

ЧУТЛИВІСТЬ КОРОНАВІРУСУ СВИНЕЙ ДО ДІЇ РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР

З. С. Клестова, д-р вет. наук, професор

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна

Коронавірусним інфекціям приділяється в теперішній час значна увага, із-за виникнення в світі пандемії ковід-19. Інтенсивно ведеться пошук моделей, з якими можна отримати адекватний результат з виявлення властивостей коронавірусів. Для порівняння з результатами наших експериментів, у статті також наведені дані щодо тривалості збереження інфекційних властивостей вірусу SARS-Cov-2 за контамінації ним поверхонь, вироблених з різних матеріалів та за дії різних температур.

Нами досліджено тривалий вплив на коронавірус, збудник трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС), ряду температур: +4 °С, +25 °С, мінус 13 °С, мінус 20 °С та 13-разової зміни температурного режиму, що становив діапазон у 31-33 °С. Виявлено, що і вакцинні, і епізоотичні штами коронавірусу ТГС після тривалого зберігання знижують інфекційні властивості, але, при потраплянні до чутливої біологічної системи (in vitro), досить швидко (в разі послідовних пасажів у цій системі) їх відновлюють. Нами доведено, що коронавірус ТГС за зберігання, більше, ніж двох років знижував, але не втрачав інфекційні властивості при температурах мінус 13°С, мінус 20°С, які відновлювались при подальшому пасажуванні в чутливій біологічній системі in vitro. Така ж тенденція спостерігалась і за зберігання вірусу протягом 8 років за температури +4 °С. Найбільш швидко зниження титру коронавірусу відбувалось за температури +25 °С, але більш стійким за цих умов виявився епізоотичний штам вірусу, що потребує уваги при роботі з польовими ізолятами коронавірусу.

Встановлена загальна тенденція коронавірусів тварин і людини до зменшення терміну виживання патогену за підвищення температури впливу. Виявлена стійкість вірусу до багаторазових різких змін температур (від мінус 13 ± 0,5 °С до кімнатної температури) без втрати інфекційних властивостей.

Ключові слова: КОРОНАВІРУС, ТЕМПЕРАТУРА, ІНФЕКЦІЙНА АКТИВНІСТЬ.

SENSITIVITY OF SWINE CORONAVIRUS TO ACTION OF DIFFERENT TEMPERATURES

Z. S. Klestova

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine

Coronavirus infections are currently receiving a lot of attention due to the emergence of the covid-19 pandemic in the world. The search for models with which it is possible to obtain an adequate result to identify the properties of coronaviruses is intensive. For comparison with the results of our experiments, the article also presents data on the duration of preservation of the infectious properties of the SARS-Cov-2 virus by contamination of surfaces made of different materials and at different temperatures.

We studied the long-term effect on coronavirus, the causative agent of transmissible swine gastroenteritis (TGE), a number of temperatures: +4°C, +25°C, minus 13°C, minus 20°C and thirteen-fold change in temperature, which was in the range of 31-33°C. It was found that both vaccine and epizootic strains of TGE coronavirus after long-term storage reduce the infectious properties, but when in contact with a sensitive biological system (*in vitro*) quickly enough (in the case of successive passages in this system) restore them. We proved that the TGE coronavirus during storage for more than two years reduced, but did not lose infectious properties at temperatures minus 13°C, minus 20°C, which were restored during subsequent passage in sensitive biological systems *in vitro*. The same trend was observed for storage of the virus for 8 years at a temperature of +4°C. The fastest decrease in coronavirus titer occurred at a temperature of +25°C, but more stable under these conditions was the epizootic strain of the virus, which requires attention when working with field isolates of coronavirus.

The general tendency of animal and human coronaviruses to decrease the survival time of the pathogen with increasing exposure temperature has been established. Resistance of the virus to repeated sharp changes in temperature (from minus 13 ± 0.5°C to room temperature) without loss of infectious properties was revealed.

Keywords: CORONAVIRUS, TEMPERATURE, INFECTIOUS ACTIVITY.

