

Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients

<https://www.nature.com/articles/s41467-020-16670-2>

Определение загрязнения воздуха и поверхностей вирусом SARS-CoV-2 в больничных палатах, где находятся инфицированные пациенты

Понимание различных путей передачи SARS-CoV-2 имеет решающее значение для планирования эффективных мероприятий по разрыву цепи передачи. Хотя было зафиксировано обширное загрязнение поверхностей SARS-CoV-2 со стороны пациента, имеющего симптомы заболевания, мало что известно о воздушно-капельной передаче SARS-CoV-2. Имеются многочисленные сообщения о пациентах с бессимптомным течением, которые получают положительный результат теста на SARS-CoV-2, и была описана возможная передача вируса от пациента без симптомов заболевания. Таким образом, загрязнение частицами вируса воздуха и поверхностей, окружающих пациентов с бессимптомным течением COVID-19, или тех, кто выздоравливает, может иметь серьезные последствия для стратегий борьбы со вспышками заболевания.

Основной **целью** нашего исследования является выявление потенциальных факторов риска загрязнения окружающей среды SARS-CoV-2 путем взятия проб воздуха в помещении и с поверхностей, окружающих пациентов, госпитализированных с COVID-19, на различных стадиях заболевания.

Результаты

Взятие проб воздуха в помещении и с поверхностей окружающих предметов

Взятие проб с поверхностей предметов проводилось в трех боксах для больных инфекциями, передающимися воздушно-капельным путем, в отделении интенсивной терапии и в 27 изоляторах в общей палате. Взятие проб воздуха проводилось в трех из 27 изоляторов в общей палате. Все пациенты сообщили о симптомах COVID-19. У семи пациентов (23 %) на момент забора проб наблюдалось бессимптомное течение. Из 23 пациентов с симптомами заболевания у 18 (78 %) наблюдались симптомы ОРВИ, у 1 – желудочно-кишечные симптомы, у 1 – как симптомы ОРВИ, так и желудочно-кишечные, у 3 пациентов (10 %) – только повышенная температура или миалгия (табл. 1).

У двух (66,7 %) из трех проб, взятых в боксах, был получен положительный результат на SARS-CoV-2. Размеры частиц составили >4 мкм, а диаметр – 1–4 мкм (табл. 1). По результатам проб, общая концентрация SARS-CoV-2 в воздухе колебалась от $1,84 \times 10^3$ до $3,38 \times 10^3$ копий/м³. В помещениях, где вирусные частицы были обнаружены в воздухе, также наблюдалось загрязнение поверхностей.

Между пациентами, в помещениях у которых был обнаружен вирус, и теми, у кого он отсутствовал, не было отмечено исходных различий с точки зрения возраста, сопутствующих заболеваний и положительного результата теста в день его проведения. Медианные значения порогового цикла Ct клинических образцов у пациентов, в помещениях у которых был обнаружен вирус и тех, у кого он отсутствовал, составили

25,69 (межквартильный размах 20,37–34,48) и 33,04 (28,45–35,66) соответственно (табл. 2).

При наличии в помещении частиц вируса наиболее вероятно загрязнение пола (65 %), затем – вентиляционного отверстия (60 %, $n = 5$), опорных ручек кровати (59 %) и прикроватной тумбы (47 %) (рис. 1). Загрязнение сиденья и кнопки смыва унитаза было обнаружено в 5 из 27 помещений, и все 5 пациентов сообщили о наличии желудочно-кишечных симптомов в течение предшествующей недели. Мы не обнаружили поверхностного загрязнения ни в одной из трех палат интенсивной терапии.

Загрязнение поверхности было выше на 1-й неделе болезни (рис. 2). Загрязнение помещения не было связано с наличием симптомов (табл. 2). Кривая наилучшего приближения с подбором методом наименьших квадратов (рис. 3) показала, что степень загрязнения поверхностей, к которым прикасаются чаще всего, снижается с увеличением продолжительности заболевания и значений St . Также не было обнаружено корреляции между значениями St клинических образцов и значениями St из проб в помещении на протяжении всего периода заболевания (рис. 3).

