

WYNIKI BADAŃ URZĄDZENIA VIREWALL SOLUVA H DEZAKTYWACJA WYSUSZONEGO POWIERZCHNIOWO SARS-COV-2 PRZEZ NAŚWIETLANIE UV-C

Badania prowadzone pod przewodnictwem prof. dr. Michael Schindler - Kierownik Katedry Wirusologii Molekularnej Instytut Wirusologii Lekarskiej i Epidemiologii Chorób Wirusowych Szpitala Uniwersyteckiego] Tübingen, Niemcy

Abstrakt

Pandemia SARS-CoV-2 wymaga tanich, niezawodnych i szybkich technologii dezynfekcji i odkażania. W pracy oceniliśmy skuteczność promieniowania UV-C do dezaktywacji wysuszonego powierzchniowo wirusa SARS-CoV-2. Suszenie przez dwie godziny nie miało większego wpływu na zakaźność SARS-CoV-2, co wskazuje, że wydychany wirus w kropelkach lub aerozolu pozostaje zakaźny na powierzchni przynajmniej przez pewien czas. Zaskakujące jest to, że krótka ekspozycja powierzchni o wysokim mianie wysuszonego wirusa ($3 \cdot 10^6$ IU/mL) na światło UV-C (16 mJ/cm^2) spowodowała całkowitą redukcję zakaźności wirusa SARS-CoV-2. Wzięte razem, nasze wyniki pokazują, że SARS-CoV-2 jest szybko dezaktywowany przez stosunkowo niskie dawki promieniowania UV-C.

W związku z tym działanie UV-C jest skutecznym, innym niż chemiczne sposobem dekontaminacji powierzchni z zakaźnego SARS-CoV-2 o wysokim mianie.

Wstęp

SARS-CoV-2 rozprzestrzenił się na całym świecie i istnieje pilna potrzeba szybkich, wysoce wydajnych, przyjaznych dla środowiska innych niż chemiczne procedur dezynfekcji. Zastosowanie światła UV-C, to uznana technologia odkażania powierzchni i aerozoli ([literatura 1-3](#)). Procedura ta okazała się skuteczna w dezaktywacji SARS-CoV-1 ([literatura 4-6](#)), kilku innych otoczkowych i bezotoczkowych wirusów oraz bakterii ([literatura 7](#)). Ostatnio wykazano również, że SARS-CoV-2 jest wrażliwy na dezaktywację przez promieniowanie UV-C ([literatura 8-10](#)). Jednak dawki i czas ekspozycji niezbędne do całkowitej dezaktywacji SARS-CoV-2 mieściły się w zakresie wykluczającym skuteczność metod opartych na promieniowaniu UV do dekontaminacji powierzchni oraz aerozoli stosowanych na szeroką skalę ([literatura 10](#)).

Dlatego przeprowadziliśmy „prawdziwe” podejście do aplikacji, symulując dezaktywację wysuszonej powierzchni, na której znajduje się zakaźny SARS-CoV-2, za pomocą **przenośnego urządzenia VireWall Soluva H**, emitującego promienie UV-C oraz skrzynki UV-C przeznaczonej do dekontaminacji obiektów średniej wielkości. Nasze dane świadczą, że wysuszony powierzchniowo SARS-CoV-2 zachowuje zakaźność przez co najmniej dwie godziny. Krótkotrwała ekspozycja wysuszonego powierzchniowo SARS-CoV-2 o wysokim mianie na działanie światła UV-C prowadzi do całkowitej redukcji zakaźności.

W związku z tym napromienianie UV-C jest szybką i optymalną technologią odkażania powierzchni z SARS-CoV-2 o wysokim mianie.

Materiał i metody

Hodowla komórkowa.

Komórki Caco-2 (ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego) hodowano w 37°C z 5% CO₂ w DMEM zawierającym 10% FCS, z 2 mM l-glutaminą, 100 µg/ml penicyliny-streptomycyny i 1% wirusów NEAA.

Wirusy.