Коронавірусні інфекції широко розповсюджені в світі серед людей і тварин (в тому числі і серед птиці). Одні з них викликають масову загибель чутливих організмів та призводять до значних економічних збитків, що спостерігалось серед тварин (інфекційний бронхіт курей, трансмісивний гастроентерит свиней, епізоотична діарея свиней тощо). Інші – не вважались небезпечними і тому не дуже досліджувались (гострі респіраторні хвороби людей). Причому, у тварин виявили більшу чутливість до коронавірусу у молодняку, наприклад, тяжкі смертельні гастроентерити і енцефаломієліти відмічались тільки у поросят (за вірусного інфекційного гастроентериту і гемаглютинуючого енцефаломієліту свиней), діарея із летальним кінцем спостерігалась у новонароджених телят (при коронавірусній діарей новонароджених телят), тяжкі бронхіти – тільки у курчат (при інфекційному бронхіті курей). У дорослих тварин ті ж види інфекції перебігають у стертій формі або ж латентно (Tashuta, 2013).

Підвищений інтерес до коронавірусних інфекцій збільшився, починаючи з появи нової хвороби серед людей, викликаной так званим коронавірусом Урбані, вірусом “атипової пневмонії” (SARS-Severe Acute Respiratory Syndrome) у 2002-2003 рр. Для з’ясування причин виникнення, а також виявлення антигенної спорідненості вірусу SARS з іншими представниками родини, були активовані дослідження з іншими коронавірусами. У складі родини *Coronaviridae* знаходяться подібні, але не ідентичні між собою віруси. Вони складні за антигенною структурою. Антигенна гетерогенність зумовлює високу частоту реінфекцій іншими серологічними варіантами.

До 60-х років минулого сторіччя коронавірус вважався «пташиним» респіраторним вірусом, а також з відкриттям у 1946 р. Дойлем і Хатчігсом вірусу трансмісивного гастроентериту – ще і патогеном свиней, «кишковим» вірусом.

Незважаючи на вивчення біологічних властивостей коронавірусів, особливий бум досліджень почався з поширенням вірусу SARS-Cov-2 за пандемії 2020/2021 рр.. Людство втрачає значну частину населення, що вимірюється мільйонами смертей у світі. І питання щодо виживання збудника, за різних впливів навколишнього середовища, зараз стає як ніколи раніше актуальним.

Серед факторів, які цікавлять дослідників – вплив різних температур на інфекційні властивості коронавірусів та проміжок часу, за якого вони залишаються здатними проявляти патогенні властивості. Цікаві дослідження австралійських вчених (Riddell et al., 2020). Вони вивчали екологічну стабільність вірусу SARS-CoV-2 для визначення ризиків його передачі із

різних забруднених ним поверхонь предметів, що досліджувалось при підборі ефективних дезінфектантів. Було проведено дослідження з використанням декількох типових поверхонь, на які був нанесений вірус, за дії на поверхні різних температур (20 °C, 30 °C і 40 °C) та різних проміжків часу. Виявили, що за 20 °C періоди виявлення інфекційного вірусу становили від 1,7 до 2,7 днів. Цей час зменшився до декількох годин виживання вірусу, за підвищення температури до 40 °C. При початкових вірусних навантаженнях (які в основному еквівалентні найвищим показникам титру вірусу, що виявляють у хворих на COVID -19) інфекційний вірус спостерігали протягом 28 днів за температури 20 °C на таких поверхнях, як скло, нержавіюча сталь, а також на паперових та полімерних банкнотах. І навпаки, інфекційний вірус виживав менше 24 годин за температури 40 °C на деяких поверхнях.

Ці результати демонструють, що вірус SARS-CoV-2 може залишатися інфекційним протягом значно довших періодів часу, ніж досі вважалось можливим. Ці результати мають бути використані для вдосконалення процедур зменшення ризику при запобіганні розповсюдженню COVID-19 через забруднені вірусом поверхні предметів. Роль таких предметів у поточній пандемії ще не визначена до кінця, хоча припускали, що вони можуть грати свою роль у потенційному способі передачі вірусу (Cai et al., 2020). В цілому було показано, що коронавірус легко передається через забруднену шкіру та поверхні контамінованих ним предметів (Julian et al., 2010) (сенсорні екрани на мобільних телефонах, банківські банкомати, кіоски реєстрації в аеропортах та кіоски самообслуговування у супермаркетах) (Rolfe & Nitti, 2016).

