Dane na temat skuteczności czynników chemicznych i fizycznych w inaktywacji wirusa SARS-CoV jako wskazówka do tworzenia efektywnych protokołów inaktywacji wirusa SARS-CoV-2 w laboratoriach diagnostycznych i badawczych.

Michał Różański[1], Aurelia Walczak-Drzewiecka[1], Mirosława Studzińska[2], Dominik Strapagiel[3], Jarosław Dastych[1]

[1]Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź, [2]Proteon Pharmaceuticals S.A., Łódź, [3]Pracownia Biobank, WBiOŚ, Uniwersytet Łódzki, Łódź.

Wstęp

Przygotowując laboratorium diagnostyczne na potrzeby wykrywania wirusa SARS-CoV-2 poszukiwano danych literaturowych wspierających wybór określonych protokołów laboratoryjnych. O ile dane eksperymentalne potwierdzające skuteczność działania czynników chemicznych i fizycznych w inaktywacji aktywności biologicznej wirusa SARS-CoV-2 są jeszcze ograniczone to w literaturze naukowej istnieje wiele informacji na temat skuteczności różnych metod inaktywacji wirusa SARS-CoV. Ze względu na wysoki stopień homologii genetycznej i wynikające z niej podobieństwa budowy tych dwóch wirusów można założyć, że ich wrażliwość na uszkadzające działanie czynników fizycznych i chemicznych będzie bardzo podobne. Dlatego w naszym przeglądzie skupiliśmy się na danych uzyskanych dla SARS-CoV uzupełniając je w niektórych przypadkach o dane dotyczące innych wirusów.Poniżej przedstawiamy przegląd dostępnych danych eksperymentalnych na ten temat.

Zdolność wirusa SARS-CoV do przetrwania w otoczeniu

Wirus SARS-CoV w zawiesinie wodnej jest aktywny przez co najmniej 9 dni, a w formie wysuszonej co najmniej 6 dni [Rabenau i in., 2005]. Wiadomo jednak, że ludzkie koronawirusy mogą przetrwać na różnych suchych powierzchniach 9 [Kampf i in., 2020] lub nawet 45 dni [Pagat i in., 2007]

Koronawirusy MHV i TGEV użyte jako model SARS-CoV na stalowej powierzchni przy wilgotności względnej 20% zachowują aktywność co najmniej przez 28 dni dla 4°C. Przeżywalność wirusów spada wraz ze wzrostem temperatury – co najmniej 7 dni w 20°C i do kilku godzin w 40°C. We wszystkich warunkach aktywność wirusów spada nieznacznie w warunkach wysokiej wilgotności (80%). Badane wirusy najgorzej znoszą umiarkowaną wilgotność – 50% [Casanova i in., 2010].

Najnowsze badania porównujące zdolność do przetrwania wirusa SARS-CoV-2 w porównaniu do SARS-CoV wskazują na porównywalną stabilność obydwu wirusów. Nowy koronawirus wyróżnia się głównie pod względem zdolności do przetrwania na powierzchniach papierowych (czas półtrwania dla SARS-CoV-2 wynoszący 3,64 h w porównaniu do 0,587 h dla SARS-CoV). Obydwa wirusy są najbardziej stabilne na powierzchniach stalowych i plastikowych, z czasami półtrwania odpowiednio 5,63 h i 6,81 h dla nowego koronawirusa oraz 4,16 h i 7,55 h dla wirusa SARS [van Doremalen i in., 2020]. van Doremalen wskazuje również na relatywnie krótki czas przetrwania wirusa na powierzchniach miedzianych (Czas półtrwania 0,77 h, już po 4 godzinach żywe wirusy niewykrywalne). Wirusobójcze właściwości miedzi znajdują zastosowanie np. w ochronie osobistej twarzy - w maskach przeciwwirusowych zawierających miedź [Borkow i in., 2010].

