

Золин В.В., Оськина О.П., Солодкий В.В., Гаврилова Е.В., Агафонов А.П., Максюттов Р.А.

Изучение жизнеспособности вируса SARS-CoV-2 в питьевой и морской воде

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Российская Федерация, р.п. Кольцово

В статье приводятся данные о сроках сохранения инфекционной активности коронавируса SARS-CoV-2 в образцах дехлорированной питьевой воды при температуре 24-28 °С и + 4 °С в течение 1, 3, 24, 48, 72 часов, а также в образцах имитирующих морскую воду, с концентрацией солей по хлориду натрия 0,9 % и 3,5 % при температуре 24-28 °С в течение 1, 3, 24, 48 часов.

Пути передачи коронавирусной инфекции схожи с путями передачи для других респираторных инфекций, среди которых наиболее распространенным является воздушно-капельный путь. Однако коронавирусную инфекцию отличает чрезвычайно быстрое распространение в человеческой популяции, что обуславливает необходимость исследования альтернативных путей заражения данной инфекцией. Одним из потенциальных источников инфекции может стать зараженная вода. Ранее такой путь передачи был зарегистрирован для близкородственного коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром – SARS. В 2003 году в Гонконге одновременно были инфицированы 320 человек, при эпидемиологическом расследовании было выявлено, что вероятным источником инфекции была водопроводная вода. Очевидно, что если окружающая среда, в данном случае вода, окажется благоприятной для сохранения инфекционного агента SARS-CoV-2, она будет представлять опасность для человека.

Целью исследований было определение динамики (1, 3, 24, 48, 72 ч) остаточной инфекционной активности вируса SARS-CoV-2 в образцах питьевой дехлорированной воды и образцах имитирующих морскую воду, с концентрацией солей по хлориду натрия 0,9 % и 3,5 % при нормальных условиях температуры (24-28 °С).

Материалы и методы:

Объект исследований: Исследование проводили с использованием коронавируса SARS-CoV-2 штамм «Виктория», исходный титр $6,75 \pm 0,5 \lg \text{ЦПД}_{50} / \text{мл}$. Вирус добавляли в образцы питьевой дехлорированной и морской воды в пропорции 1:10 с концентрацией солей в морской воде по хлориду натрия 0,9% («ЛинАква») и 3,5% (раствор морской соли). Образцы воды с вирусом выдерживали при комнатной температуре 24-28 °С, динамику инактивации изучали в течение 3-х суток, отбирая пробы через 1, 3, 24, 48, 72 часов.

Культура клеток: В работе использовали культуру клеток африканской зелёной мартышки Vero (E-6) в виде 2-х суточного монослоя с конфлюентностью 100%, выращенную в 96-луночных культуральных планшетах.

Положительный контрольный образец (К+): Вирусная суспензия SARS-CoV-2.

Отрицательным контрольным образцом (К-) служили лунки планшета со средой Игла MEM (Биолот) с добавлением эмбриональной сыворотки КРС (Gibco) до 2 % и антибиотиков 100 ЕД/мл (Gibco) без добавления вируса.

Культуральная среда: ростовая – Игла MEM (Биолот) с добавлением эмбриональной сыворотки КРС (Gibco) до 10 % и антибиотика гентамицин 100 ЕД/мл (Gibco), поддерживающая – Игла MEM (Биолот) с добавлением эмбриональной сыворотки КРС (Gibco) до 2 % и антибиотика гентамицин 100 ЕД/мл (Gibco).

Краситель: 0,2%-ный раствор генциана фиолетового (1г. генциана фиолетового, 100 мл 96%-го этилового спирта, 100 мл 40%-го формалина, 300 мл раствора Хенкса).

Проведение исследования:

1-й этап. Подготовка разведений. Вирусную суспензию SARS-CoV-2 смешивали с образцами воды в соотношении 1:10. После экспозиции в течение 1, 3, 24, 48, 72 часов при температуре 24-28 °С отобранные пробы воды с вирусом SARS-CoV-2 титровали, готовя последовательные 10-кратные разведения (с -1 по -5) в поддерживающей среде Игла MEM.

