

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ SARS-COV-2 НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ ВО ВРЕМЕНИ

М. А. Никифорова¹✉, А. Э. Синавин^{1,2}, Е. В. Шидловская¹, Н. А. Кузнецова¹, В. А. Гушчин^{1,3}

¹ Научный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

² Институт биорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Заражение вирусом SARS-CoV-2 происходит не только при непосредственном контакте с инфицированным человеком, но и через поверхности, с которыми соприкасался больной. Вопрос сохранения инфекционного вируса, способного заразить спустя время, остается открытым. Целью исследования было изучить жизнеспособность SARS-CoV-2 на различных модельных поверхностях с течением времени. В качестве модельных материалов были использованы керамическая плитка, металл (алюминиевая фольга), дерево (ДСП), пластик и ткань (полотенце). В ходе исследования проводили оценку наличия РНК SARS-CoV-2 методом количественной ОТ-ПЦР. Жизнеспособность вируса определяли на клеточной линии 293T/ACE2. Показано, что РНК SARS-CoV-2 продолжала детектироваться спустя 360 мин, но значительное снижение РНК на $1 \log_{10}$ копий/мл обнаружено после контакта вируса с тканью (полотенцем). Жизнеспособный вирус практически полностью отсутствовал через 120 мин. На жизнеспособность вируса значительно влияет тип экспериментальной поверхности.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, жизнеспособность, поверхность, ПЦР

Финансирование: данное исследование было финансировано Министерством здравоохранения РФ в рамках государственного задания #056-00119-21-00

Благодарности: авторы выражают благодарность И. В. Коробко за идею и обсуждение дизайна исследования.

Вклад авторов: М. А. Никифорова — планирование эксперимента, работа с вирусом и определение его жизнеспособности, анализ данных, написание текста; А. Э. Синавин — работа с вирусом и определение его жизнеспособности, анализ данных, написание текста; Е. В. Шидловская — ПЦР-анализ, обработка данных, написание текста; Н. А. Кузнецова — ПЦР-анализ; В. А. Гушчин — планирование эксперимента, написание текста.

✉ **Для корреспонденции:** Мария Андреевна Никифорова
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; marianikiforova@inbox.ru

Статья получена: 25.06.2021 **Статья принята к печати:** 09.07.2021 **Опубликована онлайн:** 13.07.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.033

EVALUATION OF SARS-COV-2 VIABILITY ON EXPERIMENTAL SURFACES OVER TIME

Nikiforova MA¹✉, Siniavin AE^{1,2}, Shidlovskaya EV¹, Kuznetsova NA¹, Gushchin VA^{1,3}

¹ Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Infected SARS-CoV-2 virus occurs not only through contact with an infected person, but also through surfaces with which the illness has contacted. The problem of preserving an infectious virus over time capable of infecting remains actual. We evaluated the SARS-CoV-2 viability preservation on different model surfaces over time. Ceramic tiles, metal (aluminum foil), wood (chipboard), plastic and cloth (towel) were used as model materials. Assessment of the presence of SARS-CoV-2 RNA was carried out by quantitative RT-PCR. Viable virus was determined by tissue culture assay on 293T/ACE2 cells. It was found that the SARS-CoV-2 RNA was detected on all studied surfaces for 360 minutes, but a significant decrease RNA by $1 \log_{10}$ copies/ml was detected after contact of the virus with cloth (towel). While the viability of the virus was completely lost after 120 minutes. Type of experimental surface significantly affects viability preservation.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, viability, surface, PCR

Funding: this research was funded by the grant #056 - 00119 - 21-00 provided by the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.

Acknowledgments: the authors are grateful to Dr. I.V. Korobko for the general idea and discussion of the study design.

Author contribution: Nikiforova MA — experiment planning, working with the virus and determining SARS-CoV-2 viability, data analyzing, writing-original draft preparation; Siniavin AE — working with the virus and determining SARS-CoV-2 viability, data analysing, writing-original draft preparation; Shidlovskaya EV — PCR-analysis, data processing, writing-original draft preparation; Kuznetsova NA — PCR-analysis; Gushchin VA — experiment planning, writing-original draft preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria A. Nikiforova
Gamaleya, 18, Moscow, 123098; marianikiforova@inbox.ru

Received: 25.06.2021 **Accepted:** 09.07.2021 **Published online:** 13.07.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.033