Rekombinowany SCoV2 wyrażający mNeonGreen (icSARS-CoV-2-mNG) ([literatura 11](#)) uzyskano ze Światowego Centrum Referencyjnego ds. Pojawiających się Wirusów i Arbowirusów (WRCEVA) w UTMB (Oddział Medyczny Uniwersytetu Tekszańskiego). Aby wygenerować zapasy icSARS-CoV-2-mNG, zakażono 200 000 komórek Caco-2 50 µl roztworu wirusa na 6-dołkowej płytce, następnie supernatant zebrano przy indeksie 48 hpi, odwirowano i przechowywano w temperaturze -80°C. W celu określenia MOI przeprowadzono miareczkowanie przy użyciu seryjnych rozcieńczeń roztworu wirusa. Liczbę zakaźnych cząstek wirusa na ml obliczono jako $(MOI \times \text{liczba komórek}) / (\text{objętość zakażenia})$, gdzie $MOI = -\ln(1 - \text{wskaźnik zakażenia})$.

Dezaktywacja przy zastosowaniu światła UV-C.

35 µl zapasu wirusa, co odpowiada $\sim 4 \times 10^6$ zakaźnym jednostkom (IU), wirusa icSARS-CoV-2-mNG zostało nakropione (w trzech powtórzeniach) na 6-dołkowych płytkach i suszone przez dwie godziny w RT. 6-dołkowe płytki z kroplami wysuszonego wirusa poddano działaniu światła UV-C przy użyciu komory dezynfekcyjnej Soluva® pro UV (Heraeus) przez 60 sekund lub przy użyciu Soluva® pro UV przenośnej komory dezynfekcyjnej (Heraeus) przez 2 sekundy w trybie fix przy odległości płytek 5 i 20 cm. Ponadto, testowano schemat poruszania się przy niskiej (3,75 cm/s) i dużej (12cm/s) prędkości przy 20 cm testowanej odległości. Jako kontrolę, 6-dołkowe płytki nakropiono wirusem i osuszono, ale nie poddano promieniowaniu UV. Po naświetlaniu promieniami UV plamki wirusa zostały odtworzone przy użyciu 1 ml infekcyjnej pożywki (pożywki hodowlane z 5% FCS). Jako kontrolę rozcieńczono 35 µl oryginalnego zapasu wirusa w 1 ml pożywki infekcyjnej i użyto jako kontrolę zakaźności wirusa.

Ocena zastosowania promieni UV.

W przypadku eksperymentów z infekcją, 1×10^4 komórek Caco-2 na jeden dołek wysiane na 96-dołkowych płytkach dzień przed infekcją. Komórki inkubowano z SARS-CoV-2 szczepem icSARS-CoV-2-mNG przy $MOI=1,1$ (zapas) lub wirusem poddanym działaniu promieniowania UV i rekonstruowanym w seryjnych dwukrotnych rozcieńczeniach od 1:200 do 1:51200. Komórki 48 hpi utrwalono 2% PFA i zabarwiono odczynnikami Hoechst33342 (stężenie końcowe 1 µg/ml) przez 10 minut w temperaturze 37°C. Roztwór barwienia usunięto i wymieniono na PBS. Do ilościowej oceny wskaźników infekcji, obrazowanie wykonano przy użyciu za pomocą czytnika Cytation3 (Biotek), a komórki Hoechst+ i mNG+ zostały automatycznie przeliczone przez oprogramowanie Gen5 (Biotek). Miana wirusa (liczba zakaźnych cząstek wirusa na ml) obliczono jako $(MOI \times \text{liczba komórek}) / (\text{objętość zakażenia})$, gdzie $MOI = -\ln(1 - \text{wskaźnik zakażenia})$. Wskaźniki infekcji poniżej wartości 0,01 zostały użyte jako wartość graniczna i ustawione na 0 w celu uniknięcia fałszywie pozytywnych obliczeń.

Oprogramowanie i analiza statystyczna.

