

L'irradiazione UV-C è altamente efficace nell'inattivare e inibire la replicazione di SARS-CoV-2

Andrea Bianco ^{1, §}, Mara Biasin ^{2, §}, Giovanni Pareschi ¹, Adalberto Cavalieri ³, Claudia Cavatorta ³, Claudio Fenizia ², Paola Galli ¹, Luigi Lessio ⁴, Manuela Lualdi ⁵, Edoardo Redaelli ¹, Irma Saulle ^{2,6}, Daria Trabattoni ², Alessio Zanutta ¹, Mario Clerici ^{6,7, *}

¹ *Istituto Nazionale Italiano di Astrofisica (INAF) - Osservatorio Astronomico di Brera, Merate, Italia.*

² *Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche L. Sacco, Università di Milano, Milano, Italia.*

³ *Unità di Epidemiologia e Prevenzione, Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia.*

⁴ *Istituto Nazionale Italiano di Astrofisica (INAF) - Osservatorio Astronomico di Padova, Padova, Italia.*

⁵ *Dipartimento di Diagnostica per Immagini e Radioterapia, Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia.*

⁶ *Dipartimento di Fisiopatologia e Trapianti, Università di Milano, Milano, Italia.*

⁷ *Fondazione Don C. Gnocchi, Fondazione IRCCS, Milano, Italia.*

I potenziali effetti virucidi dell'irradiazione UV-C su SARS-CoV-2 sono stati valutati sperimentalmente per diverse dosi di illuminazione e concentrazioni di virus (1000, 5, 0,05 MOI). Sia l'inattivazione del virus che l'inibizione della replicazione sono state studiate in funzione di questi parametri. Con una densità del virus paragonabile a quella osservata nell'infezione da SARS-CoV-2, una dose di UV-C di appena 3,7 mJ / cm² era sufficiente per ottenere un'inattivazione di 3 log e la completa inibizione di tutte le concentrazioni virali è stata osservata con 16,9 mJ / cm². Questi risultati potrebbero spiegare le tendenze epidemiologiche di COVID-19 e sono importanti per lo sviluppo di nuovi metodi di sterilizzazione per contenere l'infezione da SARS-CoV-2.

La pandemia COVID-19 causata dal virus SARS-CoV-2 ¹ ha avuto un enorme, ancora a malapena compreso, impatto sulla salute e prospettive economiche a livello globale ². L'identificazione di un microbicida efficace approccio è di fondamentale importanza al fine di limitare l'ulteriore diffusione virale, come può essere il virus trasmessa tramite aerosol ³ e può sopravvivere per ore fuori dal corpo ⁴. In questo contesto, non contatto le tecnologie di disinfezione sono altamente desiderabili e la radiazione UV, in particolare UV-C (200-280 nm), è una delle l'approccio più affidabile e ampiamente accettato ⁵⁻⁸. L'interazione delle radiazioni UV-C con i virus è stata ampiamente studiato ⁹, e il meccanismo più comune consiste nell'assorbimento diretto del fotone UV-C da parte di la base degli acidi nucleici e / o le proteine del capsido che portano alla generazione di fotoprodotto che inattivano il virus ^{10,11}. Sono stati proposti alcuni modelli per correlare la struttura dell'acido nucleico con la dose richiesta per inattivare il virus, ma siamo lontani da un modello affidabile ¹². Ciò è anche dovuto al fatto che UV-C le misurazioni sono state condotte utilizzando diversi virus e diverse condizioni sperimentali ¹³⁻¹⁶. Questo ha portato a una gamma estremamente ampia di valori per lo stesso virus e, ad esempio, nel caso dei valori SARS-COV-1 riportati in la letteratura varia da pochi mJ / cm² a centinaia mJ / cm² ^{13,16,17}. È quindi fondamentale avere una diretta

NOTA: questo pre stampa riporta una nuova ricerca che non è stata certificata dalla revisione tra pari e non deve essere utilizzata per guidare la pratica clinica.

evidenze del meccanismo di disinfezione UV-C su SARS-CoV-2 con le dosi corrispondenti, sapendo che il

La luce UV della luce solare sembra essere efficace nell'inattivare il virus ¹⁸.