Положительный контрольный образец (К+) титровали, готовя последовательные 10-кратные разведения (с -1 по -6) в поддерживающей среде Игла MEM.

2-й этап (инфицирование культуры клеток). Образцы вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов, содержащих монослой культуры клеток в объеме 0,1 мл, каждый образец титровали в 8-12 повторах. В 8 лунок вносили по 0,1 мл среды Игла MEM с антибиотиками (контроль клеточного монослоя). Инфицированные культуральные планшеты оставляли для экспозиции при 24 °С на 60 минут, затем в каждую лунку вносили по 0,1 мл поддерживающей среды Игла MEM.

Культуральные планшеты помещали в термостат при 37 °С, учет результатов проводили на 5-е сут после заражения.

Регистрация результатов: на 5-е сутки после инфицирования в каждую лунку культурального планшета вносили раствор красителя в объеме 0,1 мл, предварительно удаляя поддерживающую среду, через 24 часа планшет промывали и визуально проводили учет цитопатического действия вируса.

Концентрацию вируса подсчитывали по формуле Спирмана-Кербера: $\lg \text{ЦПД}_{50} = \lg \text{DN} - \delta (\sum \text{Li} - 0,5)$.

Результаты лабораторных исследований представлены в таблицах 1, 2 и на рисунках 1, 2.

Таблица 1. Жизнеспособность вируса SARS-CoV-2 в образцах, имитирующих морскую воду при температуре 24-28 °С на 1-, 3-, 24- и 48-й час после отбора проб

Образцы воды	Титр остаточной инфекционной активности вируса SARS-CoV-2 (ЦПД ₅₀ /мл)/ время отбора проб (ч)					
	Контроль вируса (К+)	1 ч	3 ч	24 ч	48 ч	Контроль клеток (К-)
Вода с содержанием солей 0,9 %	5,8±0,5	5,4±0,5	5,0±0,5	4,0±0,5	3,1±0,5	0
Вода с содержанием солей 3,5 %	5,8±0,5	5,3±0,5	4,9±0,5	3,5±0,5	2,5±0,5	0