Inaktywacja promieniowaniem gamma

15 kiloradów promieniowania gamma nie wykazuje żadnego efektu inaktywującego na SARS-CoV [Darnell i in., 2004] ale ulega on już pełnej inaktywacji po zastosowaniu dawki 1 megarada. W pracy na ten temat wskazano również na istnienie silniej korelacji pomiędzy wielkością genomu i wrażliwością na promieniowanie, to jest, wirusy z większym genomem są łatwiej inaktywowane niż wirusy z mniejszym genomem [Feldmann i in., 2019]. SARS-CoV-2 ma genom wielkości 29811 nukleotydów pojedynczej, dodatniej nici RNA [Chen i in., 2020; Sah i in., 2020]. Dla porównania SARS-CoV, izolat Tor2 ma genom 29751 nukleotydów [Marra i in., 2003]. Obydwa wirusy powinny wykazywać zbliżoną podatność na promieniowanie. Jednocześnie, koronawirus MERS-CoV ulega pełnej inaktywacji dopiero po zastosowaniu dawki 2 megaradów [Kumar i in., 2015], przy genomie wielkości około 30000 nukleotydów.

Inaktywacja UV

Promieniowanie UV-A nie wpływa na aktywność próbek SARS-CoV. Do inaktywacji próbki wirusa w zawiesinie o głębokości 1 cm należy zastosować promieniowanie UV-C, próbka 3 cm od lampy, czas 15 minut [Darnell i in., 2004]; 80 cm do lampy wymaga 1 h do pełnej inaktywacji [Duan i in., 2003].

Inaktywacja za pomocą mikrofal

Nie znaleziono danych dotyczących wirusa SARS-CoV. Wiadomo, że mikrofale o częstotliwości 2,45 MHz istotnie wpływają na aktywność modelowego wirusa MS2. Zastosowanie urządzenia o mocy 700 W i czasie ekspozycji aerosolu MS2 1,7 minuty pozwoliło w 90% inaktywować cząstki wirusa. Uszkodzenia obserwowano zarówno w komponentach białkowych jak i RNA [Wu i Yao, 2014]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku wirusów HCV i HIV-1, przy stosowaniu mikrofal w czasie nie krótszym niż 2 minuty i mocy nie niższej niż 600 W [Siddharta i in., 2016]. Z kolei zastosowanie mikrofal (900 W, 2 min) na wymazówki z APV, IBV, NDV, AIV inaktywowało wirusy, wciąż umożliwiając zastosowanie techniki RT-PCR do ich detekcji [Elhafi i in., 2004].

Inaktywacja termiczna

W wypadku zawiesin wodnych 30 minut w 56°C zapewniało skuteczną inaktywację SARS-CoV w próbkach, które nie zawierały białka. Po inaktywacji zawiesiny cząstek wirusa w 20% roztworze białka obserwowano resztkową aktywność próbki. Płyny skażone wirusem zawierające białko należy inaktywować co najmniej w 60°C przez 30 min [Rabenau i in., 2005]. Inna praca pokazuje resztkową aktywność SARS-CoV nawet po godzinie w 65°C, zalecając minimum 45 min w 75°C do zupełnej inaktywacji [Darnell i in., 2004]. W obydwu pracach inaktywacja termiczna (w wyższych temperaturach) przedstawiona jest jako pewny sposób dekontaminacji. Pagat powtarza obserwacje kolegów zauważając resztkową aktywność wirusa po godzinie inkubacji zawiesiny SARS-CoV w 58°C i brak takiej aktywności po godzinie w 68°C. W dyskusji proponuje jako *standardową procedurę dekontaminacji mokrych odpadów – 2 godziny inkubacji w silnie zasadowym środowisku a następnie 30 minut w autoklawie w 105°C. W przypadku suchych odpadów i sprzętu laboratoryjnego: 126°C, 120 minut* [Pagat i in., 2007].