Riportiamo qui l'effetto di UV-C monocromatico (254 nm) su SARS-CoV-2, dimostrando che entrambi i virus

l'inattivazione e l'inibizione possono essere facilmente raggiunte. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un progetto personalizzato

sistema con lampada al mercurio a bassa pressione, che è stato calibrato spettralmente fornendo un'intensità media di

1.082 mW / cm² sopra l'area di illuminazione (vedere le informazioni supplementari per i dettagli). Tre

diversi tempi di esposizione dell'illuminazione, corrispondenti a 3,7, 16,9 e 84,4 mJ / cm² sono stati somministrati a

SARS-CoV-2 a una molteplicità di infezione (MOI) di 0,05, 5, 1000. La prima concentrazione è equivalente

alla contaminazione di basso livello osservata in ambienti chiusi (es. stanze di ospedale), il secondo

corrisponde alla concentrazione media trovata nell'espettorato dei pazienti infetti da COVID-19 e la terza

uno è una concentrazione molto grande, corrispondente a quella osservata nel COVID-19 malato terminale

pazienti ¹⁹. Dopo l'esposizione a UV-C, la replicazione virale è stata valutata mediante reazione a catena della polimerasi in tempo reale

(PCR) mirando a due regioni (N1 e N2) del gene nucleocapsidico SARS-CoV-2, nonché analizzando SARS-

Effetto citopatico indotto da CoV-2. Le analisi sono state eseguite nel supernatante di coltura di cellule infette a

tre diversi punti temporali (24, 48 e 72 ore per SARS-CoV-2 a MOI 1000 e 5; 24, 48 ore e 6 giorni

per SARS-CoV-2 a MOI 0,05) e sui lisati cellulari alla fine della coltura cellulare (72 ore: MOI 1000 e

5; 6 giorni: MOI 0,05).

L'effetto dell'esposizione UV-C era estremamente evidente indipendentemente dal MOI impiegato; dose-

risposta e curve dipendenti dal tempo. La figura 1 riporta il numero di copie di SARS-CoV-2

per le tre concentrazioni in funzione della dose e del tempo di UV-C, quantificate su una curva standard da a

controllo plasmidico (le corrispondenti curve normalizzate sono riportate nelle informazioni supplementari,

figura S3).