Обсуждение

Взятие проб с поверхностей в помещении показало, что положительные результаты теста методом ПЦР связаны с вирусной нагрузкой носоглотки. Вирусная нагрузка достигает пика примерно на 4–5-й день с момента появления симптомов. При взятии проб воздуха в боксах у двух пациентов с COVID-19 (на 5-й день болезни, когда наблюдается высокая вирусная нагрузка носоглотки) было обнаружено присутствие частиц SARS-CoV-2 размером 1–4 мкм и >4 мкм. Отсутствие каких-либо следов SARS-CoV-2 в пробах воздуха у третьего пациента (9-й день болезни с более низкой вирусной нагрузкой носоглотки) говорит о том, что концентрация SARS-CoV-2 в воздухе, возможно, наиболее высока в первую неделю болезни.

В недавнем лабораторном исследовании было отмечено, что SARS-CoV-2 может сохранять жизнеспособность в виде аэрозоля до 3 часов. Хотя количество испытуемых было ограничено, в нашем исследовании этот вопрос изучался по каждому отдельному пациенту, что позволило соотнести концентрацию и размеры частиц в воздухе, длительность симптомов и вирусную нагрузку носоглотки. Отсутствие процедур, в ходе которых происходит образование аэрозолей, или интраназальной оксигенотерапии, снижает вероятность того, что наши текущие результаты окажутся ятрогенными. С целью обобщаемости текущих результатов исследования необходимы более масштабные исследования на уровне пациентов, в ходе которых рассматривается способность SARS-CoV-2 к передаче воздушно-капельным путем или через аэрозоли на различных расстояниях и при различных состояниях пациента и помещения, в котором он находится.

В отличие от исследования, проведенного в городе Ухань, Китай, в ходе которого в аэрозолях были обнаружены частицы вируса SARS-CoV-2 диаметром 0,25–1,0 мкм, наименьший аэродинамический размер частиц, содержащий обнаруживаемые уровни SARS-CoV-2 в нашем исследовании, составил 1–4 мкм. Отсутствие SARS-CoV-2 в частицах <1 мкм может быть обусловлено снижением эффективности экстракции вирусов из фильтров по сравнению с экстракцией вирусов, прилипших к стенке центрифужных

пробирок объемом 1,5 мл и 15 мл, где частицы диаметром 1–4 мкм и >4 мкм улавливаются с помощью аэрозольного пробоотборника NIOSH. Кроме того, насколько нам известно, это первый случай, когда пробоотборники NIOSH были использованы для захвата коронавирусов. Таким образом, не существует исходных данных для взятия проб коронавируса, находящегося в виде капель в воздухе, с помощью этих пробоотборников, что ограничивает наши знания о наличии или отсутствии вируса в частицах размером <1 мкм.

В данном исследовании наблюдалась связь в присутствии и концентрации SARS-CoV-2 в пробах воздуха и на поверхностях с днем начала заболевания и вирусной нагрузкой носоглотки у пациентов с COVID-19. Этот вывод подтверждается многочисленными наблюдательными клиническими исследованиями, которые показали, что вирусная нагрузка SARS-CoV-2 достигает максимума в первую неделю у пациентов с COVID-19, причем активная репликация вируса в верхних дыхательных путях происходит в первые 5 дней болезни.

У нашего исследования имеются некоторые ограничения. Например, мы не определяли способность SARS-CoV-2 к культивации из образцов, полученных с поверхностей, и из частиц различного размера, находящихся в воздухе. Это было бы важно для определения инфекционности обнаруженных частиц. Трудность культивирования вируса из проб воздуха связана с низкими концентрациями вируса, а также с нарушением целостности вируса из-за стрессовых факторов при взятии проб воздуха.