Wpływ pH

Silnie kwasowe (3 lub mniej) lub silnie zasadowe (12 lub więcej) pH inaktywuje wirusa SARS-CoV po godzinie inkubacji w temperaturze pokojowej. W 4°C inaktywacja w kwaśnym roztworze jest mocno spowolniona [Darnell i in., 2004]. Godzina w pH 11 nie jest wystarczająca do inaktywacji wirusa SARS-CoV. Pół godziny w pH 13 powoduje, że aktywność próbki wirusa jest już niewykrywalna [Pagat i in., 2007].

Inaktywacja chemiczna

Zestawienie czasów działania popularnych środków dezynfekujących oraz utrwalających wraz z badanym stężeniem tych związków przedstawiono w **Tabeli 1**.

Dla modelowego koronawirusa TGEV potwierdzono również skuteczność dezynfekcji metodą par nadtlenku wodoru [Goyal i in., 2014]. Ta metoda jest niezwykle skuteczna w dezynfekcji aparatury laboratoryjnej (również inkubatorów nie posiadających funkcji sterylizacji termicznej), pomieszczeń i miejsc trudno dostępnych innymi metodami.

Tabela 1. Stężenia i czasy działania dla dezynfektantów chemicznych

Czynnik dezynfekujący	Stężenie	Czas inaktywacji	Literatura
Etanol	70%	1 min	*Rabenau i in., 2005*
Podchloryn sodu	0,05-0.1% 0,1%	5 min 1 min	
2-propanol	100% 70%	30 s 30 s	
Sterillium	(45% 2-propanol, 30% 1-propanol)	30 s	
Ocet winny	6% kwas octowy	1 min	
Formaldehyd	0,7% 1%	2 min 2 min	
Glutaraldehyd	0,5%	2 min	
Triklosan	*0,05%*	*30 s*	*Dellanno i in., 2009*
Chloroksylenol (PCMX)	*0,12%*	*30 s*	
Podchloryn sodu	*0,21%*	*30 s*	
Olejek sosnowy	*0,23%*	*30 s*	

Inaktywacja próbek laboratoryjnych

Obecnie (16 marca 2020) detekcja przy pomocy qRT-PCR uznawana jest za złoty standard w klinicznej diagnostyce koronawirusa SARS-CoV-2. Ponieważ większość metod fizycznych i chemicznych jest niszcząca dla RNA, nie należy ich stosować w przypadku tego rodzaju diagnostyki. Jednakże, zgodnie z obecną wiedzą, izolacja materiału genetycznego wirusów przy pomocy komercyjnych odczynników jak TRIzol® LS Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) lub AVL Buffer (Qiagen, Valencia, CA) dezaktywuje całkowicie wirusy z rodzajów Alfawirus, Buniawirus, Filowirus i Flawiwirus [Blow i in., 2004]. Kochel potwierdza inaktywujące działanie Trizolu na rodziny Togaviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae i Paramyxoviridae dla testowanych mian wirusowych dochodzących do 10^8,3 jednostki/ml. W tym badaniu wykorzystano MERS-CoV jako przykład koronawirusa [Kochel i in., 2017]. Jednocześnie, Smither wskazuje, że bufor AVL sam w sobie nie jest wystarczający do pełnej inaktywacji próbek klinicznych wirusa Ebola i do tego celu próbka wymaga dodatkowo ogrzania (60°C, 15 min.) [Smither i in., 2015]. Specyficznie dla MERS-CoV potwierdzona skuteczność inaktywacji przy pomocy zarówno Trizolu jak i AVL [Kumar i in., 2015].

Inaktywacja przy produkcji pozakomórkowych składników krwi

Darnell wskazuje na użyteczność inaktywacji termicznej (60°C, 30 min), naświetlania UV-C (40 min) oraz wykorzystania metody rozpuszczalnik/detergent (2; 4 i 24 godziny odpowiednio dla 1% Tritonu X-100; 1% Tweenu 80 lub 0,2% cholanu sodu) w celu inaktywacji wirusa SARS-CoV w procesie otrzymywania pozakomórkowych produktów krwiopochodnych [Darnell i in., 2006]. Koncentraty płytek krwi można inaktywować stosując ¾ dawki UV-C (0,15 J/cm^2), zaś osocze, po dodaniu błękitu metylenowego (absorbuje zielone światło i wytwarza tlen singletowy), naświetlając światłem białym o dawce 120 J/cm^2 [Eickmann i in., 2020].