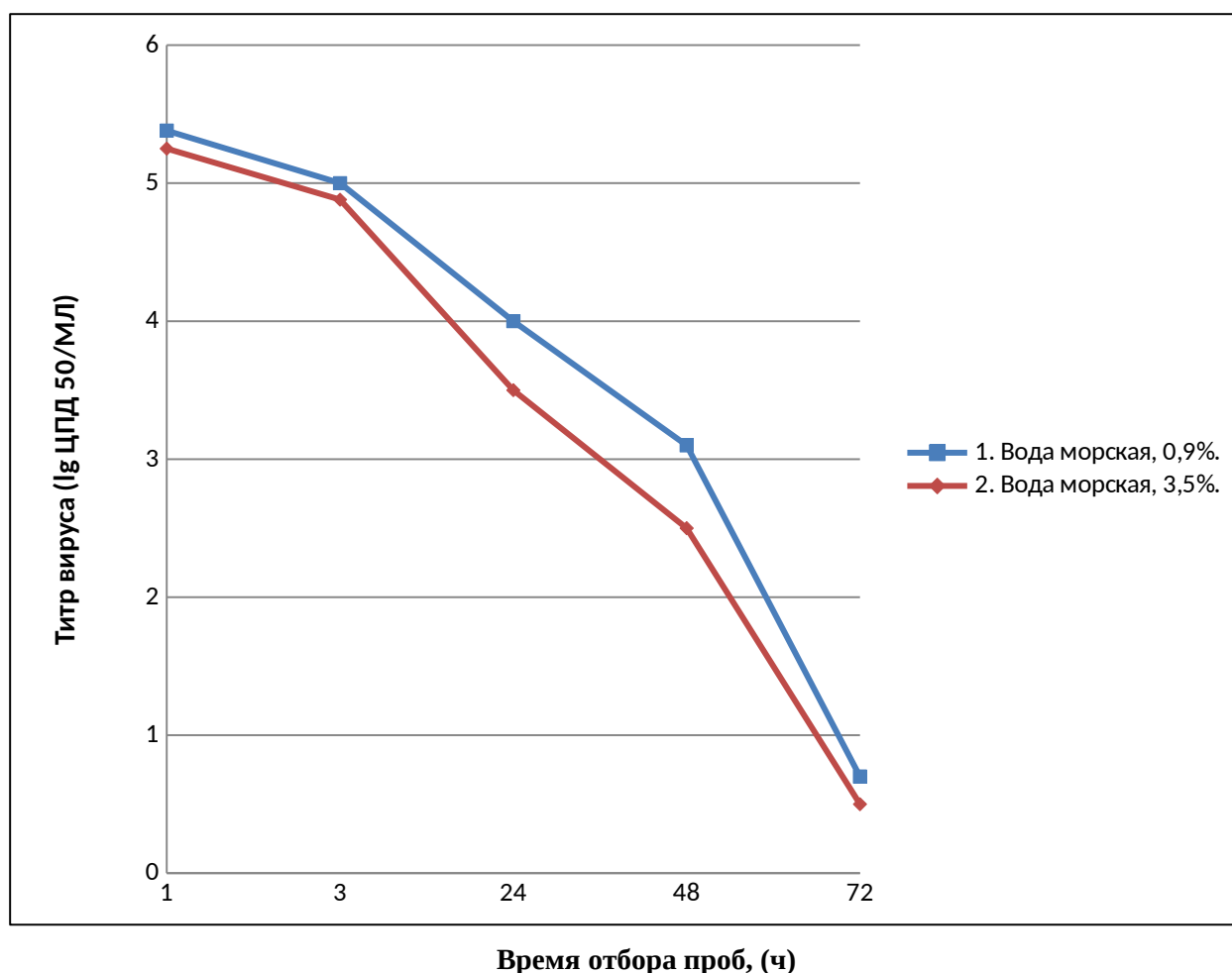


Рисунок 1. Жизнеспособность вируса SARS-CoV-2 в образцах, имитирующих морскую воду и хранившихся при температуре 24-28 °С на 1-, 3-, 24- и 48-й час после отбора проб с экстраполяцией на 72 часа

Как следует из данных, представленных в таблице 1 и на рисунке 1 коронавирус SARS-CoV-2 штамм «Виктория» сохраняет жизнеспособность в морской воде в течение, как минимум, 48 часов, независимо от ее солёности. За 2 сут вирус инактивируется на 2,65-3,25 lg при исходной концентрации – 5,75±0,5 lg ЦПД₅₀/мл в условиях температуры, равной 24-28 °С. Если допустить экстраполяцию полученных данных на более длительный период наблюдения можно предположить, что жизнеспособность коронавируса SARS-CoV-2 будет сохраняться в морской воде не менее 72 часов.

Таблица 2. Результаты сравнительной оценки длительности сохранения инфекционной активности коронавируса SARS-CoV-2 в дехлорированной питьевой воде при температурах 24-28 °С и +4 °С течение 1, 3, 24, 48, 72 часов

Температура хранения образца, °С	Титр остаточной инфекционной активности вируса SARS-CoV-2 в дехлорированной питьевой воде (ЦПД ₅₀ /мл)/ время отбора проб (ч)					Контроль клеток (К-)
	1 ч	3 ч	24 ч	48 ч	72 ч	
24-28 °С	6,0 ±0,25	5,7±0,25	5,1±0,25	3,8±0,25	2,4±0,25	0
4 °С	6,0±0,25	6,0±0,25	5,7±0,25	5,2±0,25	4,9±0,25	0