Методы

Дизайн исследования, отбор пациентов и сбор данных. Мы провели данное поперечное исследование в Национальном центре инфекционных заболеваний, Сингапур. В боксах, в которых находились пациенты, осуществлялось 12 смен воздуха в час, средняя температура составляла 23 °C, относительная влажность – 53–59 % и скорость выдыхаемого воздуха – 579,6 м³/ч.

В исследование были включены пациенты с инфекцией SARS-CoV-2, подтвержденной по результатам теста методом ПЦР в течение предшествующих 72 часов. Были собраны клинические характеристики, включая наличие симптомов, день болезни, день пребывания в помещении, потребность в дополнительном кислороде и исходные характеристики.

Взятие проб воздуха. Шесть пробоотборников аэрозолей NIOSH BC 251 были помещены в каждый из трех изоляторов в общей палате для сбора проб воздуха. Частицы, собранные с помощью пробоотборника NIOSH, распределяются на три группы в зависимости от размера. Частицы диаметром >4 мкм собираются в центрифужную пробирку объемом 15 мл, частицы диаметром 1–4 мкм – в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, а частицы диаметром <1 мкм – в самосборную фильтрующую кассету, содержащую фильтр из ПТФЭ диаметром 37 мм с отверстиями 3 мкм. Все пробоотборники NIOSH были подключены к сенсорным насосам SKC AirCheck или к универсальным насосам SKC со скоростью потока 3,5 л/мин на 4 часа, что в общей сложности позволило собрать 5040 л воздуха из каждого помещения.

В палате Пациента 1 три пробоотборника NIOSH были прикреплены к двум штативным стойкам на разной высоте от пола (1,2 м, 0,9 м и 0,7 м) рядом с воздуховодом для улавливания частиц из однонаправленного воздушного потока в помещении. В течение 4 часов пациент периодически находился лицом к пробоотборникам NIOSH, когда сидел в 1 м от первого штатива и в 2,1 м от второго штатива. Четыре кассетных фильтра SKC из ПТФЭ диаметром 37 мм с отверстиями 3 мкм также были расположены по всему помещению и соединены с универсальными насосами для взятия проб воздуха SKC со скоростью потока 5 л/мин, каждый из которых пропускал 1200 л воздуха.

В палатах Пациентов 2 и 3 три пробоотборника NIOSH были прикреплены к двум штативным стойкам на разной высоте от пола (1,2 м, 0,9 м и 0,7 м). В течение 4 часов Пациенты 2 и 3 находились в постели в пределах 1 м от всех шести пробоотборников NIOSH. Пациент 3 в течение долгого времени говорил по телефону. Дополнительные насосы SKC с кассетными фильтрами из ПТФЭ в изоляторах Пациентов 2 и 3 не использовались.

Шесть проб, собранных с помощью NIOSH в каждом помещении, были объединены перед тестированием, но пробирки с частицами разного размера не соединялись. Каждый пул проб был получен после фильтрации 5040 л воздуха.

Взятие проб с поверхностей. Образцы с поверхностей были собраны с помощью предварительно смоченных стерильных палочек-тампонов Puritan EnviroMax Plus. В каждой комнате было взято от 8 до 20 проб. Пять поверхностей были определены как те, к которым прикасаются чаще всего: прикроватный столик, опорные ручки кровати, в том числе панель управления кроватью и кнопка вызова, прикроватная тумба, выключатели над кроватью и стул в общей палате. В палатах интенсивной терапии вместо выключателей над кроватями и стульев были взяты пробы из воздуховода и инфузионных насосов. В изоляторах были взяты пробы с сиденья унитаза и кнопки смыва (одна комбинированная палочка-тампон).

Транспортировка и обработка образцов. Все образцы были сразу же помещены в среду с температурой 4 °C в больнице и находились там до момента транспортировки в лабораторию BSL-3. Там образцы сразу обрабатывали и хранили при температуре -80 °C или сразу изучали. Перед экстракцией РНК пробирки с пробами воздуха и фильтры NIOSH обрабатывались, как было описано ранее, с незначительной модификацией из-за объединения образцов.