Предполагается, что поверхности окружающей среды заражены SARS-CoV-2 и являются возможными источниками передачи COVID-19 [1]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) установила, что все еще недостаточно научных доказательств жизнеспособности SARS-CoV-2 на инертных поверхностях. Научные данные, касающиеся жизнеспособности SARS-CoV-2 на поверхностях, подтверждают, что вирус может оставаться на разных поверхностях, от нескольких часов до нескольких дней. Например, SARS-CoV-2 стабилен на стекле, нержавеющей стали, картоне и меди в течение 84,

72, 24 и 4 ч соответственно [2]. Однако это не означает, что сама поверхность опасна и при контакте с ней можно заразиться [3, 4]. В то же время показано, что SARS-CoV-2 передается между людьми при прикосновении к поверхностям, с которыми недавно контактировали больные COVID-19 (кашель или чихание), а затем касались рта, носа и глаз [5, 6].

Другие данные показывают, что после трехчасовой инкубации инфекционный вирус не детектируется на бумаге для печати, салфетках и на обработанном дереве и на ткани спустя день. Напротив, SARS-CoV-2

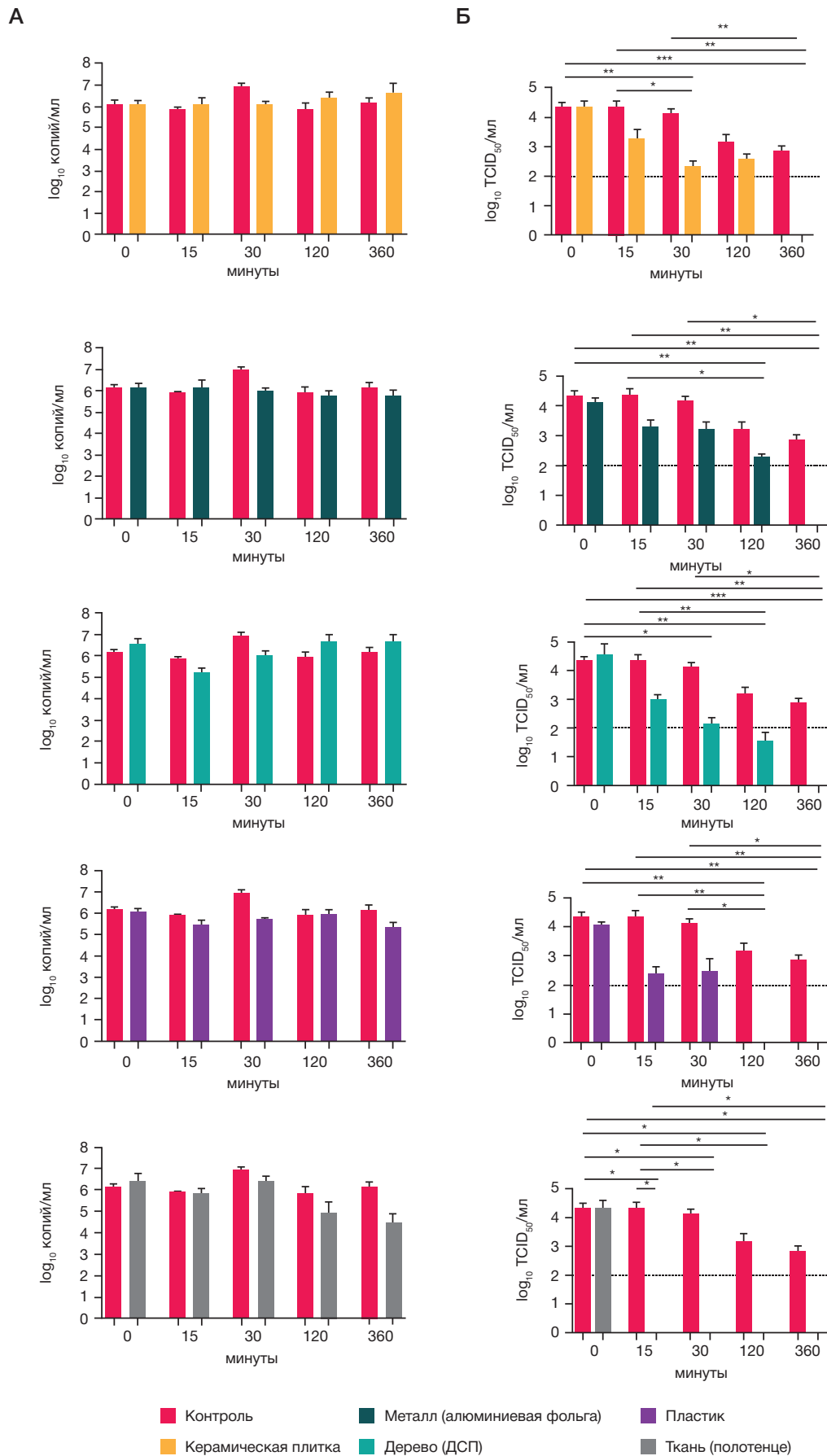


Рис. 1. Стабильность SARS-CoV-2 на модельных поверхностях в различных условиях. На перечисленные экспериментальные поверхности был нанесен SARS-CoV-2 (титр $0,4 \times 10^5$ TCID₅₀/мл) и инкубирован при комнатной температуре. В указанные временные точки вирус элюировали, резидуальный вирус детектировали с помощью (А) количественной ОТ-ПЦР, (Б) жизнеспособность вируса определяли титрованием на культуре клеток 293Т / ACE2

был более устойчивым на гладких поверхностях. Так, 39 неинфекционных образцов были позитивными, т. е. неинфекционные вирусы все еще могут быть обнаружены [7]. Целью работы было сравнить с помощью ОТ-ПЦР и культуры клеток жизнеспособность вируса на поверхностях, которые наиболее распространены вокруг нас и могут представлять риск с точки зрения передачи SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование сохранения жизнеспособности SARS-CoV-2 при контакте с пятью экспериментальными поверхностями проводили в контролируемых экспериментальных