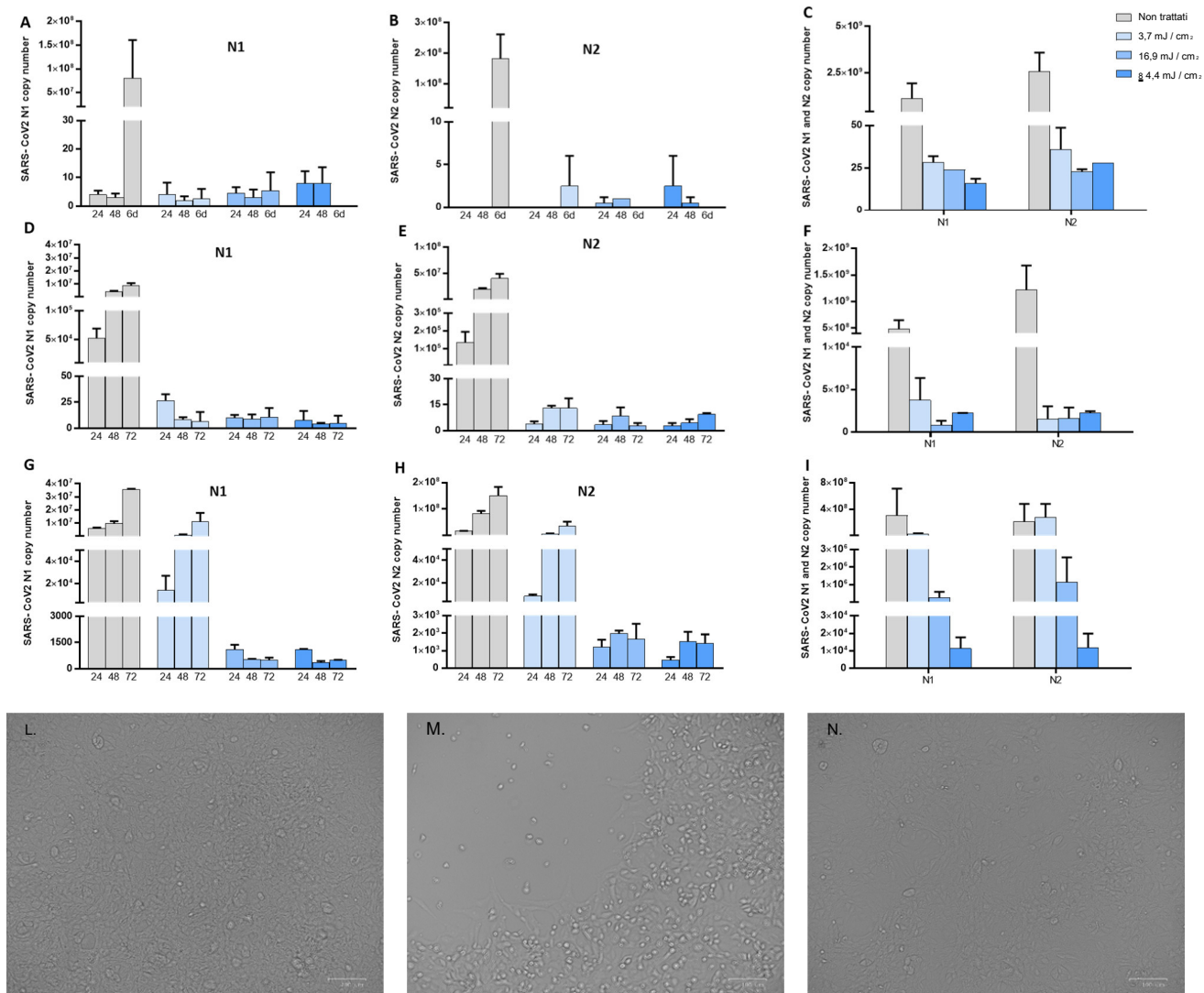


Figura 1. Replicazione virale del virus SARS-CoV-2 irradiato con raggi UV in cellule VeroE6 in vitro. Le cellule Vero E6 sono state infettate con UV-C irradiato Virus SARS-CoV-2 a un MOI di 0,05 (A, B e C), 5 (D, E e F) o 1000 (G, H e I). I supernatanti di coltura sono stati raccolti presso il i tempi indicati (24, 48, 72 ore e 6 giorni) e i titoli dei virus sono stati misurati mediante quantificazione del numero di copie assoluto (Real-Time PCR) (A, B, D, E, G e F). La replicazione virale è stata valutata sul lisato cellulare raccolto alla fine delle colture cellulari a 72 ore (5 e 1000 MOI) (pannello F e I) e 6 giorni (0,05 MOI) (pannello C) dopo l'infezione. Tutte le condizioni di coltura cellulare sono state seminate in duplicato. (L) No è stato osservato un effetto citopatico in monostrati di VeroE6 coltivati non infetti mantenuti a 50 mJ / cm² Terreno completo trattato con UV per 72 ore. (M) L'infezione in vitro di cellule SARS-CoV-2 (5 MOI) UV-C non trattate VeroE6 ha provocato un evidente effetto citopatico. (N) SARS-Irradiazione CoV-2 con 3,7 mJ / cm² UV-C ha salvato l'effetto citopatico indotto dal virus UV-C non trattato.

Non è stato possibile osservare la replicazione virale per le prime 48 ore alla concentrazione più bassa (0,05 MOI) in campioni non trattati o irradiati con UV-C. Tuttavia, 6 giorni dopo l'infezione, la replicazione virale era distintamente evidente nella condizione UV-C non esposta, ma è stata completamente inibita dopo l'irradiazione UV-C anche a

3,7 mJ / cm² in entrambi i supernatanti di colture cellulari (Figura 1, pannello A e B, figura S3) e lisato cellulare (Figura 1, pannello C).

Alla concentrazione virale intermedia (5 MOI), un'efficace riduzione del numero di copie a partire dal 3,7 mJ / cm² dose con una diminuzione di un fattore di 2000 (diminuzione > 3 log) dopo 24 ore (Figura 1, pannello D e Figura S3) è stata osservata. Ancora più importante, il valore del numero di copie non è aumentato nel tempo, suggerendo un'efficace inattivazione del virus, ulteriormente confermata dalla valutazione dell'effetto citopatico (Figura 1, pannello L, M e N). Le dosi più elevate di UV-C hanno seguito la stessa tendenza (Figura 1, pannello D ed E).

La valutazione della replicazione virale a livello intracellulare ha ulteriormente corroborato l'effetto UV-C antivirale (Figura 1, pannello F). Pertanto, a questo input virale l'esposizione a una dose minima di 3,7 mJ / cm² provoca l'esaurimento virale.