Таким чином, завдяки високій стійкості вірусу SARS-CoV-2, є можливість його переносу/передачі через поверхні контамінованих предметів навколишнього середовища. В даний час існують суперечливі повідомлення про термін виживання вірусу SARS-CoV-2, що коливається від 3 до 14 днів за кімнатної температури, для поверхонь предметів, зроблених з нержавіючої сталі (Kasloff et al., 2020; Van Doremalen et al., 2020). Австралійські вчені використали для досліджень австралійські полімерні банкноти, не монетизовані паперові банкноти та загальні поверхні, включаючи матову нержавіючу сталь, скло, вініл та бавовняну тканину. Скло було обрано через його поширеність у громадських місцях, включаючи лікарні, зали очікування, вікна громадського транспорту та торгових центрів, через їх великі контактні поверхні, а також за використання на екранах мобільних телефонів, банкоматів та кас самообслуговування. Вініл – це звичайний матеріал, субстрат, який використовується в соціальних закладах, на столах, підлозі, ручках у громадському транспорті, а також як захисний матеріал для екрану мобільного телефона. Бавовна була обрана як пористий субстрат, який часто використовують в одязі, постільній білизні та інших побутових тканинах.

Довели, що за 20 °C інфекційний вірус SARS-CoV-2 все ще можна було виявити через 28 днів після контамінації ним на всіх непористих поверхнях (скло, полімерна банкнота, нержавіюча сталь, вініл та паперові нотатки). Тривалість виявлення вірусу на пористих матеріалах (бавовняні тканини) була меншою, порівняно з більшістю непористих поверхонь, без відновлення його інфекційних властивостей, що становило максимум 14 днів після інфікування. Значне зменшення кількості вірусу на бавовняній тканині відбувалось швидко після нанесення вірусу, що свідчило про негайний ефект його адсорбції. Тому, для різних поверхонь за 20 °C виживання вірусу коливалось від 5,5 днів для бавовни до 9,1 дня – для паперових купюр.

При дослідженні впливу на інфекційний вірус температури 30 °C виявили, що він міг відновити інфекційні властивості протягом 7 днів при виділенні з поверхонь, зроблених з нержавіючої сталі, скла, з полімерних банкнот, і протягом 3 днів – з вінілових поверхонь та бавовняної тканини. На паперових нотатках – інфекційний вірус був виявлений протягом 21 дня, хоча на деяких журналах вірус виявляли як протягом 14 днів, так і через 21 день. Для інших поверхонь за 30 °C цей термін коливався від 1,4 дня (для вінілу) до 4,9 дня (для паперових купюр). За температури у 40 °C інфекційність вірусу зменшувалась порівняно з

тестуваннями при 20 °С та 30 °С. Інфекційний вірус SARS-CoV-2 не виявили протягом 24 годин при застосуванні бавовняної тканини і протягом 48 годин для всіх інших поверхонь, що випробовувались. Зниження інфекційного титру вірусу на всіх поверхнях починалось через 4 години і сягало 99,99 % від початкового титру за температури 40 °С через 24-48 год. Так, для полімерних банкнот цей час становив приблизно 5 год. за 40 °С, а для вінілових поверхонь – 10,5 год.