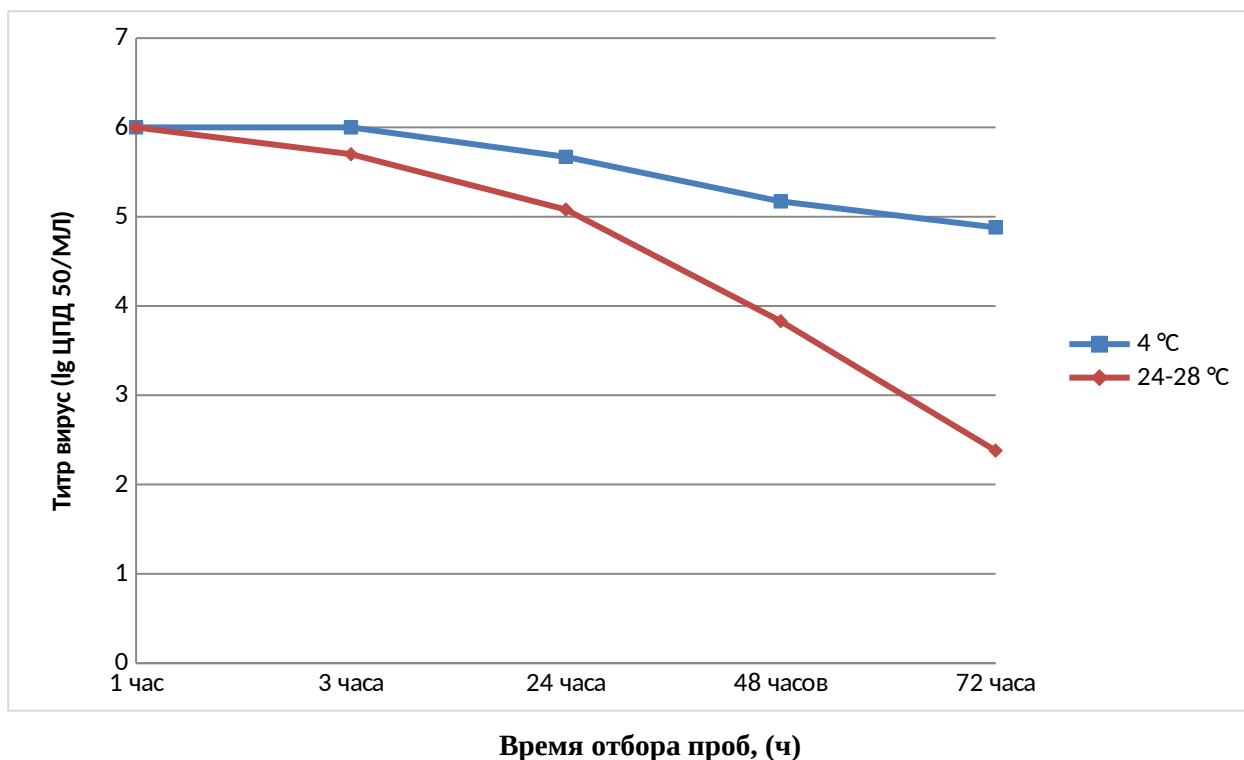


Рисунок 2. Жизнеспособность вируса SARS-CoV-2 в питьевой дехлорированной воде при температуре + 24-28 °С и + 4 °С в течение 1, 3, 24, 48, 72 часов.

Как свидетельствуют результаты исследований, представленные в таблице 2 и на рисунке 2, коронавирус SARS-CoV-2 сохраняет остаточную инфекционную активность в дехлорированной питьевой воде в течение 72 часов, при этом степень сохранности зависит от температуры воды.

Таким образом, исследования показали, что коронавирус SARS-CoV-2 способен сохранять свою инфекционную активность, как в пресной, так и морской воде, независимо от ее солености, на протяжении как минимум 72 часов, причем степень сохранности остаточной инфекционной активности вируса зависит от температуры воды.