РНК из образцов сточных вод с помощью коммерческих наборов для выделения РНК, использованных на этапе 1,

проводят анализ проб на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью коммерческих наборов для проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, использованных на этапе
40 1,

в случае отрицательного результата, образец сточных вод признают SARS-CoV-2-отрицательным, и, соответственно, уровень заболеваемости равным 0%,

в случае положительного результата образец сточных вод признают SARS-CoV-2-положительным, далее, готовят серийные разведения образцов сточных вод, на каждом
45 этапе серийного разведения образцы разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ использованных на этапе 1, серию разведений готовят до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ,

определяют максимальную степень разбавления сточных вод k ,

далее проводят расчет значения N - уровня заболеваемости COVID-19 по формуле $N = k * m$, где N - уровень заболеваемости COVID-19 в %, k - максимальная степень разбавления сточных вод, m – поправочный коэффициент на значение нижнего предела метода ОТ-ПЦР-РВ.

Заявленное техническое решение иллюстрируется Фиг.1 - Фиг.5.

На Фиг.1 приведена Таблица 1, в которой представлены данные десяти пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 на основе клинических данных и результатов диагностики мазка из зева методом ПЦР, собранные за 24 ч, на 5-8 сутки после регистрации первых симптомов.

На Фиг.2 приведена Таблица 2, в которой приведены данные по определению нижнего предела уровня заболеваемости и поправочного коэффициента m .

На Фиг.3 приведена Таблица 3, в которой показано обнаружение РНК SARS-CoV-2 в пробах сточных вод.

На Фиг.4 приведена Таблица 4, в которой показано сравнение длительности процедуры мониторинга по прототипу и заявленному техническому решению.

На Фиг.5 приведена Таблица 5, в которой показано сравнение стоимости анализов по прототипу и заявленному техническому решению.

Для достижения заявленного технического результата:

- из процедуры анализа по прототипу исключен этап концентрирования пробы. Это позволяет повысить точность определения количества вирусных частиц SARS-CoV-2 и, как следствие, повысить точность результатов мониторинга путем понижения значения нижнего предела определения уровня заболеваемости, поскольку способ концентрирования проб существенно влияет на точность проведения анализа количества вирусных частиц SARS-CoV-2 в образцах сточных вод - в зависимости от условий, способа и реализации этого этапа его точность варьируется в очень широком диапазоне - от 10 до 80% (Hata et al.; Medema et al., 2020; Haramoto et al., 2020; Kitajima et al., 2020). Также процедура концентрирования является одной из самых затратных с точки зрения времени ее проведения и стоимости расходных материалов, что существенно повышает длительность и стоимость анализа проб в рамках мониторинга заболеваемости COVID-19 (см. Таблицу 4 и 5 на Фиг.4 и 5);

- из процедуры анализа по прототипу исключен этап внесения внешнего контроля при выделении РНК, при проведении реакций ОТ и ПЦР-РВ. Это позволяет повысить точность определения количества вирусных частиц SARS-CoV-2 и, как следствие, повысить точность результатов мониторинга путем понижения значения нижнего предела определения уровня заболеваемости.

Точность определения количества вирусных частиц SARS-CoV-2 при использовании процедуры внесения внешнего контроля зависит от типа внешнего контроля. Из уровня техники известно, что в качестве внешнего контроля применяется не вирусные частицы SARS-CoV-2, а вирусные частицы гепатита мышей, колифага MS2 (ATCC 15597-B1), вируса табачной мозаики, фага Pseudomonas Ф6 и норовируса мышей (Hata et al.; Medema et al., 2020; Haramoto et al., 2020; Kitajima et al., 2020).

Точность определения количества вирусных частиц SARS-CoV-2 составляет от 8.5 до 71.6% в зависимости от использованного внешнего контроля и способа концентрации (Hata et al.; Medema et al., 2020; Haramoto et al., 2020; Kitajima et al., 2020).

На дату подачи настоящей заявки внешний контроль, представляющий собой стандартизованные вирусные частицы SARS-CoV-2 с известной концентрацией, не выявлен заявителем из уровня техники.

Благодаря исключению этапа внесения внешнего контроля, вносящего дополнительную неконтролируемую погрешность в результаты мониторинга COVID-19, достигается повышение точности результатов мониторинга. При этом снижается стоимость мониторинга благодаря снижению затрат на расходные материалы, используемые при процедуре внесения внешнего контроля в процессе выделения РНК (см. Таблицу 5 на Фиг.5).