Таким чином, австралійські вчені довели, що у той час, як здавалось раніше, що первинне поширення вірусу SARS-CoV-2 здійснювалось через аерозолі та через краплі, які виділяються із видихом людини, то предмети та поверхні, контаміновані коронавірусом, також можуть бути важливим чинником у передачі вірусу. І стійкість вірусу SARS-CoV-2 на склі та вінілі (на обох поширених матеріалах, що застосовують для екранів) дозволяє припустити, що сенсорні пристрої можуть бути потенціальним джерелом передачі вірусу. Тому їх слід регулярно дезінфікувати, особливо в громадських місцях. Слід брати до уваги той факт, що інфекційні властивості вірус SARS-CoV-2 може відновити принаймні через 28 днів за температури навколишнього середовища 20 °С та 50 % вологості. Збільшення температури при підтриманні тієї ж вологості знижує виживання вірусу до 24 годин за 40 °С, що важливо враховувати для секторів охорони здоров'я та громадського транспорту.

Метою наших досліджень було визначити тривалість періоду інфекційності коронавірусу (збудника трансмісивного гастроентериту свиней) за дії різних температур.

Незважаючи на те, що результати буди отримані у 80-ті роки 20 століття, вони як ніколи, стають актуальними за пандемії COVID-19, бо тривали дослідження довгий час, що у нинішній пандемічній ситуації поки що не є можливим. А отриманий досвід з іншими представниками родини *Coronaviridae* не можна ігнорувати. За відсутності належних умов лабораторної біобезпеки для роботи із вірусом SARS-CoV-2 багато досліджень у світі проводять на модельних, апатогенних для людини коронавірусах, в тому числі і на коронавірусах тварин. Одним з яких і є коронавірус трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС), використаний нами в дослідженнях як вакцинні варіанти, так і польові ізоляти вірусу, виділені під час спалахів ТГС.

Матеріали і методи. Для досягнення мети нами досліджено вплив різних температур на інфекційні властивості коронавірусу за зберігання при +4 °С; +25 °С; мінус 13 °С; мінус 20 °С та за змін температурного режиму від мінус 13 °С до +18,+20 °С. Вірус у вигляді вірусотримуючої культуральної рідини, та ліофілізат, з попередньо визначеним титром інфекційної активності (вираженої у lg БОЕ/см³), обрахованої за методикою Ріда та Менча, за титрування методом бляшкоутворення під агаровим покриттям (з 1 % агару Діфко, США). Штами коронавірусу ТГС: вакцинний штам «Рімс», вакцинний штам вірусу «М-42», епізоотичні штамми вірусу «J123/79» та «P1439/81». Культивування вірусів здійснювали інкубуванням за температури + 37 °С з перевіркою інфікованих культур клітин, в порівнянні з контролем (через кожні 24 год.).

Культури клітин: перещеплювані лінії клітин СНЕВ (свинячої нирки ембріональна версенна лінія) та ПСН (свинячої нирки).

Пересіви культур клітин здійснювали з використанням: середовища DMEM, трипсину, розчину Версену, 10 % фетальної сироватки крові ВРХ, з додаванням антибіотика. Для отримання суспензії клітин та подальшого їх пересіву використовували суміш, що складалась з 0,02 % р-ну Версену та 0,25 % р-ну трипсину (1:5). Культури клітин були тестовані на відсутність контамінації мікроорганізмами у тіогліколевому середовищі та МПБ. Моношар клітин вирощували у скляних та пластикових культуральних флаконах об'ємом 50 см³, у 96-лункових культуральних планшетах та у скляних пробірках. В якості підтримуючого середовища використовували аналогічне ростовому середовищу, але без додавання сироватки крові ВРХ.

Середовища та розчини: поживне середовище «DMEM High Glucose», w/L – Glutamine, w/o Sodium Pyruvate, Sterile Filtered; виробник Biowest; фетальна сироватка крові великої рогатої худоби «Fetal Bovine Serum Premium», виробник Biowest; трипсин «Trypsin 0,25 %», w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Phenol Red, Sterile Filtered, виробник Biowest; розчин версену 0,02 %; комерційний антибіотик «Гентаміцин», розчин для ін'єкцій 4 %.

Результати й обговорення.