Лабораторный метод. Для экстракции РНК использовался мини-набор QIAamp viral RNA (Qiagen Hilden, Германия). Вкратце, для анализа гена белка оболочки была приготовлена реакционная смесь объемом 20 мкл с использованием 12,5 мкл буфера из набора SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR (ThermoFisher Scientific, США), 0,75 ммоль Mg₂ SO₄, 5 мкл РНК, по 400 нмоль каждого прямого праймера (E_Sarbeco_F1-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT) и обратного праймера (E_Sarbeco_R2-ATATTGCAGCAGTACGCACACA) с 200 нмоль зонда (E_Sarbeco_P1- (FAM) ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG (BHQ1)). Условия термического циклирования включали в себя обратную транскрипцию при 55 °C в течение 10 мин, начальную денатурацию при 95 °C в течение 5 мин. Затем проводилось 45 циклов при 95 °C в течение

15 с и при 58 °C в течение 1 мин. Для анализа с помощью набора orflab была подготовлена реакционная смесь объемом 20 мкл с использованием 12,5 мкл буфера из набора SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR (ThermoFisher Scientific, США), 0,5 ммоль Mg₂ SO₄, 5 мкл РНК, по 800 нмоль каждого прямого праймера (WU-BNI-F-СТААСАТGТТТАТCАСССGCG) и обратного праймера (WU-BNI-P- (FAM) ТААGАСАТGТАСGТGСАТGGАТТGGСТТ (ВНQ1)). Условия термического циклирования включали в себя обратную транскрипцию при 55 °C в течение 10 мин, начальную денатурацию при 95 °C в течение 5 мин. Затем проводилось 45 циклов при 95 °C в течение 15 с и при 60 °C в течение 1 мин. Все пробы были выполнены в двух экземплярах и с помощью каждого набора. Тест считался положительным, если наблюдалась амплификация хотя бы в одном случае.

Режим уборки помещений. Регулярная уборка помещений проводилась специализированной группой обслуживающего персонала. Поверхности, до которых дотрагивались чаще всего (например, опорные ручки кровати, прикроватный столик, выключатели), обрабатывали дважды в день с использованием 5000 ч/млн дихлоризоцианурата натрия (NaDCC), восстановленного с помощью шипучих таблеток Biospot. Пол мыли ежедневно с использованием 1000 ч/млн дихлоризоцианурата натрия. Взятие образцов с поверхностей производилось утром перед первой уборкой.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с использованием Stata версии 15.1 (StataCorp, College Station, Texas) и GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего). Р-значение <0,05 считалось статистически значимым, и все тесты были двухвыборочными. Мы проанализировали факторы, связанные с присутствием частиц вируса в помещении, с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрического критерия суммы рангов Уилкоксона для сравнения непрерывных переменных в зависимости от их распределения. Для сравнения категориальных переменных использовались критерий хи-квадрат и точный критерий Фишера. Мы построили кривую наилучшего приближения с подбором методом наименьших квадратов для изучения распределения загрязнения частицами вируса в различные дни болезни и различных клинических значениях St.

Таблица 1. Определение вируса SARS-CoV-2 в воздухе в больничных палатах, где находятся инфицированные пациенты.

Пациент	День заболевания	Симптомы в день взятия проб воздуха	Клиническое значение St ^a	Концентрация SARS-CoV-2 в воздухе (число копий РНК на м ³)	Размер частиц в воздухе	Пробоотборник
1	9	Кашель, тошнота, одышка	33.22	Н/О Н/О Н/О Н/О	>4 мкм 1–4 мкм <1 мкм -	NIOSH Фильтр SKC
2	5	Кашель, одышка	18.45	2,000 1,384	>4 мкм 1–4 мкм	NIOSH

				Н/О	МКМ <1 МКМ	
3	5	Бессимптомное течение ^b	20.11	927 916 Н/О	>4 МКМ 1–4 МКМ <1 МКМ	NIOSH

Н/О – не обнаружено.

a Значение порогового цикла Ct клинической пробы при тестировании методом ПЦР.