- добавлен этап определения поправочного коэффициента m , который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ. Поправочный коэффициент m определяется как отношение 100 к максимальной степени разбавления SARS-CoV-2-положительной пробы модельного образца сточных вод, содержащего экскременты пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 на основе клинических данных и результатов диагностики мазка из зева методом ПЦР.

Введенный этап приводит к повышению точности определения уровня заболеваемости, так как расчет с использованием поправочного коэффициента m не зависит от введения внешнего контроля. Этап проводят однократно для модельного образца сточных вод, содержащего экскрементов пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, поэтому его введение не приводит к значительному повышению длительности и стоимости анализа проб в рамках мониторинга уровня заболеваемости COVID-19 (см. Таблицы 4 и 5 на Фиг.4 и 5).

- добавлен этап определения максимальной степени разведения k образцов сточных вод, отобранных для мониторинга, путем проведения серийных разведений образцов сточных вод и определения в них наличия вирусных частиц SARS-CoV-2. Длительность процедуры и стоимость данного этапа не превышает суммарного значения длительности и стоимости исключенных этапов концентрирования пробы и внешнего контроля (см. Таблицу 4 и 5 на Фиг.4 и 5).

- изменен по сравнению с прототипом этап расчета N - уровня заболеваемости COVID-19.

Этот этап позволяет перевести результат определения наличия SARS-CoV-2 в значение N - уровня заболеваемости COVID-19 в % по отношению к общей численности населения, при значении k - максимальной степени разбавления сточных вод и внесении поправок на значение нижнего предела метода ОТ-ПЦР-РВ - поправочного коэффициента m . Расчет производится при помощи специально разработанной формулы $N = k * m$.

Далее приведена последовательность действий основных этапов заявленного способа.

Этап 1. Определение поправочного коэффициента m , который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ.

На Этапе 1 проводят следующую последовательность действий по заявленному способу:

1– готовят модельную сточную воду, в соответствии с методикой (см. Пример 2);

2– проводят сбор экскрементов у пациентов (p - количество пациентов) с подтвержденным диагнозом COVID-19 на основе клинических данных и результатов диагностики мазка из зева методом ПЦР (далее – пациентов с COVID-19);

3– берут аликвоты образцов экскрементов p пациентов и разбавляют модельной сточной водой в соотношении, обеспечивающем содержание экскрементов в составе образцов на уровне среднего содержания экскрементов в среднем стоке с 1 человека в сутки, смесь перемешивают механическим путем. Например, 1 г экскрементов перемешивают с 5 л модельной сточной воды, и далее доводят до среднего объема

стока с одного человека в стуки, например, 50 мл полученной смеси разбавляют в 40 раз. Получают образцы № 1...№ p, где p - количество пациентов;

4– проводят серийные разведения образцов № 1...№ p, на каждом этапе серийного разведения образцы № 1...№ p разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, серию разведений продолжают до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ;

5– проводят усреднение значений максимальных степеней разведения для образцов № 1...№ p, при которых достигнут нижний предел определения метода ОТ-ПЦР-РВ, получают среднеарифметическое значение максимальных степеней разведения, которое далее используется для расчета значения поправочного коэффициента m. Определяют поправочный коэффициент m как отношение 100 к среднеарифметическому значению максимальных степеней разведения SARS-CoV-2-положительной пробы модельного образца сточных вод, содержащего экскременты пациентов с COVID-19.

Этап 2. Проведение мониторинга заболеваемости COVID-19.

На Этапе 2 проводят следующую последовательность действий по заявленному способу:

6– определяют места отбора сточных вод и количество образцов сточных вод в зависимости от цели и объема тестируемой выборки для мониторинга заболеваемости населения COVID-19;

7– проводят отбор образцов сточных вод по ПНД Ф 12.15.1-08;

8– проводят выделение РНК из образцов сточных вод с помощью коммерческих наборов для выделения РНК, использованных на этапе 1;

9– проводят анализ проб на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью коммерческих наборов для проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, использованных на этапе 1;

10– в случае отрицательного результата, образец сточных вод признают SARS-CoV-2-отрицательным, и, соответственно, уровень заболеваемости равным 0%.