условиях при относительной влажности 55–60% и температуре 22–24 °С. Использовали наиболее распространенные материалы, включая керамическую плитку, металл (алюминиевая фольга), дерево (ДСП), пластик и ткань (полотенце). Для работы использовали штамм SARS-CoV-2 PMVL-3 (GISAID: EPI_ISL_470897), выделенный из назофарингиального мазка и размноженный в культуре клеток Vero E6 (ATCC CRL-1586). 15 мкл вирусосодержащей жидкости с титром $0,4 \times 10^5$ TCID₅₀/мл наносили на экспериментальные поверхности (площадью 1,5–2 см²) каждого материала в пяти повторах. Группы образцов и вирусных контролей инкубировали 0, 15 и 30 мин (влажные поверхности) или 120 и 360 мин (высушенные при комнатной температуре). После воздействия вируса его элюировали с экспериментальных поверхностей в объеме 200 мкл PBS. Наличие РНК вируса SARS-CoV-2 оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР. Жизнеспособный вирус определяли в культуре клеток 293T/ACE2, титр вируса рассчитывали по методу Рида–Менча. Данные обрабатывали в программе GraphPadPrism 7 и анализировали с помощью теста ANOVA, критерия Краскела–Уоллиса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе экспериментов РНК SARS-CoV-2 была обнаружена на всех экспериментальных поверхностях. Значительное снижение РНК SARS-CoV-2 (на $0,5 \log_{10}$ копий/мл) было выявлено при контакте вируса с деревом (ДСП) в течение 15 мин, а также на $1 \log_{10}$ копий/мл РНК SARS-CoV-2 при контакте с металлом и пластиком через 15 и 30 мин соответственно. Однако во всех элюатах, полученных с экспериментальных материалов с экспозицией 120 и 360 мин, РНК SARS-CoV-2 детектировалась на высоком уровне (рис. 1А). Существенное снижение РНК SARS-CoV-2 до $1 \log_{10}$ копий/мл было отмечено в образцах ткани (полотенце) спустя 6 ч. В целом количество РНК SARS-CoV-2 было стабильно высоким на всех видах поверхностей и не отличалось от контроля (образцы, не контактировавшие с материалом). Определение инфекционности SARS-CoV-2 на клеточной линии 293T/ACE2 после контакта с модельными материалами показало резкое снижение жизнеспособности вируса через 120 мин (рис. 1Б). Титр