Дія температури + 4 °C на властивості коронавірусу

Досліджено інфекційні властивості коронавірусу ТГС вакцинного штаму «Рімс» (однієї і тієї ж серії), який зберігався в ліофілізованому стані за температури $+4\pm 0,5$ °C (в умовах темряви – умови побутового холодильника) протягом 8 років. Застосували ті ж дози зараження, в такому ж культуральному посуді, за використання тих самих за складом поживних і ростових середовищ, застосовуючи саме ту перещеплювану культуру клітин СНЕВ, як і при проведенні дослідів 8 років тому. Після 8-річного зберігання коронавірус культивували у культурі клітин СНЕВ протягом 18 пасажів. Вірус з першого пасажу «освіження» викликав цитопатичну дію (ЦПД) в культурі клітин, що було важливо.

Спостерігали циклічність (як і до зберігання) в зміні характеру цитопатичної дії (за морфологією) в інфікованому моношарі клітин в культурі протягом послідовного пасажування, як було і 8 років раніше.

Таким чином, виявили біологічну закономірність змін у популяційних процесах при культивуванні вірусу в перещеплюваній культурі клітин СНЕВ, на що не вплинуло зберігання вірусу протягом 8 років за температури $+4\pm 0,5$ °C. Але, швидкість реплікації вірусу стала повільнішою в інтервалі з першого по шостий пасажі після 8 років його зберігання. Раніше середній час прояву ЦПД в 1 пасажі в цьому проміжку пасажів складав 30 год., а після 8-річного зберігання цей термін склав 72 год, що більше, ніж вдвічі. Починаючи із сьомого пасажу «освіження», швидкість розвитку цитопатичної дії ставала однаковою, як і до зберігання, яка після 8 років зберігання склала в середньому 48 год. У 9-му пасажі вірус після 8-річного зберігання швидше проявив цитопатичну дію, ніж 8 років раніше. Але, вже з 10-го пасажу досліджувані варіанти вірусу (до та після зберігання) мали однаковий ритм реплікації, що відобразилось в однакових часових проміжках прояву цитопатичної дії вірусу у моношарі культури клітин СНЕВ. Якщо проаналізувати час прояву ЦПД в середньому в інтервалі пасажів в культурі клітин СНЕВ з 1-го по 18-й, то при дослідженні 8 років раніше цей час в середньому на 1 пасаж складав 35,9 год., а через 8 років зберігання вірусу – час прояву в середньому в 1 пасажі склав 56,4 год.

Таким чином, реплікування коронавірусу уповільнилось в середньому на 20,5 год на 1 пасаж. За зберігання вірусу в ліофілізованому стані протягом 8 років за температури $+4$ °C і темряві, при новому пасажуванні у культурі клітин СНЕВ протягом 18 пасажів не виявили суттєвих змін в титрах інфекційної активності з 1 до 13 пасажу ($P>0,01$). Однак, спостерігали зміну в складі популяції (за S-ознакою) цього вакцинного штаму вірусу в сторону підвищення його гетерогенності, а також виявили збільшення кількості інфекційних бляшкоутворюючих одиниць, які утворювали дрібні негативні колонії розміром $\leq 1,0$ мм. Таким чином, стабільність рівня інфекційної активності вірусу досягалась шляхом підвищення різноманітності складу в популяції коронавірусу.

Таким чином, доведена здатність коронавірусу до реплікації і до прояву ЦПД в моношарі клітин чутливої біологічної системи *in vitro*, за його зберігання у ліофілізованому стані протягом 8 років при $+4$ °C.

Для підтвердження факту збереження інфекційних властивостей за тривалого зберігання (8 років при $+4\pm 0,5$ °C в умовах темряви), дослідили і інший вакцинний штам вірусу («М-42») у перещеплюваній культурі клітин СНЕВ. Виявили, що третій пасаж цього вірусу знижував інфекційні властивості лише через 7,5 місяців зберігання і значно їх знижував при 8-річному зберіганні ($P<0,001$). Але вірус не втратив інфекційності повністю, лише знижував

титр на 2 lg. Причому, при зберіганні протягом 8 років та подальшому «освіженні» цього штаму коронавірусу виявилось, що вистачало декількох послідовних пасажів (чотири), час прояву ЦПД скорочувався із 150 год. до 48 год., а інфекційна активність підвищувалась достовірно до попереднього значення, яка була до зберігання ($P < 0,001$).