11– в случае положительного результата образец сточных вод признают SARS-CoV-2-положительным, готовят серийные разведения образцов сточных вод, на каждом этапе серийного разведения образцы разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ использованных на 1 этапе, серию разведений готовят до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ, определяют максимальную степень разбавления сточных вод k;

12– далее проводят расчет значения N - уровня заболеваемости COVID-19 при помощи специально разработанной формулы $N = k * m$, где N - уровень заболеваемости COVID-19 в %, k - максимальная степень разбавления сточных вод, m – поправочный коэффициент на значение нижнего предела метода ОТ-ПЦР-РВ;

Далее заявителем приведены примеры осуществления заявленного технического решения.

Пример 1. Проведение Этапа 1 – определение поправочного коэффициента m, который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ.

На Этапе 1 проводят следующую последовательность действий по заявленному способу.

Предварительно готовят модельную сточную воду. Для этого готовят смесь,

содержащую типичные отходы жизнедеятельности для жителя данного населенного пункта (района, микрорайона, дома), например, следующего состава.

Для объема, например, 1 л, берут, например: 0,05 г зубной пасты, 0,25 г мясного супа, 0,5 г овощного салата, 0,08 г геля для душа, 0,08 г песка, 0,03 г почвы, 0,08 г жидкого мыла, 0,08 г средства для мытья посуды и 0,03 г стирального порошка, остальное - вода.

Заявитель поясняет, что указанный состав модельной сточной воды приведен для иллюстрации осуществления заявленного технического решения и не ограничивает объем патентных притязаний для другого состава модельной сточной воды, так как состав сточной воды не оказывает влияние на заявленный технический результат.

Модельную сточную воду помещают в тару, например, пластиковую, объемом, например, 10 л, в количестве, например, 5 л в каждую тару. Количество единиц тары соответствует количеству исследованных пациентов - десять. Заявитель поясняет, что количество пациентов – десять взято для иллюстрации осуществления заявленного технического решения, что не ограничивает объем патентных притязаний для другого количества пациентов. При этом заявитель считает, что минимальным количеством пациентов для определения поправочного коэффициента должно быть не менее 5 человек.

Далее проводят сбор экскрементов у p пациентов (в настоящем примере брали пробы экскрементов у десяти пациентов с COVID-19, $p = 10$) с подтвержденным диагнозом COVID-19. Экскременты у каждого пациента собирали в течение 24 ч, в отдельную емкость для каждого пациента, на 5-8 сутки после регистрации первых симптомов болезни (Таблица 1 на Фиг.1).

Далее проводят разведение полученной смеси для имитации среднего суточного объема сточных вод, производимых человеком, живущим в многоквартирном доме в России, который составляет 200 л. Этот объем соответствует среднему количеству сточных вод, производимых жителями многоквартирных домов в центральной части России [СНиП 2.04.01-85 Внутренний водопровод и канализация зданий, 1985]. Для этого берут аликвоты образцов экскрементов p пациентов и разбавляют модельной сточной водой в соотношении, обеспечивающем содержание экскрементов в составе образцов на уровне среднего содержания экскрементов в среднем стоке с 1 человека в сутки, например, 1 г экскрементов перемешивали с 5 л модельной сточной воды. Смесь перемешивают механическим путем, например, с помощью электродрели с насадкой для перемешивания, например, со скоростью 1000 об / мин. Далее готовят образец соответствующий среднему объему стока с одного человека в сутки, например, отбирают 50мл полученной смеси и разбавляют ее в 40 раз.

Получают образцы № 1...№ p , где p - количество пациентов. Заявитель поясняет, что при такой подготовке образцов № 1...№ p вирусная нагрузка в них должна соответствовать сточным водам населенных пунктов со 100% -ной степенью заболеваемости.

Далее готовят серийные разведения образцов № 1...№ p . На каждом этапе серийного разведения образцы № 1...№ p разводили в 2-4 раза и тестировали методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, серию разведений продолжали до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ. Нижний предел определяют таким образом, чтобы в предпоследнем разведении наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 не было установлено при помощи метода ОТ-ПЦР-РВ. При этом делают еще одно - последнее разведение для достоверности подтверждения

невозможности определения вирусных частиц.