Oprogramowanie GraphPad Prism 8.0 użyto do analiz statystycznych i do generowania wykresów. Diagramy wygenerowano przy użyciu programu CorelDrawX7. Inne stosowane oprogramowanie to Gen5 v.3.10.

Wyniki

Zastosowaliśmy podejście eksperymentalne w celu oceny wpływu zastosowania UV-C na stabilność SARS-CoV-2. Symulując sytuację, w której wydychane krople lub aerozole pochodzące od zakażonych osób zanieczyszczają powierzchnie, wyprodukowaliśmy zakaźny materiał SARS-CoV-2 o wysokim mianie i wysuszyliśmy 35 μ L tego materiału, co odpowiada $\sim 4 \cdot 10^6$ IU/ml w każdym dołku płytki 6-dołkowej. Następnie płytki były albo nie były poddawane działaniu promieniowania UV-C albo poddawane działaniu pięciu reżimów UV-C (**Rys. 1a**). Obejmowało to dezaktywację przez 60 s w pudełku przeznaczonym do dezynfekcji przedmiotów średniej wielkości, 2 s ekspozycji w odległości 5 cm lub 20 cm z **ręcznym urządzeniem do dezynfekcji UV-C VireWall Soluva H** i wreszcie badanie symulujące dekontaminację powierzchni za pomocą ręcznego urządzenia UV-C. W tym celu wykonaliśmy powolne i szybkie poruszanie się w odległości ~ 20 cm, przy czym „powolne” odpowiada prędkości $\sim 3,75$ cm/s (**film uzupełniający 1**) a „szybkie” przy prędkości ~ 12 cm/s (**film uzupełniający 2**).

Natężenie promieniowania UV-C (254 nm) w pudełku z czasem naświetlania 60 sekund odpowiada dawce promieniowania 800 mJ/cm²; dla urządzenia ręcznego (HH) kierowanego z odległości 5 cm dawka UV-C przy czasie naświetlania przez dwie sekundy wynosi 80 mJ/cm², a przy 20 cm 16 mJ/cm². dla „powolnego” i „szybkiego” poruszania się, obliczamy dawkę UV-C wynoszącą 2,13 mJ/cm² (powolne) i 0,66 mJ/cm² (szybkie), zakładając skupioną wiązkę intensywności. Jednak biorąc pod uwagę rozkład światła UV-C pod ręcznym urządzeniem, zintegrowana dawka UV-C kumuluje się do 20 mJ/cm² dla schematu szybkiego poruszania się.

Następnie wysuszony wirus został zrekonstruowany 1 ml pożywki infekcyjnej i użyty do zaszczepienia naiwnych komórek Caco-2 w seryjnych rozcieńczeniach w celu obliczenia miana wirusa. Wykorzystując zakaźny szczep SARS-CoV-2 z ekspresją chromoforu mNeonGreen (**literatura 11**), określiliśmy ilościowo zainfekowane (mNG+) i całkowite (Hoechst+) komórki przez zliczanie pojedynczych komórek za pomocą wielopłytkowego czytnika obrazowania.

Warto zauważyć, że nawet krótkotrwałe naświetlanie zaszuszonego wirusa promieniami UV-C w kontekście schematu „szybkiego” poruszania się całkowicie dezaktywuje SARS-CoV-2, ponieważ nie wykryto zakażonych komórek na podstawie ekspresji białka fluorescencyjnego (**ryc. 1b**). Miareczkowanie dwukrotnych serii rozcieńczeń UV poddanych i niepoddanych promieniowaniu próbek kontrolnych, a także świeżo rozmrożonego szczepu jako odniesienia, wykazało, że suszenie przez dwie godziny nie ma większego wpływu na zakaźność SARS-CoV-2 i wszystkie pięć schematów leczenia przy użyciu UV-C skutecznie dezaktywuje SARS-CoV-2 (**ryc. 1c**). Obliczenie mian wirusa na podstawie miareczkowania zrekonstruowanych zapasów wirusa wykazało, że:

utrata miana w wyniku suszenia z $\sim 4 \cdot 10^6$ do $\sim 3 \cdot 10^6$ IU/ml i skuteczną redukcję miana wirusa SARS-CoV-2 o 6 log przez wszystkie stosowane schematy leczenia UV-C (**ryc. 1d**). Podsumowując, nasze dane wykazują, że schematy UV-C, które eksponują SARS-CoV-2 w wysokim mianie na dawki do 16 mJ/cm² są wystarczające do osiągnięcia całkowitej dezaktywacji wirusa.