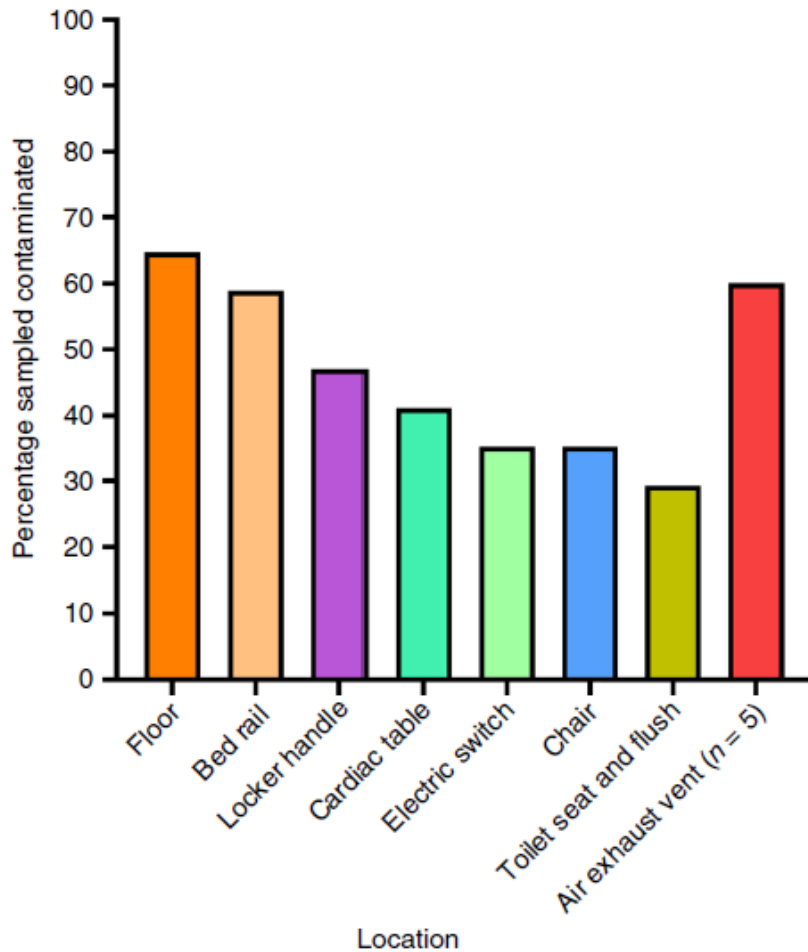
b За день до взятия пробы пациент сообщил о наличии температуры, кашля и боли в горле. В день взятия пробы пациент не сообщал о каких-либо симптомах, однако наблюдался кашель во время взятия пробы.

Таблица 2. Исходная клиническая характеристика пациентов с COVID-19, у которых в помещении были обнаружены частицы вируса.

Характеристика пациентов с COVID-19	Помещения, где обнаружено загрязнение поверхностей (n = 17)	Помещения, где не было обнаружено загрязнение поверхностей (n = 13)	P-значение
Медиана возраста (межквартильный размах)	52 (42–62)	44 (36–55)	0,75
Мужской пол (%)	6 (46 %)	8 (47 %)	0,96
Медиана возраста в соответствии с индексом коморбидности Чарльсон (межквартильный размах)	1 (0–2)	1 (0–1)	0,69
Медиана дней болезни (межквартильный размах)	5 (4–9)	13 (5–20)	0,17
Медиана дней пребывания в помещении (межквартильный размах)	3 (3–8)	4 (2–16)	0,95
Потребность в кислороде (%)	0	4 (31)	0,03
Наличие симптомов (%)	12 (71)	11 (85)	0,43
Симптомы ОРВИ (%)	11 (65)	7 (54)	0,55
Симптомы со стороны ЖКТ (%)	1 (6)	1 (8)	>0,99
Клиническое значение порогового цикла, медиана (межквартильный размах) ^a	25.69 (20.37–34.48)	33.04 (28.45–35.66)	0.06

^a Значение порогового цикла клинической пробы пациента при тестировании методом ПЦР.