Например, была подготовлена серия разведений образцов № 1...№ 10 от 25% до 0,003% с использованием модельных сточных вод до достижения SARS-CoV-2-отрицательной концентрации. Это не ограничивает объем патентных притязаний для других концентраций, что зависит от чувствительности коммерческих наборов для выделения РНК и коммерческих тестов на основе ОТ-ПЦР-РВ, которые будут использованы для осуществления мониторинга в каждой конкретной лаборатории.

Далее проводили анализ разведенных образцов № 1, ... № 10 на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью тестов на основе ПЦР. Анализ проводят сразу после приготовления образцов № 1, ... № 10. Все анализы проводили в трех повторностях.

Из разведенных образцов № 1, ... № 10 производили выделение РНК с помощью коммерческого набора viral RNA mini kit (QIAGEN, Германия). Для выделенной общей РНК производили определение наличия РНК вирусных частиц коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР-РВ с помощью коммерческого набора «ПЦР-РВ-2019-nCov» (ООО «Синтол», Россия). Для амплификации в этом коммерческом наборе используются два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих фрагмент гена Orf1ab генома SARS-CoV-2. Набор содержит стерильные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с лиофилизированной реакционной смесью. Набор позволяет одновременно обнаруживать РНК коронавируса SARS-CoV-2 (канал обнаружения R6G) и проверять эффективность выделения нуклеиновых кислот, степень ингибирования реакций обратной транскрипции и амплификации (каналы обнаружения FAM и Cy5 соответственно).

Реакцию ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием следующей температурной программы на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США):

обратная транскрипция при 50 °С в течение 15 минут,

инактивация при 95 °С в течение 5 минут,

амплификация - 50 трехступенчатых циклов:

95°С в течение 10 секунд,

58°С в течение 10 секунд,

72°С в течение 20 секунд.

Согласно инструкции к набору «ПЦР-РВ-2019-nCov», образцы сточных вод регистрируют как положительные, когда Ct в канале обнаружения R6G составляет меньше 30.

Наименьшее разведение для всех 10 образцов в проведенном эксперименте приведено в Таблице 2, столбец 2, строка 8).

Далее проводили усреднение значений максимальных степеней разведения для образцов № 1...№ 10, при которых достигнут нижний предел определения метода ОТ-ПЦР-РВ, получили среднеарифметическое значение максимальных степеней разведения, которое используют для расчета значения поправочного коэффициента m .

Определили поправочный коэффициент m как отношение 100 к среднеарифметическому значению максимальных степеней разведения SARS-CoV-2-положительной пробы модельного образца сточных вод, содержащего экскрементов пациентов с диагнозом COVID-19 (Таблица 2, столбец 3, строка 8). Для этого 100% разделили на 8192. Получен результат 0,01%.

Таким образом, поправочный коэффициент m , который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ, для данного эксперимента равен 0,01%.

Результаты представлены в Таблице 2 на Фиг.2. Из данных, представленных в Таблице 2, можно сделать вывод, что заявленный способ может выявить минимальный уровень

заболеваемости COVID-19, равный 0,01%.

Пример 2. Проведение Этапа 2. Проведение мониторинга заболеваемости COVID-19.

5 На Этапе 2 проводили следующую последовательность действий по заявленному способу.

Мониторинг заболеваемости населения COVID-19 по Примеру 1 проведен в городском населенном пункте.

10 Определяют места отбора сточных вод, периодичность и количество образцов сточных вод в зависимости от цели и объема тестируемой выборки для мониторинга заболеваемости населения COVID-19.

15 Так, в эксперименте по Примеру 2 проведен отбор сточных вод из нескольких городских канализационных коллекторов по ПНД Ф 12.15.1-08. Использовались 2 серии экспериментальных образцов сточных вод с периодом между отборами 4 месяца, таким образом, исследовались серия 1 (март 2020 года) и серия 2 (июль 2020 года) в 11 канализационных коллекторах, 10 из которых находились в жилых массивах города, а одна - в административном районе. Заявитель поясняет, что количество точек отбора (например, канализационных коллекторов) приведено для иллюстрации осуществления заявленного технического решения и не ограничивает объем патентных притязаний как для другого количества точек отбора, так и для других мест отбора сточных вод, 20 так как изменение количества и мест отбора не оказывает влияние на заявленный технический результат. При этом заявитель поясняет, что количество и места отбора сточных вод зависят от задач мониторинга, например - мониторинг заболеваемости в населенном пункте в целом, или в районе населенного пункта, и т.д.