Il risultato era diverso con l'input virale più elevato (1000 MOI). In effetti, la replicazione virale in modo significativo è diminuita in modo dose-dipendente UV-C già nelle 24 ore con un fattore 10³ a 3,7 mJ / cm² e 10⁴ a 16,9 mJ / cm² (come riportato in figura S3). Dopo 48 ore, la concentrazione virale è aumentata nelle colture esposte alla dose più bassa di UV-C, mentre è rimasto stabile per 16,9 e 84,4 mJ / cm² dosi, coerente con i risultati a 72 ore (Figura 1, pannello G e H). I risultati sono stati confermati dalla valutazione di replicazione virale a livello intracellulare (Figura 1, pannello I). Questo indica chiaramente che l'input virale residuo è rimasto di 3,7 mJ / cm² era in grado di replicarsi e abbastanza per generare un'infezione efficace. quindi, il la parziale inattivazione dell'input virale ha portato ad un'inibizione dell'infezione. Questo non è il caso delle colture esposti a dosi UV-C più elevate, poiché in queste condizioni non è stata rilevata alcuna replicazione.

In conclusione, le radiazioni UV-C inibiscono SARS-CoV-2 e la risposta dipende sia dalla dose di UV-C che dalla concentrazione di virus. Infatti, per concentrazioni di virus tipiche di ambienti chiusi contaminati di basso livello e espettorato di pazienti infetti da COVID-19, una dose molto piccola inferiore a 4 mJ / cm² era abbastanza per ottenere completa inattivazione del virus. Anche alla massima concentrazione di input virale (1000 MOI), la replicazione virale era totalmente inattivata a una dose $\geq 16,9$ mJ / cm². Questi risultati sono estremamente importanti poiché consentono a progettazione e sviluppo adeguati di metodi di disinfezione basati su UV efficienti per contenere SARS-CoV-2 infezione.

Ringraziamenti

Questa ricerca è stata parzialmente supportata da un finanziamento di Falk Renewables ed è stata svolta nel contesto delle attività promosse dal Governo Italiano ed in particolare dai Ministeri della Salute e dell'Università e della Ricerca, contro la pandemia COVID-19. Gli autori sono grati al Presidente dell'INAF, Prof. N. D'Amico, per il supporto e per una lettura critica del manoscritto.

Riferimenti

1. Zhu, N. *et al.* Un nuovo Coronavirus da pazienti con polmonite in Cina, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
2. Cobey, S. Modellazione delle dinamiche delle malattie infettive. *Scienza*. **368**, 713–714 (2020).
3. van Doremalen, N. *et al.* Aerosol e stabilità della superficie di SARS-CoV-2 rispetto a SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1564–1567 (2020).
4. Stadnytskyi, V., Bax, CE, Bax, A. & Anfinrud, P. La durata nell'aria di piccole goccioline vocali e la loro potenziale importanza nella trasmissione SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 202006874 (2020) doi: 10.1073 / pnas.2006874117.
5. Pirnie, M., Linden, KG & Malley, JPJ Manuale di guida alla disinfezione con ultravioletti per la regola finale di trattamento delle acque superficiali 2 migliorata a lungo termine. *Environ. Prot.* **2**, 1–436 (2006).
6. Reed, NG La storia dell'irradiazione germicida ultravioletta per la disinfezione dell'aria. *Rappresentante della sanità pubblica* **125**, 15–27 (2010).
7. Chang, JC *et al.* Inattivazione UV di microrganismi patogeni e indicatori. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1361–1365 (1985).
8. Kovalski, W. *Manuale di irradiazione germicida ultravioletta: UVGI per la disinfezione dell'aria e delle superfici.* (Springer Science & Business Media, 2010).
9. Rauth, AM Lo stato fisico dell'acido nucleico virale e la sensibilità dei virus alla luce ultravioletta. *Biophys. J.* **5**, 257–273 (1965).
10. Qiao, Z. e Wigginton, reazioni fotochimiche dirette e indirette KR nell'RNA virale misurate con RT-qPCR e spettrometria di massa. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 13371–13379 (2016).
11. Wigginton, KR & Kohn, T. Meccanismi di disinfezione del virus: il ruolo della composizione, struttura e funzione del virus. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 84–89 (2012).
12. Lytle, CD & Sagripanti, J.-L. Inattivazione prevista dei virus rilevanti per la biodifesa mediante radiazione solare. *J. Virol.* **79**, 14244–14252 (2005).
13. Walker, CM & Ko, G. Effetto dell'irradiazione germicida ultravioletta sugli aerosol virali. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5460–5465 (2007).
14. McDevitt, JJ, Rudnick, SN & Radonovich, LJ Sensibilità aerosol del virus influenzale alla luce UV-C. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1666–1669 (2012).
15. Calgua, B. *et al.* Inattivazione UVC dei virus dsDNA e ssRNA nell'acqua: fluenze UV e un approccio basato su qPCR per valutare il decadimento dell'infettività virale. *Food Environ. Virol.* **6**, 260–268 (2014).