вируса постепенно снижается в зависимости от материала: керамическая плитка → металл → дерево (ДСП) → пластик → ткань (полотенце). После 120 мин экспозиции вируса на таких материалах, как пластик и ткань, жизнеспособный вирус не был обнаружен, хотя РНК SARS-CoV-2 все еще присутствовала. При оценке инфекционности вируса после контакта с модельными материалами было показано, что РНК SARS-CoV-2 выявляется на всех экспериментальных поверхностях, независимо от условий и времени. Даже через 360 мин количество вируса на поверхности, измеренное с помощью количественной ОТ-ПЦР, изменяется незначительно (в пределах порядка). Однако детекция РНК SARS-CoV-2 не указывает на наличие жизнеспособного вируса. Наиболее значительное снижение патогенности вируса было выявлено при контакте с образцами ткани (полотенце), а также пластика, более длительное сохранение инфекционного вируса наблюдали на таких поверхностях, как металл, дерево (ДСП) и керамическая плитка. Снижение инфекционности SARS-CoV-2 происходит через 120 мин после контакта с модельной поверхностью и полностью теряется в течение 360 мин, когда происходит высыхание. Можно предположить, что полная потеря жизнеспособности вируса будет происходить в течение 120–360 мин для всех материалов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа имеет ряд недостатков. Мы использовали культуральную жидкость для моделирования контаминации вирусом. Ее состав существенно отличается от среды, образующейся в результате естественного контакта человека с поверхностями. Кроме того, сам метод выделения жизнеспособного вируса с использованием культуры клеток может значительно отличаться по восприимчивости к инфекции [8, 9]. Отдельные штаммы вируса, персистирующего в организме конкретного человека, генетически разнородны и могут различаться по своей способности сохраняться на поверхности. Тем не менее принимая эти ограничения, результаты могут быть полезны при планировании дальнейших исследований и разработке практических рекомендаций.

ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в рамках этой работы, показывают, что положительные данные ОТ-ПЦР еще не позволяют говорить о жизнеспособности вируса. В течение как минимум 360 мин количество РНК SARS-CoV-2 на поверхности практически не меняется, при этом жизнеспособность вируса падает на несколько порядков за 120 мин, а через 360 мин он не детектируется ни на одной из экспериментальных поверхностей. Таким образом, в контексте экологической безопасности использование ОТ-ПЦР может привести к сильно искаженным выводам. Интерпретацию результатов ОТ-ПЦР в отношении потенциального загрязнения поверхности SARS-CoV-2 необходимо проводить с большой осторожностью.

Литература

- Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 Virus by Droplets and Aerosols: A Critical Review on the Unresolved Dichotomy. *Environ Res.* 2020; 188: 109819.
- van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020; 382: 1564–7.
- Fernández-Raga M, Díaz-Marugán L, García Escolano M, Bort C, Fanjul V. SARS-CoV-2 Viability under Different Meteorological Conditions, Surfaces, Fluids and Transmission between Animals. *Environ Res.* 2021; 192: 110293.
- Xue X, Ball JK, Alexander C, Alexander MR. All Surfaces Are Not Equal in Contact Transmission of SARS-CoV-2. *Matter.* 2020; 3: 1433–41.
- Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China. 2020; *Emerg Infect Dis.* 2020; 26: 1343–5.
- Xie C, Zhao H, Li K, Zhang Z, Lu X, Peng H, et al. The Evidence of Indirect Transmission of SARS-CoV-2 Reported in Guangzhou, China. *BMC Public Health.* 2020; 20: 1202.
- Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen H-L, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. *Lancet Microbe.* 2020; 1: e10.
- Yao H, Lu X, Chen Q, Xu K, Chen Y, Cheng M, et al. Patient-Derived SARS-CoV-2 Mutations Impact Viral Replication Dynamics and Infectivity in Vitro and with Clinical Implications in Vivo. *Cell Discov.* 2020; 6: 76.
- Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, Transmission, and Pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ.* 2020; 371: m3862.

References

- Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 Virus by Droplets and Aerosols: A Critical Review on the Unresolved Dichotomy. *Environ Res.* 2020; 188: 109819.
- van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020; 382: 1564–7.
- Fernández-Raga M, Díaz-Marugán L, García Escolano M, Bort C, Fanjul V. SARS-CoV-2 Viability under Different Meteorological Conditions, Surfaces, Fluids and Transmission between Animals. *Environ Res.* 2021; 192: 110293.
- Xue X, Ball JK, Alexander C, Alexander MR. All Surfaces Are Not Equal in Contact Transmission of SARS-CoV-2. *Matter.* 2020; 3: 1433–41.
- Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China. 2020; *Emerg Infect Dis.* 2020; 26: 1343–5.
- Xie C, Zhao H, Li K, Zhang Z, Lu X, Peng H, et al. The Evidence of Indirect Transmission of SARS-CoV-2 Reported in Guangzhou, China. *BMC Public Health.* 2020; 20: 1202.
- Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen H-L, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. *Lancet Microbe.* 2020; 1: e10.
- Yao H, Lu X, Chen Q, Xu K, Chen Y, Cheng M, et al. Patient-Derived SARS-CoV-2 Mutations Impact Viral Replication Dynamics and Infectivity in Vitro and with Clinical Implications in Vivo. *Cell Discov.* 2020; 6: 76.
- Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, Transmission, and Pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ.* 2020; 371: m3862.