25 Образцы из каждого канализационного коллектора собирали в течение 24 часов по 200 мл каждый час, смешивая в стерильной пластиковой таре объемом 5 л. Между сборами тару хранили при пониженной температуре на льду (при 4 °С).

30 После завершения отбора, пробы были транспортированы при 4 °С в лабораторию. Выделение общей РНК проводили сразу после доставки проб в лабораторию с помощью коммерческих наборов для выделения РНК, использованных на этапе 1. Выделенная РНК проанализирована на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью коммерческих наборов для проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, использованных на этапе 1.

35 Пробы разделяли на 2 категории в зависимости от результатов анализа: SARS-CoV-2-положительные и SARS-CoV-2-отрицательные. Пробы маркировались в соответствии с результатом.

40 В случае положительного результата образцы сточных вод признают SARS-CoV-2-положительными и готовят для них серийные разведения модельными сточными водами. На каждом этапе серийного разведения образцы разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, серию разведений продолжают до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ, при максимальной степени разбавления сточных вод к.

45 Так, по Примеру 2 образцы разводили в 5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 и 250 раз по объему, таким образом, чтобы в предпоследнем разведении наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 не было установлено при помощи метода ОТ-ПЦР-РВ. При этом делали еще одно - последнее разведение для достоверности подтверждения невозможности определения вирусных частиц. Далее из каждого образца серии разведения выделяли общую РНК и анализировали на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью

метода ОТ-ПЦР-РВ по Примеру 1. Каждый неразведенный образец и образец серии разведения анализировали в трех повторностях.

Далее проводят расчет значения N - уровня заболеваемости COVID-19 при помощи специально разработанной формулы $N = k * m$, где N - уровень заболеваемости COVID-19 в %, k - максимальная степень разбавления сточных вод, m – поправочный коэффициент на значение нижнего предела метода ОТ-ПЦР-РВ.

Результаты представлены в Таблице 3 на Фиг.3.

Как следует из Таблицы 3, в экспериментальной серии 1 не было обнаружено частиц SARS-CoV-2, а в четырех образцах экспериментальной серии 2 были обнаружены вирусные частицы SARS-CoV-2.

Максимальная степень разбавления сточных вод, для которых было установлено наличие вирусных частиц SARS-CoV-2, равно 1: 100, 1: 150, 1:75 и 1: 150, таким образом, $k = 100, 150, 75, 150$ соответственно.

Поправочный коэффициент на значение нижнего предела метода ОТ-ПЦР-РВ $m = 0,01\%$.

В результате для проведенного заявителем экспериментом заболеваемость населения COVID-19 в соответствующих жилых массивах составляет:

$$N_1 = 100 * 0,01 = 1,00\%,$$

$$N_2 = 150 * 0,01 = 1,50\%,$$

$$N_3 = 75 * 0,01 = 0,75\%$$

$$N_4 = 100 * 0,01 = 1,50\%.$$

Точность мониторинга по заявленному способу составляет 0,01% по сравнению с 0,03% у прототипа (так как прототип детектирует не менее 171 больного из 600 000 человек), то есть заявленный способ позволяет при достаточной простоте анализа выявлять 1 инфицированного COVID-19 человека на 10 000 человек, что в 3 раза точнее прототипа, что подтверждает достижение заявленного технического результата.

При этом заявителем снижена длительность процедуры и стоимость мониторинга в результате исключения этапов концентрирования и внешнего контроля.

В Таблице 4 на Фиг.4 приведены данные по длительности процедуры мониторинга,

Из данных, приведенных в Таблице 4, видно, что длительность процедуры мониторинга, например, при расчете на 150 проб, составляет по прототипу 2145 мин по сравнению с 1170 мин у заявленного технического решения, что подтверждает достижение заявленного технического результата. При этом разница в длительности мониторинга по сравнению с прототипом возрастает по мере увеличения количества проб, так как длительность этапа определения поправочного коэффициента при этом не изменяется.

В Таблице 5 на Фиг.5 приведены данные по стоимости процедуры мониторинга.

Из данных, приведенных в Таблице 5, видно, что стоимость мониторинга, например, при расчете на 50 проб, составляет по прототипу 300 388,43 руб. по сравнению с 183 343,47 руб. у заявленного технического решения, что подтверждает достижение заявленного технического результата. При этом разница в стоимости мониторинга по сравнению с прототипом возрастает по мере увеличения количества проб, так как стоимость этапа определения поправочного коэффициента при этом не изменяется.