16. Eickmann, M. *et al.* Inattivazione di tre virus emergenti - coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave, virus della febbre emorragica della Crimea-Congo e virus Nipah - nei concentrati piastrinici mediante luce ultravioletta C e nel plasma mediante blu di metilene più luce visibile. *Vox Sang.* **115**, 146–151 (2020).
17. Duan, S.-M. *et al.* Stabilità del coronavirus SARS in campioni umani e ambiente e sua sensibilità al riscaldamento e all'irraggiamento UV. *Biomed. Environ. Sci.* **16**, 246–255.
18. Rathesar-Shumate, S. *et al.* La luce solare simulata disattiva rapidamente SARS-CoV-2 sulle superfici. *J. Infect. Dis.* 1–9 (2020) doi: 10.1093 / infdis / jiaa274.
19. Wölfel, R. *et al.* Valutazione virologica dei pazienti ospedalizzati con COVID-2019. *Natura* **581**, 465– 469 (2020).

Informazione supplementare

L'irradiazione UV-C è altamente efficace nell'inattivare e inibire la replicazione di SARS-CoV-2

Andrea Bianco ^{1, §}, Mara Biasin ^{2, §}, Giovanni Pareschi ¹, Adalberto Cavalieri ³, Claudia Cavatorta ³, Claudio Fenizia ², Paola Galli ¹, Luigi Lessio ⁴, Manuela Lualdi ⁵, Edoardo Redaelli ¹, Irma Saulle ^{2,6}, Daria Trabattoni ², Alessio Zanutta ¹, Mario Clerici ^{6,7,*}

¹ *Istituto Nazionale Italiano di Astrofisica (INAF) - Osservatorio Astronomico di Brera, Merate, Italia.*

² *Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche L. Sacco, Università di Milano, Milano, Italia.*

³ *Unità di Epidemiologia e Prevenzione, Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia.*

⁴ *Istituto Nazionale Italiano di Astrofisica (INAF) - Osservatorio Astronomico di Padova, Padova, Italia.*

⁵ *Dipartimento di Diagnostica per Immagini e Radioterapia, Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia.*

⁶ *Dipartimento di Fisiopatologia e Trapianti, Università di Milano, Milano, Italia.*

⁷ *Fondazione Don C. Gnocchi, Fondazione IRCCS, Milano, Italia.*

In vitro Test di infezione da SARS-CoV-2

3 x 10⁵ Le cellule VeroE6 sono state coltivate in DMEM (Euroclone, Milano, Italia) con terreno FBS al 2%, con 100 U / ml di penicillina e 100 • streptomina g / ml, in una piastra da 24 pozzetti un giorno prima del test di infezione virale. SARS-CoV-2 (Virus Human 2019-nCoV strain 2019- nCoV / Italy-INMI1, Roma, Italia) a una molteplicità di infezione (MOI) di

1000, 5 e 0,05 sono stati trattati con diverse dosi di radiazioni UV-C (vedere la sezione dedicata) prima dell'inoculo nelle cellule VeroE6. Il virus UV-C non trattato è servito come controllo positivo. Le colture cellulari sono state incubate con l'inoculo del virus in duplicato per tre ore a 37 ° C e 5% di CO₂. Quindi, le cellule sono state risciacquate tre volte con PBS caldo, reintegrate con il mezzo di crescita appropriato e osservate quotidianamente per l'effetto citopatico.