Таким чином, підтверджено, що за потрапляння до чутливої біологічної системи господаря коронавірус ТГС відновлює свої інфекційні властивості навіть після тривалого зберігання (8 років) за температури $+4 \pm 0,5$ °C.

Третім досліджуваним штамом вірусу, був епізоотичний штам «Л123/79» у вигляді вірусутримуючої культуральної рідини, який зберігали за температури $+4 \pm 0,5$ °C протягом 5 років 4 міс. В кінці зберігання титр вірусу знизився до $2,59 \pm 0,28$ lg БОЕ/см³ проти початкового значення $7,15 \pm 0,17$ lg БОЕ/см³. Таким чином, незважаючи на негативний вплив тривалого зберігання за температури $+4 \pm 0,5$ °C, коронавірус не втрачав повністю інфекційних властивостей, що слід враховувати при роботі з коронавірусами, особливо патогенними для людини. Всупереч сучасним припущенням, ми довели тривале збереження інфекційних властивостей коронавірусу із подальшою його здатністю реплікуватись у чутливих клітинах господаря (не тільки у вакцинних штамів, а і що дуже важливо, у епізоотичних штамів).

Таким чином, при екстраполяції отриманих даних з нашого модельного об'єкту (коронавірусу свиней) на умови сьогодення, можна припустити, що коронавірус SARS-CoV-2 як у «висушеному» (ліофілізованому) стані, так і у рідині (вірусутримуючій рідині) здатен зберігати свої інфекційні властивості протягом тривалого часу за температури $+4$ °C (5 років, 4 міс. - 8 років), за умов зберігання у темряві. Це означає, що там, де є стабільна температура $+4$ °C (наприклад, побутові холодильники, чи, можливо, якісь кліматичні зони із такими стабільними температурними умовами) «висушений вірус» (а це такий, що поза живою клітиною, поза чутливим господарем), можливо на якихось об'єктах середовища, виділений туди інфікованим організмом, патоген здатен зберігатись роками і при нагоді, потрапивши у чутливий організм розмножиться в ньому і зможе заразити інший чутливий організм. Хоча, цей процес спочатку може проходити повільніше, але незабаром (при послідовному пасажуванні через декілька чутливих організмів) коронавірус поверне свої інфекційні та цитотоксичні властивості для чутливих господарів.

Вплив температури $+25$ °C на коронавірус

Використано нами два адаптовані до культури клітин СНЕВ штами коронавірусу: вакцинний штам «Рімс» та епізоотичний «П1439/81», вірусутримуючі рідини яких зберігали в темному місці за температури $+25 \pm 0,5$ °C протягом 72 години (далі не досліджували) і визначали титр їх інфекційної активності через кожні 24 год. Штами значно знижували інфекційну активність протягом 0-48 год: «Рімс» ($P > 0,005$), «П1439/81» ($P > 0,005$). Але далі, в межах інтервалу 48-72 год. достовірного зниження інфекційної активності не спостерігалось ($P > 0,2$). Встановлено, що до температури $+25 \pm 0,5$ °C (протягом 72 год) найбільш стійким був епізоотичний штам «П1439/81». Це необхідно враховувати при роботі з польовими ізолятами, які можуть бути стійкими до умов зберігання за плюсових температур.

Таким чином, якщо екстраполювати результати на нинішню ситуацію із пандемією CoVid-19, можемо припустити, що певні штами коронавірусу (у рідині) можуть бути стійкими до дії температури $+25 \pm 0,5$ °C, принаймні три доби.