На основании изложенного выше можно сделать вывод, что заявителем достигнуты все поставленные цели и заявленный технический результат, а именно - устранены недостатки прототипа путем разработки способа мониторинга заболеваемости COVID-19 с использованием анализа сточных вод, что позволило:

- повысить точность результатов мониторинга путем понижения значения нижнего предела определения уровня заболеваемости в три раза по сравнению с прототипом - с 0,03% до 0,01%;

5 - снизить длительность процедуры анализа проб в рамках мониторинга уровня заболеваемости COVID-19 по сравнению с прототипом, например, с 2145 мин до 1170 мин при анализе 150 проб;

- снизить стоимость анализа проб в рамках мониторинга уровня заболеваемости COVID-19 по сравнению с прототипом, например, с 300 388,43 руб. до 183 343,47 руб. при анализе 50 проб.

10 Для этого:

- из стандартной процедуры анализа по прототипу исключен этап концентрирования проб, что привело к повышению точности мониторинга. При этом снижена длительность и стоимость анализа проб в рамках мониторинга заболеваемости COVID-19 (см. Таблицу 4 и 5 на Фиг.4 и 5).

15 - из стандартной процедуры анализа по прототипу исключен этап внешнего контроля при выделении РНК, проведении реакций ОТ и ПЦР-РВ для количественного подсчета вирусных частиц, что привело к повышению точности мониторинга. При этом снижена стоимость анализа проб в рамках мониторинга заболеваемости COVID-19 в результате снижения затрат на расходные материалы (см. Таблицу 5 на Фиг.5).

20 - добавлен этап определения поправочного коэффициента m , который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ, что привело к повышению точности мониторинга, так как расчет с использованием поправочного коэффициента m не зависит от введения внешнего контроля. Этап проводят однократно для модельного
25 образца сточных вод, содержащего экскрементов пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, поэтому его введение не приводит к значительному повышению длительности и стоимости анализа проб в рамках мониторинга уровня заболеваемости COVID-19 (см. Таблицу 4 на Фиг.4). При этом разница в длительности и стоимости мониторинга по сравнению с прототипом возрастает по мере увеличения количества
30 проб, так как стоимость этапа определения поправочного коэффициента m при этом не изменяется.

- добавлен этап определения максимальной степени разведения k образцов сточных вод, отобранных для мониторинга, путем проведения серийных разведений образцов сточных вод и определения в них наличия вирусных частиц SARS-CoV-2. Длительность
35 процедуры и стоимость данного этапа не превышает суммарного значения длительности и стоимости исключенных этапов концентрирования пробы и внешнего контроля (см. Таблицу 4 и 5 на Фиг.4 и 5).

- изменен по сравнению с прототипом этап расчета N - уровня заболеваемости COVID-19. Этот этап позволяет перевести результат определения наличия SARS-CoV-2 в
40 значение N - уровня заболеваемости COVID-19 в % по отношению к общей численности населения, при значении k - максимальной степени разбавления сточных вод и внесения поправок на значение нижнего предела метода ОБ-ПЦР-РВ - поправочного коэффициента m . Расчет производится при помощи специально разработанной формулы $N = k * m$.

45 Заявленное техническое решение соответствует условию патентоспособности «новизна», предъявляемому к изобретениям, так как на дату представления заявочных материалов заявителем из исследованного уровня техники не выявлены источники, обладающие совокупностью признаков, идентичными совокупности признаков

заявленного технического решения.

Заявленное техническое решение соответствует условию патентоспособности «изобретательский уровень», предъявляемому к изобретениям, т. к. совокупность заявленных признаков обеспечивает получение неочевидных для специалиста

5 технических результатов, превышающих технический результат прототипа.

Заявленное техническое решение соответствует условию патентоспособности «промышленная применимость» предъявляемому к изобретениям, т.к. заявленный способ может быть осуществлен посредством использования известных реагентов с применением стандартного оборудования и известных приемов и позволяет при

10 достаточной простоте анализа выявлять 1 инфицированного COVID-19 человека на 10000 человек. При этом заявленный способ может быть адаптирован для любых типов сточных вод, климатических условий, коммерческих наборов для экстракции ДНК / РНК и коммерческих наборов для реакции RT-PCR и является более экономичным.