Dyskusja

Dezynfekcja powierzchni i aerozoli za pomocą promieniowania UV-C jest uznaną, bezpieczną i niechemiczną procedurą stosowaną do środowiskowej kontroli patogenów (1-3, 12). UV-C okazało się skuteczne wobec kilku wirusów, w tym SARS-CoV-1 ([literatura 4-6](#)) i innych koronawirusów, np. koronawirusów psów ([literatura 13](#)). Tak więc, jak ostatnio wykazali inni badacze ([literatura 8-10](#)), a co zostało obecnie potwierdzone przez nasze badania, oczekiwano, że SARS-CoV-2 jest podatny na dezaktywację przez obróbkę promieniami UV-C. Jednym z krytycznych pytań jest przydatność tej technologii w warunkach „życia codziennego”, w których czas ekspozycji powierzchni lub aerozoli powinien być jak najkrótszy, aby umożliwić realistyczne zastosowanie, na przykład w pomieszczeniach, które muszą być często używane jako sale operacyjne lub wykładowe. Ponadto, w takich warunkach zakładamy, że wirus jest wydychany z zakażonej osoby w postaci kropli i aerozoli, i wysycha na powierzchniach, a więc stanowi zagrożenie dla osób niezakażonych. Przeprowadziliśmy symulację takiej sytuacji i najpierw oceniliśmy, czy SARS-CoV-2 zaschnięty na powierzchni jest zakaźny. Suszenie przez dwie godziny, zgodnie z wcześniejszymi pracami ([literatura 14](#)), nie spowodowało znacznego zmniejszenia zakaźności wirusa, wskazując, że zakażenia spowodowane wymazem mogą rzeczywiście odgrywać rolę w przenoszeniu SARS-CoV-2 ([ryc. 1](#)). Z drugiej strony, nasze preparaty wirusowe są suszone w podłożu buforowanym pH hodowli komórkowych, zawierającym FCS, co może stabilizować cząstki wirusowe. Dlatego, chociaż nie jest to przedmiotem obecnych badań, interesująca będzie ocena, czy dłuższe suszenie lub preparaty wirusa w PBS wpływają na stabilność środowiskową SARS-CoV-2.

Niezależnie od tego ostatniego, naświetlanie promieniami UV-C wysuszonych preparatów SARS-CoV-2 o wysokim mianie, zawierających $\sim 3 \cdot 10^6$ IU/ml, poddano działaniu UV-C, co spowodowało całkowitą redukcję zakaźności wirusa ([ryc. 1](#)). W tym kontekście warto zauważyć, że osiągnęliśmy 6-logową redukcję mian wirusa w warunkach symulujących dezynfekcję powierzchni za pomocą ruchomego urządzenia ręcznego VireWall Soluva H.