Для сравнения категориальных переменных использовались критерий хи-квадрат или точный критерий Фишера, а для сравнения непрерывных переменных – t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий суммы рангов Уилкоксона.



Percentage	sampl	contaminated	=	Процент	загрязнения	образца
Location			=			Место
Floor			=			Пол
Bed	rail	=		Опорная	ручка	кровати
Locker	handle	=		Прикроватная		тумба
Cardiac	table	=		Прикроватный		стол
Electric		switch	=			Выключатель
Chair			=			Стул
Toilet	seat	and	flush	=	Сиденье	унитаза
				=		и
				=		кнопка
				=		смыва
Air	exhaust	vent	(n = 5)	=		Воздуховод

Рис. 1. Процент образцов поверхностей, где было обнаружено загрязнение.

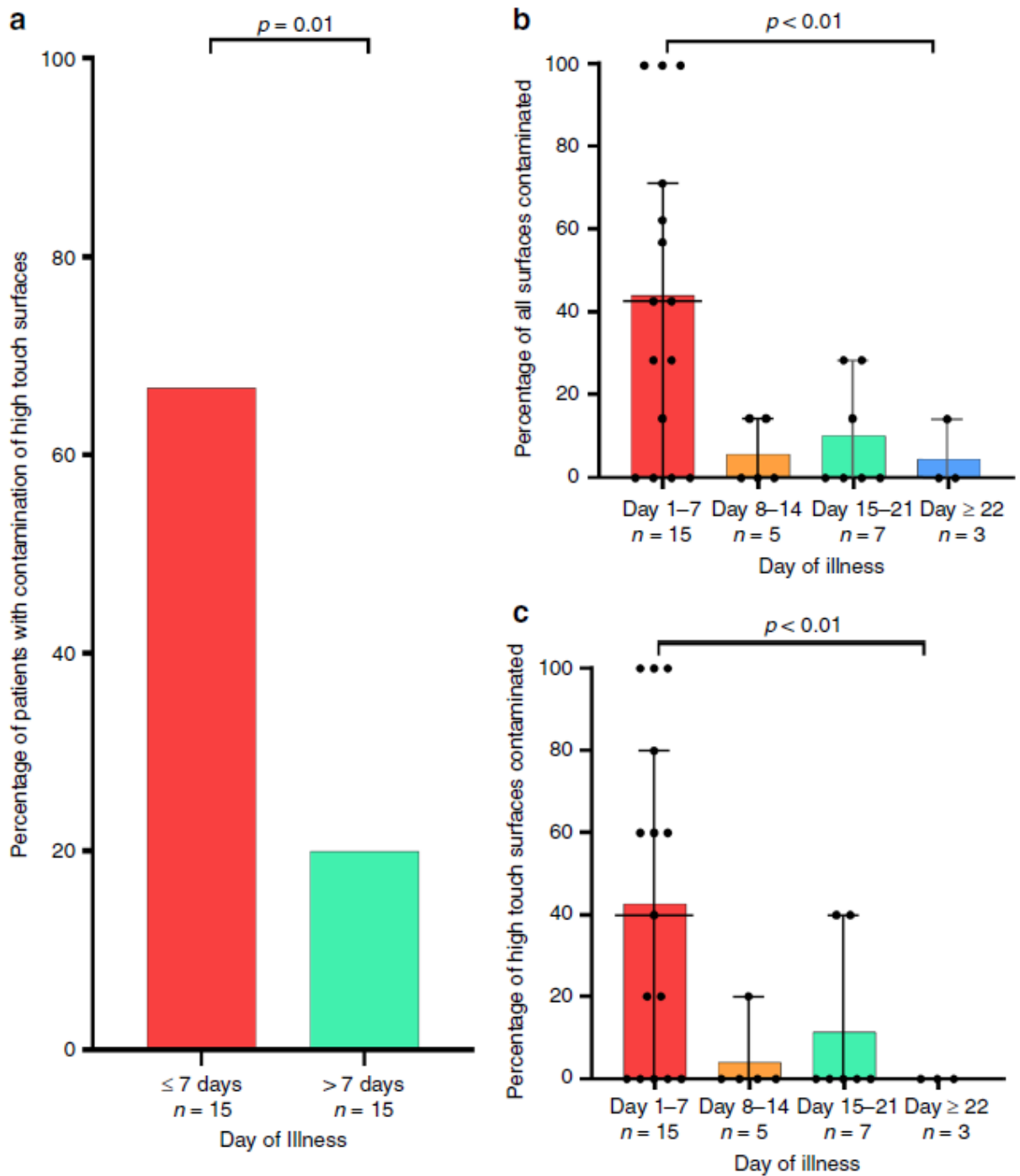


Рис. 2. Степень загрязнения помещения в зависимости от дня болезни.
а Процент пациентов, в помещениях у которых были обнаружены частицы вируса на поверхностях, к которым прикасались чаще всего в первую неделю болезни по сравнению с более поздним периодом. **б** Процент поверхностей с частицами вируса в зависимости от дня болезни, медиана и доверительный интервал 95%. **с.** Процент поверхностей, к которым прикасались чаще всего, с частицами вируса в зависимости от дня болезни, медиана и доверительный интервал 95%.