La replicazione virale nei supernatanti della coltura è stata valutata a 24, 48 e 72 ore dopo l'infezione (hpi) mentre le cellule infette sono state raccolte per la raccolta dell'RNA a 72 hpi. Le colture cellulari da SARS-CoV-2 a 0,05 MOI sono state raccolte 6 giorni dopo l'infezione. L'RNA è stato estratto dal supernatante della coltura cellulare VeroE6 e dal lisato cellulare dallo strumento Maxwell® RSC con il kit Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Fitchburg, WI, USA) e retrotrascritto in cDNA come descritto in precedenza (Promega, Fitchburg, WI, USA). La PCR in tempo reale è stata eseguita su un CFX96 (Bio-Rad, CA, USA) utilizzando il kit di emergenza del test della sonda qPCR CDC 2019-nCoV (IDT, Iowa, USA), che prende di mira due regioni (N1 e N2) del gene nucleocapside di SARS-CoV-2. La quantificazione della copia virale è stata valutata creando una curva standard dal controllo plasmidico positivo 2019-nCoV_N quantificato (IDT,

Test di illuminazione UV

L'illuminazione della soluzione virale è stata condotta utilizzando una lampada a mercurio a bassa pressione montata in un supporto progettato su misura, che consiste in una scatola con un'apertura circolare di 50 mm di diametro posta a circa 220 mm dalla sorgente. L'apertura funziona come un filtro spaziale per rendere più uniforme l'illuminazione dell'area retrostante. È presente anche un otturatore meccanico per avviare il processo di illuminazione. La piastra è posta 30 mm al di sotto dell'apertura circolare e dall'alto è stata irradiata una sola sede (34,7 mm di diametro), centrata rispetto all'apertura di 50 mm. La dimora è stata riempita con 0,976 ml di virus sospesi nel mezzo di Eagle modificato di Dulbecco (DMEM) in modo da avere uno strato liquido spesso 1 mm. Dopo l'irradiazione, il campione è stato trattato come descritto nella sezione precedente.

L'intensità della lampada e le sue proprietà spettrali sono state misurate utilizzando uno spettrometro Ocean Optics HR2000 + (Ocean Optics Inc., Dunedin, USA). Lo spettrometro HR2000 + è stato calibrato contro una sorgente di deuterio-alogeno di riferimento (Ocean Optics Inc. Winter Park, Winter Park, Florida) e in conformità

con le pratiche del National Institute of Standards and Technology (NIST) consigliate nel Manuale NIST 1502E, Guida tecnica per le misurazioni delle radiazioni ottiche. L'ultima calibrazione è stata eseguita a marzo 2019. Il rivelatore del nostro spettrometro è un array CCD (Charge-Coupled Device) ad alta sensibilità da 2048 elementi di Sony. La gamma spettrale è 200–1100 nm con una fenditura di ingresso di 25 μm e una risoluzione ottica di 1,4 nm (FWHM). La sonda di irraggiamento corretta per il coseno, modello CC-3-UV-T, è fissata alla punta di una fibra ottica lunga 1 m e si accoppia allo spettrometro. L'intensità della lampada è stata misurata posizionando lo spettrometro in cinque posizioni: al centro e alle estremità di una traversa da 20 mm dopo un tempo di riscaldamento di 30 s. Gli spettri nelle cinque posizioni sono riportati in figura S1 insieme a uno schema dell'area di abitazione e illuminata.

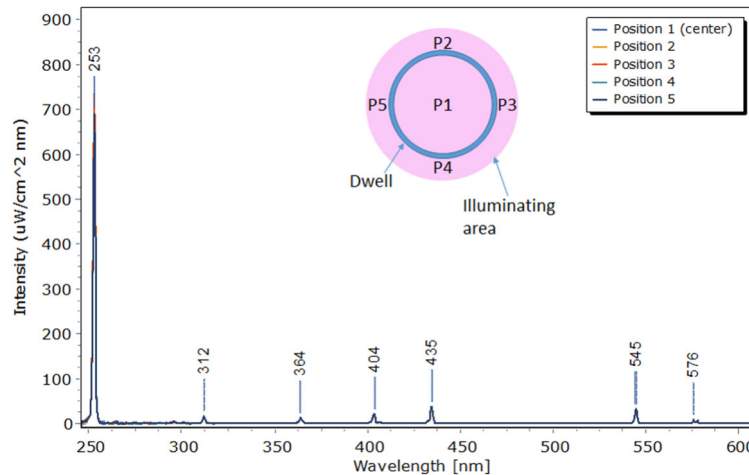


Figura S1. Spettro della lampada al mercurio misurato nelle cinque posizioni. Riquadro: schema della sosta illuminata e della posizione di misura.