15 (57) Формула изобретения

Способ мониторинга заболеваемости COVID-19 с использованием анализа сточных вод, заключающийся в том, что

на этапе 1 проводят определение поправочного коэффициента m , который является нижним пределом определения уровня заболеваемости с использованием выбранных

20 коммерческих наборов для экстракции РНК и ОТ-ПЦР-РВ, для чего:

готовят модельную сточную воду,

проводят сбор экскрементов у r пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 на основе клинических данных и результатов диагностики мазка из зева методом ПЦР,

берут аликвоты образцов экскрементов r пациентов и разбавляют модельной сточной

25 водой в соотношении, обеспечивающем содержание экскрементов в составе образцов на уровне среднего содержания экскрементов в среднем стоке с 1 человека в сутки, смесь перемешивают механическим путем, получают образцы № 1...№ r ,

далее проводят серийные разведения образцов № 1...№ r , при этом на каждом этапе серийного разведения образцы № 1...№ r разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-

30 ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, серию разведений продолжают до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ,

далее проводят усреднение значений максимальных степеней разведения для образцов № 1...№ r , при которых достигнут нижний предел определения метода ОТ-ПЦР-РВ,

35 далее проводят расчет среднеарифметического значения максимальных степеней разведения, которое далее используется для расчета значения поправочного коэффициента m ,

определяют поправочный коэффициент m как отношение 100 к среднеарифметическому значению максимальных степеней разведения SARS-CoV-2-положительной пробы модельного образца сточных вод, содержащего экскременты

40 пациентов с COVID-19;

затем на этапе 2 проводят мониторинг заболеваемости COVID-19, для чего

определяют места отбора сточных вод и количество образцов сточных вод в зависимости от цели и объема тестируемой выборки для мониторинга заболеваемости

45 населения COVID-19,

проводят отбор образцов сточных вод,

проводят выделение РНК из образцов сточных вод с помощью коммерческих наборов для выделения РНК, использованных на этапе 1,

проводят анализ проб на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 с помощью коммерческих наборов для проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, использованных на этапе 1,

5 в случае отрицательного результата образец сточных вод признают SARS-CoV-2-отрицательным и, соответственно, уровень заболеваемости равным 0%,

в случае положительного результата образец сточных вод признают SARS-CoV-2-положительным, далее готовят серийные разведения образцов сточных вод, на каждом этапе серийного разведения образцы разводят в 2-4 раза и тестируют методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусных частиц SARS-CoV-2 при помощи коммерческих наборов для
10 экстракции РНК и проведения реакции ОТ-ПЦР-РВ, использованных на этапе 1, серию разведений готовят до достижения нижнего предела определения метода ОТ-ПЦР-РВ, определяют максимальную степень разбавления сточных вод k ,

далее проводят расчет значения N - уровня заболеваемости COVID-19 по формуле $N = k * m$, где N - уровень заболеваемости COVID-19 в %, k - максимальная степень
15 разбавления сточных вод, m – поправочный коэффициент на значение нижнего предела метода ОТ-ПЦР-РВ.

20

25

30

35

40

45

Таблица 1

Данные десяти пациентов с COVID-19, собранные за 24 ч, на 5-8 сутки после регистрации первых симптомов

Возраст пациента	День взятия пробы после регистрации первых симптомов	Симптомы	Масса фекалий, собранных за 24 ч, г	Объем мочи, собранной за 24 ч, мл	Подтверждение диагноза COVID-19
44	7	затрудненное дыхание или одышка, сухой кашель, ломота и боли, жар	200	1300	+
12	5	диарея, потеря вкуса или запаха	150	1280	+
37	7	лихорадка, сухой кашель, затрудненное дыхание или одышка, ломота и боли, потеря вкуса или запаха	220	1450	+
35	6	лихорадка, сухой кашель, затрудненное дыхание или одышка, ломота и боли, потеря вкуса или запаха	185	920	+
32	6	ломота и боли, затрудненное дыхание или одышка	150	1300	+
25	7	потеря вкуса или запаха	200	1250	+
56	8	лихорадка, затрудненное дыхание или одышка, потеря вкуса или запаха	145	1150	+
32	5	лихорадка, потеря вкуса или запаха	180	1270	+
12	7	диарея, потеря вкуса или запаха	160	800	+
40	5	лихорадка, ломота и боли, потеря вкуса или запаха	210	950	+