W protokole „szybkiego poruszania się”- ([film uzupełniający 1](#)) naświetlaliśmy powierzchnie w odległości 20 cm z prędkością 12,5 cm/s, co skutkowało obliczoną zintegrowaną dawką UV-C 20 mJ/cm^2 przy 254 nm. Jest to znacznie mniej niż wcześniej podawana dawka 1048 mJ/cm^2 konieczna do osiągnięcia 6-logowej redukcji miana wirusa podczas wystawiania wodnego SARS-CoV-2 na działanie UV-C(10). W innym badaniu, przy użyciu źródła UV-LED o długości fali 222 nm, 3 mJ/cm^2 prowadziło do 2,51-logowej (99,7%) redukcji zakaźnego SARS-CoV-2 podczas naświetlania przez 30 s, jednakże dezaktywacja nie zwiększyła się przy przedłużonym schemacie napromieniania do 300 s ([literatura 9](#)). Ponadto, 20 s głębokiego napromieniania 280 nm, co odpowiada dawce 75 mJ/cm^2 , zmniejszyło miano SARS-CoV-2 do 3 logów ([literatura 8](#)). Porównując te wartości z innymi patogenami, SARS-CoV-2 wydaje się szczególnie wrażliwy na światło UV-C. Aby osiągnąć redukcję miana o 3 logi, dla adenowirusa potrzebne jest $75\text{-}130 \text{ mJ/cm}^2$, dla poliovirusa $11\text{-}28 \text{ mJ/cm}^2$, a bakterie takie, jak np. Bacillus subtilis wymagają $18\text{-}61 \text{ mJ/cm}^2$ (7). Jest to zgodne z wrażliwością SARS-CoV na UV-C w aerozolu przy $2,6 \text{ mJ/cm}^2$, podczas gdy adenowirusy lub bakteriofagi MS2 były odporne na takie traktowanie ([literatura 1](#)).

W sumie, ustaliliśmy skuteczność działania UV-C przeciwko SARS-CoV-2 w środowisku zaprojektowanym w celu symulacji realistycznych warunków dekontaminacji. Łatwa, szybka, wolna od chemikaliów i wysoka skuteczność leczenia UV-C w dezaktywacji SARS-CoV-2 wykazuje możliwość zastosowania tej technologii w szerokim zakresie możliwych środowisk.

Wkład autorów

- » Natalia Ruetalo i prof. Michael Schindler zaprojektowali eksperymenty;
- » Natalia Ruetalo przeprowadziła eksperymenty przy wsparciu Ramony Businger;
- » Natalia Ruetalo, Ramona Businger i prof. Michael Schindler analizowali dane;
- » Natalia Ruetalo i prof. Michael Schindler sporządzili rysunki i napisali manuskrypt;
- » Michael Schindler opracował manuskrypt do ostatecznej formy;
- » Michael Schindler zaplanował i nadzorował badanie;
- » Wszyscy autorzy przeczytali, zredagowali i zatwierdzili ostateczną wersję manuskryptu.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