Come previsto, l'emissione è dominata dalla linea UV-C e la sua intensità è stata uniforme nell'area con un valore medio di 1082 uW / cm^2 . La stabilità della lampada è stata valutata in $\pm 11 \text{ uW} / \text{cm}^2$ durante una misurazione di 130 s. In base a questo valore sono stati impostati tre tempi di esposizione: 5, 23 e 114 s (con una precisione di 0,2 s), che corrispondono alle seguenti dosi: 5,5, 25,0, 124,4 mJ / cm^2 . Queste sono le dosi nominali di UV fornite all'abitazione, ma eravamo interessati alle dosi efficaci che raggiungono il virus. Pertanto, abbiamo misurato lo spettro di assorbimento UV-vis del Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) in una cuvetta di quarzo (spessore 1 mm) mediante uno spettrofotometro Jasco V770 (Figura S2). Questo spessore è lo stesso della soluzione nell'abitazione durante la fase di irradiazione UV.

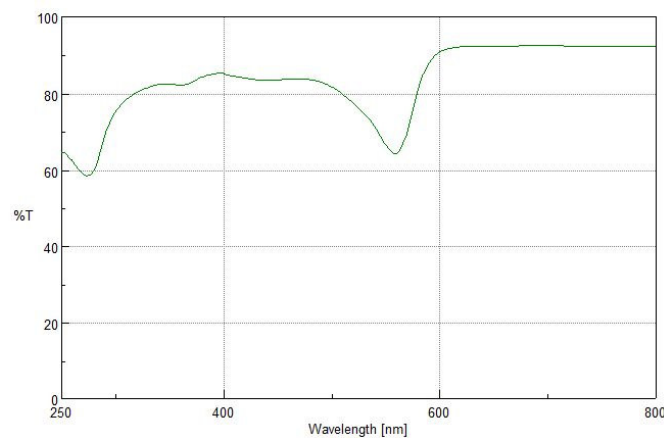


Figura S2. Spettro di trasmissione UV-vis del Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) in una cuvetta al quarzo da 1 mm.

La trasmittanza a 254 nm è stata innanzitutto corretta dalle perdite per riflessione della cuvetta in quarzo; si è quindi tenuto conto della perdita di riflessione dovuta all'interfaccia aria-acqua e di una trasmittanza finale di

È stato calcolato 0,68 a 254 nm. Secondo questo valore, le dosi efficaci fornite ai virus erano:
 $3,7 \pm 0,15$, $16,9 \pm 0,2$ e $84,4 \pm 0,9$ mJ / cm².

Grafici della frazione virale in funzione della dose UV e del tempo.

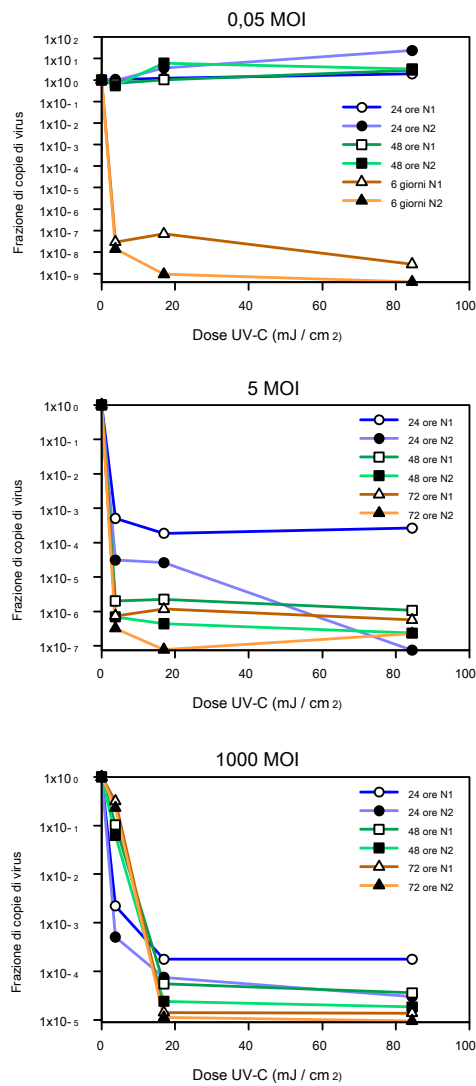


Figura S3. I grafici delle copie del virus misurate si sono normalizzati sul campione non trattato nelle diverse condizioni.