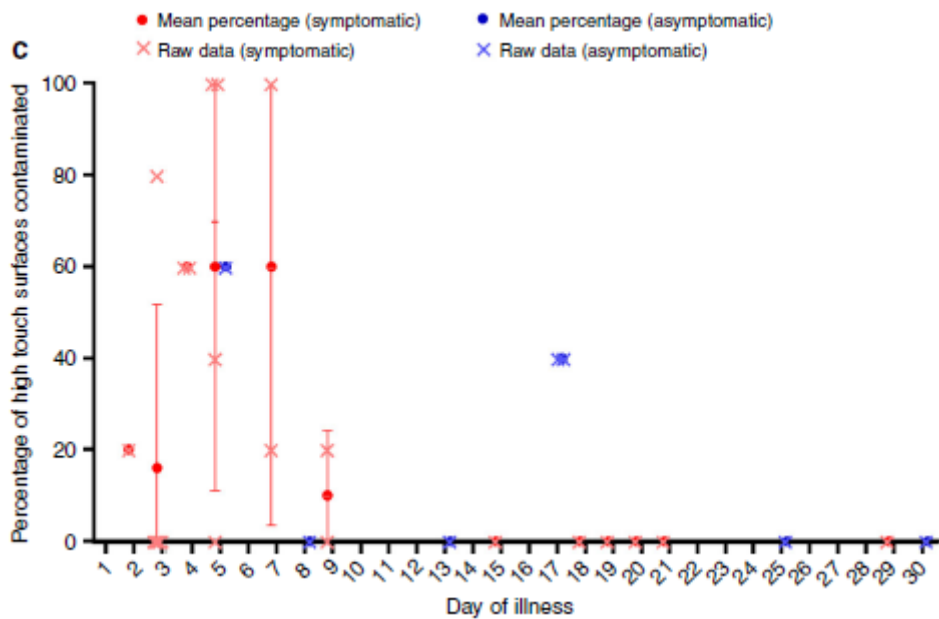
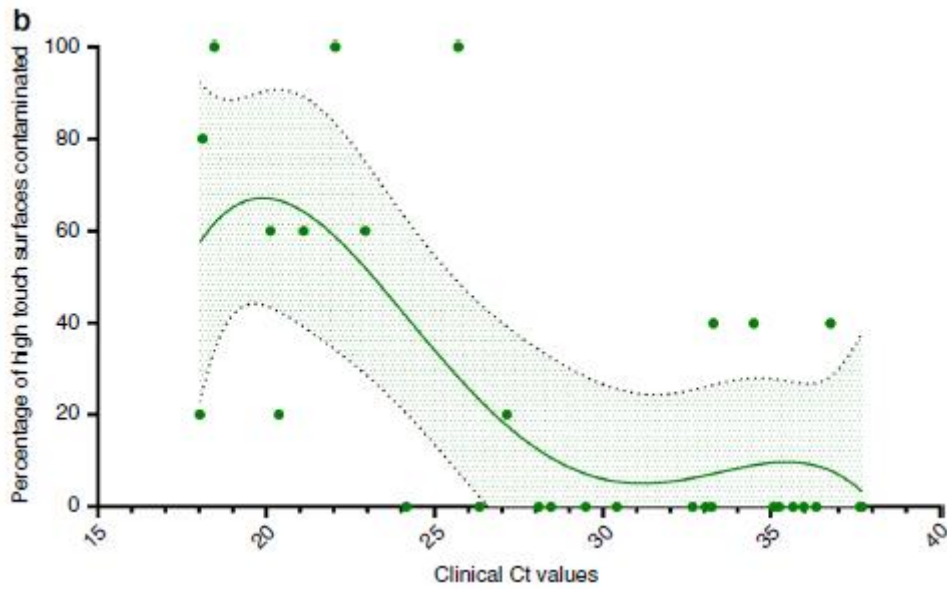
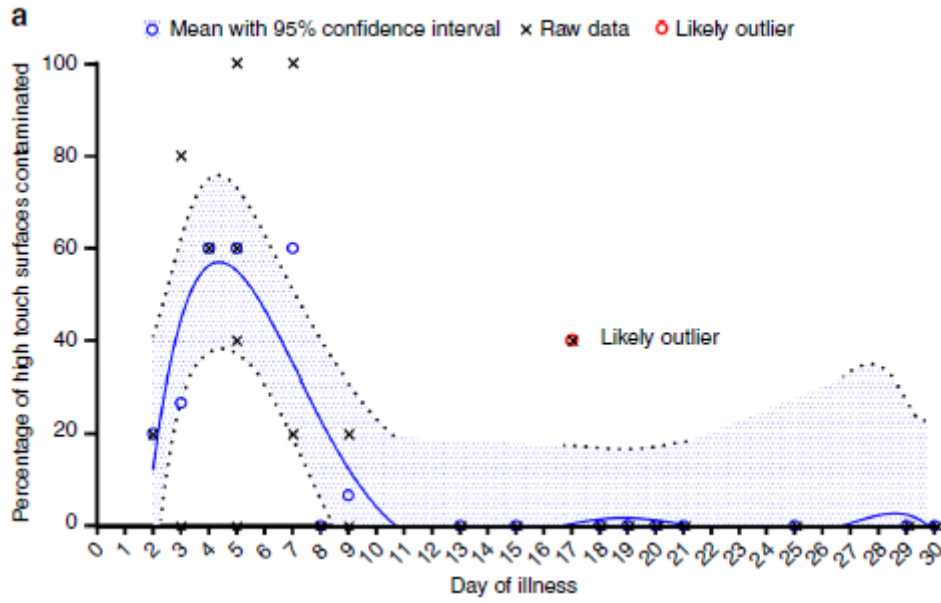


Рис. 3. Особенности состояния пациента и признаки заболевания, влияющие на степень загрязнения поверхностей, к которым прикасаются чаще всего.

а Средний процент загрязненных поверхностей, к которым прикасаются чаще всего, в зависимости от дня болезни, доверительный интервал 95 % с кривой наилучшего приближения, $n = 30$. **б** Процент загрязненных поверхностей, к которым прикасаются чаще всего, в зависимости от клинического значения порогового цикла, доверительный интервал 95 % с кривой наилучшего приближения, $n = 30$. **с** Средний процент загрязненных поверхностей, к которым прикасаются чаще всего, в зависимости от дня болезни, доверительный интервал 95 % в зависимости от симптомов, $n = 30$.