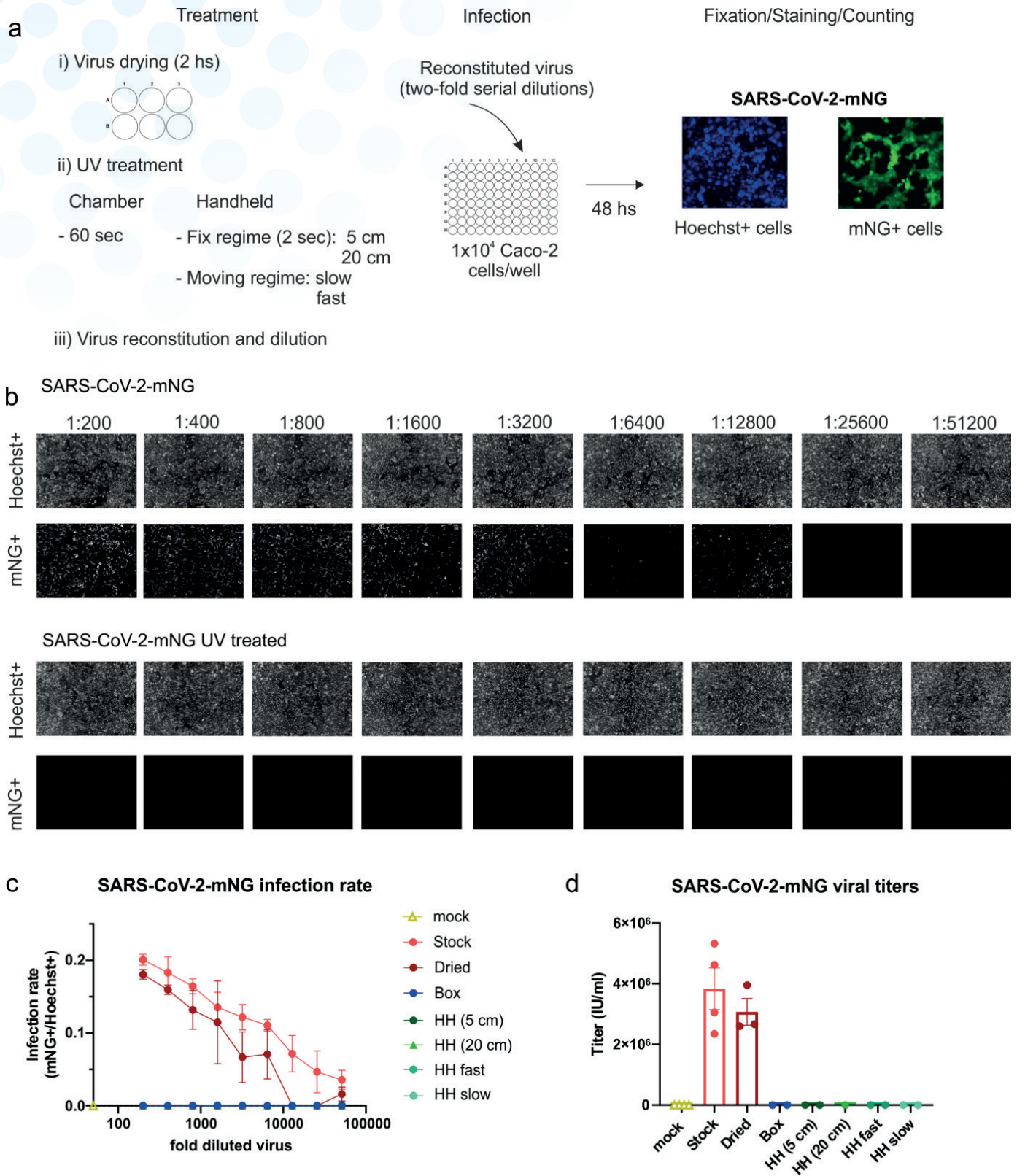
Finansowanie

Praca była wspierana przez granty dla MS od fundacji Badenii-Wirtembergii (BW-Stiftung), Deutsche Forschungsgemeinschaft, MWK Baden-Württemberg, jak również dzięki podstawowemu finansowaniu MS przez Szpital Uniwersytecki w Tübingen. Firma Heraeus dostarczyła komorę Soluva do dezynfekcji UV i ręczne urządzenie do dezynfekcji UV-C VireWall Soluva H oraz zapewniła finansowanie materiałów eksploatacyjnych. Fundatorzy nie mieli wpływu na projekt badania, analizę danych ani decyzję o publikacji danych.

Literatura

1. Walker CM, Ko G. Effect of ultraviolet germicidal irradiation on viral aerosols. *Environ 207 Sci Technol.* 2007;41(15):5460-5.
2. Qureshi Z, Yassin MH. Role of ultraviolet (UV) disinfection in infection control and environmental cleaning. *Infect Disord Drug Targets.* 2013;13(3):191-5.
3. Simmons S, Dale C, Holt J, Velasquez K, Stibich M. Role of Ultraviolet Disinfection in the Prevention of Surgical Site Infections. *Adv Exp Med Biol.* 2017;996:255-66.
4. Duan SM, Zhao XS, Wen RF, Huang JJ, Pi GH, Zhang SX, et al. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomed Environ Sci.* 2003;16(3):246-55.
5. Tsunetsugu-Yokota Y. Large-scale preparation of UV-inactivated SARS coronavirus virions for vaccine antigen. *Methods Mol Biol.* 2008;454:119-26.
6. Darnell ME, Subbarao K, Feinstone SM, Taylor DR. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods.* 2004;121(1):85-91.
7. Malayeri AM, Madjid; Cairns, Bill; Bolton, James. Fluence (UV Dose) Required to Achieve Incremental Log Inactivation of Bacteria, Protozoa, Viruses and Algae. *IUVA News* 222 2016;18: 4-6.
8. Inagaki H, Saito A, Sugiyama H, Okabayashi T, Fujimoto S. Rapid inactivation of SARS-CoV-2 with deep-UV LED irradiation. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1744-7.
9. Kitagawa H, Nomura T, Nazmul T, Omori K, Shigemoto N, Sakaguchi T, et al. Effectiveness of 222-nm ultraviolet light on disinfecting SARS-CoV-2 surface contamination. *Am J Infect Control.* 2020.
10. Heilingloh CS, Aufderhorst UW, Schipper L, Dittmer U, Witzke O, Yang D, et al. Susceptibility of SARS-CoV-2 to UV irradiation. *Am J Infect Control.* 2020.
11. Xie X, Muruato A, Lokugamage KG, Narayanan K, Zhang X, Zou J, et al. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):841-8 e3.
12. Weber DJ, Kanamori H, Rutala WA. „No touch’ technologies for environmental decontamination: focus on ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems. *Curr Opin 234 Infect Dis.* 2016;29(4):424-31.
13. Pratelli A. Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. *Vet J.* 2008;177(1):71-9.
14. 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(16):1564-7.