Вплив температури мінус 13 °C на коронавірус

Оскільки виявили можливість тривалого зберігання інфекційних властивостей коронавірусу за плюсових температур, нами досліджено і вплив на нього мінусових температур. Наприклад, за умов морозильної камери побутового холодильника, де температура мінус $13 \pm 0,5$ °C. У дослідях використані три штами вірусу (вірусумісні рідини): вакцинний «Рімс», та два епізоотичних «П1439/81» та «Л123/79». У вакцинного штаму вірусу «Рімс» інфекційна активність почала суттєво (достовірно) знижуватись через 2-4 місяці зберігання (залежно від рівня пасажу в культурі клітин СНЕВ). Також відмічено, що після

зберігання та подальшого «освіження» в чутливій культурі клітин достатньо одного пасажу для відновлення інфекційної активності вірусу при порівнянні з початком досліджень (до зберігання) ($P > 0,025$). Епізоотичний штам вірусу «П1439/81», який був адаптований протягом 40 пасажів в лінії клітин ПСН, виявився досить стійким при зберіганні за цієї температури більше 2-х років, достовірно зниження інфекційної активності спостерігали через 2 роки і 2 міс. зберігання, а деякі пасажі – тільки через 2 роки 8 міс. Цей же штам вірусу, адаптований до культури клітин – СНЕВ, починав достовірно знижувати титри інфекційної активності через 6 міс. зберігання.

Отже, приходимо до висновку, що на інфекційні властивості вірусу за тривалого зберігання при мінус 13 °С впливає вид чутливої біологічної системи, в якій вірус реплікується. Коронавірус має здатність тривало переживати за дії режиму температури мінус 13 °С, не втрачаючи інфекційних властивостей (понад 2 роки - період спостереження).

Вплив багаторазового заморожування – розморожування на зміну інфекційної активності коронавірусу

Оскільки в попередніх дослідженнях була доведена можливість для коронавірусу тривало зберігати інфекційні властивості, за умов морозильної камери побутового холодильника (за мінус 13 °С), нами вивчено питання впливу багаторазового заморожування-розморожування вірусотримуючої рідини на інфекційну активність вірусу.

Досліджено, чи впливають умови багаторазового заморожування-розморожування на інфекційні властивості вакцинного («Рімс») та епізоотичного («П1439/81») штамів коронавірусу ТГС, які були адаптовані до чутливої культури клітин СНЕВ. Заморожування здійснювали за температури мінус 13 ± 0,5 °С, розморожування – до кімнатної температури (+18 - +20 °С). Таким чином, перепад температур складав 31-33 °С. Таку процедуру заморожування-розморожування проводили багаторазово, послідовно 13 разів. Виявлено, що інфекційна активність вакцинного штаму вірусу «Рімс» при цьому достовірно не змінилась ($P > 0,1$). У епізоотичного ізоляту вірусу «П1439/81» також, як і у вакцинного штаму вірусу «Рімс» 13-разове заморожування-відтаювання не впливало на інфекційну активність, достовірної зміни не виявили ($P > 0,2$), вони виявились стійкими протягом періоду досліджень (табл.).

Таблиця

Вплив багаторазового перепаду температурного режиму (від мінус 13 ± 0,5 °С до кімнатної температури (+18-20°С)) на інфекційну властивість різних штамів коронавірусу

Кратність заморожування-відтаювання	Вакцинний штам «Рімс», титр інфекційної активності в lg БУО/см ³ ± m	Достовірність змін титрів порівняно з першим разом заморожування-відтаювання штаму «Рімс»	Епізоотичний штам «П1439/81», титр інфекційної активності в lg БУО/см ³ ± m	Достовірність змін титрів порівняно з першим разом заморожування-відтаювання штаму «П1439/81»
1	7,14±0,54	0	4,33±0,07	0
2	6,68±0,23	$P > 0,2$	4,17±0,13	$P > 0,2$
3	6,97±0,095	$P > 0,2$	4,06±0,07	$P > 0,2$
4	6,75±0,16	$P > 0,2$	4,28±0,15	$P > 0,2$
5	6,5±0,23	$P > 0,2$	4,27±0,19	$P > 0,2$
6	6,64±0,14	$P > 0,2$	4,26±0,16	$P > 0,2$
7	6,43±0,24	$P > 0,2$	4,49±0,19	$P > 0,2$
8	6,13±0,31	$P > 0,1$	4,33±0,52	$P > 0,2$
9	6,54±0,18	$P > 0,2$	4,37±0,12	$P > 0,2$
10	6,64±0,092	$P > 0,2$	3,79±0,27	$P > 0,2$
11	6,63±0,08	$P > 0,2$	3,42±0,32	$P > 0,05$
12	6,12±0,33	$P > 0,1$	4,02±0,29	$P > 0,2$
13	6,48±0,24	$P > 0,2$	3,56±0,17	$P > 0,01$