Фиг.1

Таблица 2

Определение нижнего предела уровня заболеваемости и поправочного коэффициента m

Номер образца	Разведение (в раз)	Соответствие уровню заболеваемости в населенном пункте, %	Количество образцов с вирусной РНК (из 10 образцов)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
-	Фекалии	-	10, от 10^6 до 10^9 копий/г
1.	Неразведенный образец – аналог модельной сточной воды от 1 человека с COVID-19 в сутки	100	10
2.	1:4	25,00	10
3.	1:16	6,25	10
4.	1:64	1,56	10
5.	1:256	0,39	10
6.	1:1024	0,10	10
7.	1:4096	0,02	10
8.	1:8192	$m = 0,01$	9
9.	1:16384	0,006	-
10.	1: 32768	0,003	-

Фиг.2

Таблица 3

Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в пробах сточных вод

Номер смотровой камеры	Количество квартир, от которых сток попадает в коллектор (кроме № 11)	Наличие РНК вируса SARS-CoV-2			
		Дата отбора 30.03.2020	Дата отбора 30.07.2020		
		Исходный образец	Исходный образец	Максимальная степень разбавления сточных вод, которое было SARS-CoV-2-положительным, 1 : k	Уровень заболеваемости COVID-19 по формуле $N=k*m, \%$
1.	48	-	-	-	-
2.	25	-	-	-	-
3.	39	-	-	-	-
4.	64	-	-	-	-
5.	91	-	-	-	-
6.	35	-	+	1:100	1.00%
7.	96	-	+	1:150	1.50%
8.	45	-	-	-	-
9.	50	-	-	-	-
10.	82	-	+	1:75	0.75%
11.	65 чел	-	+	1:150	1.50%

Фиг. 3

Таблица 4

Сравнение длительности процедуры мониторинга по прототипу и заявленному техническому решению

Этап анализа	Длительность процедуры, мин					
	50 проб		100 проб		150 проб	
	Прототип	Заявленное	Прототип	Заявленное	Прототип	Заявленное
Определение поправочного коэффициента (экстракция РНК, ОТ-ПЦР-РВ)	-	240	-	240	-	240
Концентрирование пробы*	560	-	1120	-	1680	-
Внешний контроль	5	-	10	-	15	-
Экстракция РНК	90	90	180	180	270	270
ОТ-ПЦР-РВ	120	120	150	150	180	180
Разведение положительных проб SARS-CoV-2	-	30	-	30	-	30
Экстракция РНК	-	90	-	180	-	270
ОТ-ПЦР-РВ	-	120	-	150	-	180
Итого	775	690	1460	930	2145	1170

* при наличии в лаборатории центрифуги, которая позволяет одновременно центрифугировать не менее 16 образцов

Фиг.4

Таблица 5

Сравнение стоимости анализов по прототипу и заявленному техническому решению

Этап анализа	Необходимые реактивы/ расходники	Цена, руб./шт.	Расход на 50 анализов, шт.		Стоимость на 50 анализов, руб.	
			Прототип	Заявленное	Прототип	Заявленное
1. Концентрирование пробы	Центрифужные фильтры Micron 10kDa	595,00	50	-	29750,00	-
	Центрифужные концентраторы	3523,55	50	-	176177,70	-
	Пробирки центрифужные на 15 мл	27,12	50	-	1355,94	-
	Пробирки центрифужные на 50 мл	32,25	50	-	1612,60	-
	Стандартный образец с известным количеством вирусных частиц	54823,50	1	-	54823,50	-
3. Экстракция РНК	Набор для экстракции	474,00	50	250	23700,00	118500,00
	Эппендорфы 1,5 мл	25,07	100	500	2506,96	12534,80
	Пробирки центрифужные на 50 мл	32,25	1	5	32,25	161,26
3. ОТ-ПЦР-РВ	Наконечники 200 мкл	3,06	50	250	152,76	763,80
	Наконечники 1000мкл	3,38	300	1500	1015,03	5075,16
	Набор реагентов «ПЦР-РВ-2019-nCov»	175,10	52	260	9105,42	45527,09
	Наконечники на 20мкл	3,01	52	260	156,27	781,35
Итого					300 388,43	183 343,47

Фиг.5