Ryciny i legenda



Ryc. 1. Dezaktywacja SARS-CoV-2 przez naświetlanie promieniami UV-C.

(a) Układ doświadczalny różnych obróbek UV i zastosowanej próby infekcji z wykorzystaniem wirusa SARS-CoV-2.mNG o zielonej fluorescencji.

(b) Dane pierwotne przedstawiające wyniki badania infekcji przy użyciu nietraktowanego wirusa wyjściowego jako kontroli pozytywnej i wirusa poddanego działaniu UV (HH, schemat szybkiego przemieszczania się). W górnym rzędzie przedstawiono całkowitą ilość komórek (Hoechst+) dla każdego dołka przy dwukrotnym seryjnym rozcieńczeniu wirusa. W dolnym rzędzie, zainfekowane komórki są wizualizowane jako komórki mNG+.

(c) Krzywe szybkości zakażenia dla SARS-CoV-2-mNG napromieniowanego UV przy zastosowaniu różnych metod napromieniania UV. Wykres przedstawia szybkość infekcji przy każdym dwukrotnym seryjnym rozcieńczeniu, obliczoną jako liczbę zakażonych komórek (mNG+) w stosunku do całkowitej liczby komórek (Hoechst+) dla niepoddanego działaniu UV materiału wirusowego (n=4), nie poddanego działaniu promieniowania UV (n=4), wysuszonego wirusa (n=3) oraz wysuszonego i poddanego działaniu promieniowania UV wirusa z zastosowaniem pięciu różnych metod obróbki UV (n=2). Dane są przedstawione jako średnie +/- SEM z liczby biologicznych powtórzeń wskazanych powyżej.

(d) Miano wirusa SARS-CoV-2-mNG po obróbce z użyciem UV. Wykres przedstawia miana wirusów obliczone w IU/mL dla wyizolowanego, nie poddanego działaniu UV i wysuszonego materiału wyjściowego, jak również wysuszonego i napromienionego UV wirusa przy różnych rodzajach obróbki. Liczba powtórzeń biologicznych jest bezpośrednio wykreślona i wskazana w 1c. Dane są przedstawione jako średnie +/- SEM.

Film uzupełniający 1. Napromienianie UV przy użyciu urządzenia ręcznego, schemat powolnego przemieszczania się. SARS-CoV-2-mNG umieszczono na płytce 6-dołkowej, suszono przez dwie godziny i napromieniowano UV, jak pokazano na filmie. Prędkość obliczono na ok. 3,75 cm/s.

Film uzupełniający 2. Napromienianie UV przy użyciu urządzenia ręcznego, schemat szybkiego przemieszczania się. SARS-CoV-2-mNG umieszczono na płytce 6-dołkowej, suszono przez dwie godziny i napromieniowano UV, jak pokazano na filmie. Prędkość obliczono na ok. 12,5 cm/s.