Таким чином, коронавірус має значну стійкість до багаторазових різких змін температур без втрати інфекційних властивостей. Це слід мати на увазі, при контамінуванні коронавірусом об'єктів, які наприклад, зберігаються в морозильних камерах побутових холодильників.

Таким чином, проводячи аналогії, можемо припустити, що коронавірус, збудник, що циркулює в пандемічній ситуації 2020/2021 рр., якщо має такі ж властивості, як і модельний коронавірус ТГС в наших дослідженнях, потрапивши до морозильної камери побутового холодильника, може становити в подальшому загрозу інфікування для людини.

Вплив температури мінус 20 ±0,5 °C на коронавірус

Нами досліджено вплив температури мінус 20±0,5 °C на інфекційні властивості коронавірусу ТГС епізоотичного штаму “П 1439/81” (у вірусотримуючій рідині) при зберіганні протягом двох років у темряві. Після дворічного зберігання його “освіжали” культивуванням у чутливій культурі клітин. Виявилось, що коронавірус не лабільний, може зберігатись довго без втрати інфекційних властивостей, які в процесі подальшого пасажування в чутливій біологічній системі відновлюються. Інфекційна активність вірусу у процесі нового пасажування збільшувалась достовірно ($P>0,01$) після зберігання за мінус 20±0,5 °C (в проміжку досліджуваного інтервалу: з 65 по 100 пасажи в культурі клітин).

Наведені дані слід враховувати при розробці стратегій, призначених для зменшення ризику передачі вірусу.

В И С Н О В К И

Таким чином, доведена можливість інфікування коронавірусом чутливих до нього організмів як з контамінованих ним поверхонь, так і при довготривалому зберіганні вірусу за умов температурних режимів +4 °C; +25 °C; мінус 13 °C; мінус 20 °C та за багаторазових змін температурного режиму від мінус 13 °C до +18 °C, +20 °C.

Перспективи досліджень. Результати досліджень, що представлені у даній статті, підтверджують подальшу необхідність виявлення здатності патогенів (коронавірусів) до виживання в різних умовах навколишнього середовища та на контамінованих поверхнях предметів, що буде в нагоді при удосконаленні попереджувальних заходів з мінімізації поширення збудника, відкривають нові перспективи удосконалення профілактичних стратегій для унеможливлення подальшого інфікування коронавірусами людей і тварин. Розпочаті дослідження потребують більш масштабних експериментів.

References

- Cai, J., Sun, W., Huang, J., Gamber, M., Wu, J., He, G. (2020). Indirect virus transmission in cluster of COVID-19 cases, Wenzhou, China. *Emerg Infect Dis.* 26(6):1343–5.
- Julian, T.R., Leckie, J.O., Boehm, A.B. (2010). Virus transfer between fingerpads and fomites. *J Appl Microbiol.* 109(6):1868–74.
- Kasloff SB, Strong JE, Funk D, Cutts TA. Stability of SARS-CoV-2 on critical personal protective equipment. *medRxiv.* 2020;2020.06.11.20128884.
- Riddell, Shane, Goldie, Sarah, Hill, Andrew, Eagles, Debbie & Drew, Trevor W.. (2020). The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Virology Journal.* 17, 145.
- Rolfe, T. & Nitti, M. (2016). Touchscreens: the mosquito of the digital age. <https://emist.com/infection-prevention-touchscreens-are-contaminated/>.
- Tashuta, C.G. (2013). Virusna patologiya tvaryn: posibnyk. K. Agrar Media Grup. 399. [in Ukrainian].
- Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Holbrook, M.G., Gamble A., Williamson, B.N. et al. (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 382(16):1564–7.