Literatura:

Chen L, Liu W, Zhang Q, i in. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):313-319

Blow JA, Dohm DJ, Negley DL, Mores CN. Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. J Virol Methods. 2004 Aug;119(2):195-8

Borkow G, Zhou SS, Page T, Gabbay J. A novel anti-influenza copper oxide containing respiratory face mask. PLoS One. 2010 Jun 25;5(6):e11295

Casanova LM, Jeon S, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. Appl Environ Microbiol. 2010 May;76(9):2712-7

Darnell ME, Subbarao K, Feinstone SM, Taylor DR. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. J Virol Methods. 2004 Oct;121(1):85-91

Darnell ME, Taylor DR. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. Transfusion. 2006 Oct;46(10):1770-7

Dellanno C, Vega Q, Boesenberg D. The antiviral action of common household disinfectants and antiseptics against murine hepatitis virus, a potential surrogate for SARS coronavirus. Am J Infect Control. 2009 Oct;37(8):649-52.

van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, i in. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. N Engl J Med. 2020 Mar 17

Duan SM, Zhao XS, Wen RF, i in. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. Biomed Environ Sci. 2003 Sep;16(3):246-55

Eickmann M, Gravemann U, Handke W, i in. Inactivation of three emerging viruses - severe acute respiratory syndrome coronavirus, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus and Nipah virus - in platelet concentrates by ultraviolet C light and in plasma by methylene blue plus visible light. Vox Sang. 2020 Jan 12

Elhafi G, Naylor CJ, Savage CE, R. C. Jones RC. Microwave or autoclave treatments destroy the infectivity of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus but allow detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Avian Pathology. 2004.

Feldmann F, Shupert WL, Haddock E, i in. Gamma Irradiation as an Effective Method for Inactivation of Emerging Viral Pathogens. Am J Trop Med Hyg. 2019 May;100(5):1275-1277

Goyal SM, Chander Y, Yezli S, Otter JA. Evaluating the virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour. J Hosp Infect. 2014 Apr;86(4):255-9. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.003. Epub 2014 Feb 27

Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020 Mar;104(3):246-251. doi: 10.1016/j.jhin.2020.01.022. Epub 2020 Feb 6.

Kochel, T.J., Kocher, G.A., Ksiazek, T.G., Burans, J.P., 2017. Evaluation of TRIzol LS inactivation of viruses. Appl. Biosaf. 22, 52–55

Kumar M, Mazur S, Ork BL, i in. Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. J Virol Methods. 2015 Oct;223:13-8

Marra MA, Jones SJ, Astell CR, i in. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science. 2003 May 30;300(5624):1399-404

Pagat AM, Seux-Goepfert R, Lutsch **C,** i in. Evaluation of SARS-Coronavirus Decontamination Procedures. Applied Biosafety, 12(2) pp. 100-108

Rabenau HF, Cinatl J, Morgenstern B, i in. Stability and inactivation of SARS coronavirus. Med Microbiol Immunol. 2005 Jan;194(1-2):1-6

Sah R, Rodriguez-Morales AJ, Jha R, i in. Complete Genome Sequence of a 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Strain Isolated in Nepal. Microbiol Resour Announc. 2020 Mar 12;9(11). pii: e00169-20

Siddharta, A., Pfaender, S., Malassa, A. i in. Inactivation of HCV and HIV by microwave: a novel approach for prevention of virus transmission among people who inject drugs. Sci Rep. 2016. 6, 36619

Smither SJ, Weller SA, Phelps A, i in. Buffer AVL Alone Does Not Inactivate Ebola Virus in a Representative Clinical Sample Type. J Clin Microbiol. 2015 Oct;53(10):3148-54

Wu Y, Yao M. In situ airborne virus inactivation by microwave irradiation. Chin. Sci. 2014. Bull. 59, 1438–1445