



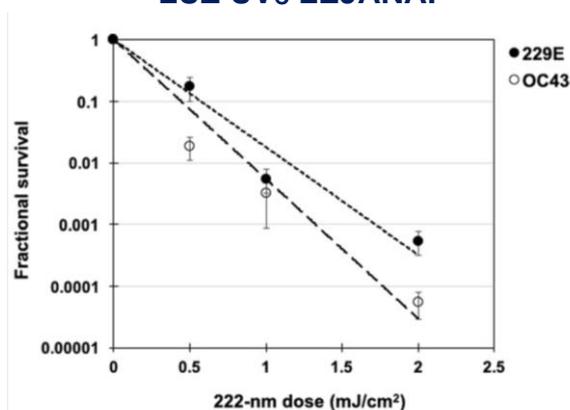
Colegio de Bioquímicos
de la Provincia de Buenos Aires

LA LUZ UV_C LEJANA (222 nm) INACTIVA DE FORMA SEGURA Y EFICIENTE EL AIRE CON CORONAVIRUS QUE AFECTAN A HUMANOS

Manuela Buonanno, David Welch, Igor Shuryak y David J. Brenner
doi.org/10.1038/s41598-020-67211-2 -Columbia University-
24 de junio de 2020.

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) se informó por primera vez en diciembre de 2019 y luego se caracterizó como una pandemia por la Organización Mundial de la Salud el 11 de marzo de 2020. A pesar de los grandes esfuerzos para contener la propagación de la enfermedad, se ha extendido por todo el mundo con más de 5.3 millones de casos confirmados y más de 340,000 muertes confirmadas como del 25 de mayo de 2020. Se cree que la transmisión del SARS-CoV-2, el coronavirus beta que causa el COVID-19, es a través del contacto directo y rutas aéreas, y los estudios de estabilidad del SARS-CoV-2 han demostrado viabilidad en aerosoles durante al menos 3 horas (2). Dada la rápida propagación de la enfermedad, incluso a través de portadores asintomáticos (3), es evidente la importancia para explorar tecnologías prácticas de mitigación, que puedan inactivar el virus en el aire en lugares públicos y por lo tanto limitar la transmisión viral en el aire. La exposición a la luz ultravioleta (UV) es un enfoque antimicrobiano directo (4) y su efectividad contra diferentes cepas del virus en el aire se han establecido desde hace mucho tiempo (5). El tipo de luz UV más comúnmente empleada como germicida, es la aplicación de una lámpara de arco de vapor de mercurio a baja presión que emite alrededor de los 254 nm; más recientemente se ha utilizado la tecnología de lámpara xenón, que emite un amplio espectro UV (6). Sin embargo, aunque estas lámparas se pueden usar para desinfectar espacios desocupados, la exposición directa a lámparas UV germicidas convencionales en espacios públicos ocupados no es posible, ya que la exposición directa a estas longitudes de onda de la lámpara germicida puede ser un peligro para la salud, tanto para la piel como los ojos (7-10). Por el contrario, se ha demostrado que la luz UV_C lejana (207 a 222 nm) es tan eficiente como la luz UV germicida convencional para matar microorganismos (11), pero los estudios hasta la fecha (12-15), sugieren que estas longitudes de onda no causan en el humano problemas de salud asociados con la exposición directa a la luz ultravioleta germicida convencional. En resumen (ver abajo), la razón es que la luz UV_C lejana afecta una gama de materiales biológicos de menos de unos pocos micrómetros, y por lo tanto no puede alcanzar células humanas vivas en la piel o los ojos, ya que se absorben en el estrato córneo de la piel o en la capa lagrimal ocular. Pero como los virus (y las bacterias) son extremadamente pequeños, la luz ultravioleta lejana aún puede penetrarlos y matarlos. Hasta ahora, la luz UV_C potencialmente tiene aproximadamente las mismas propiedades germicidas altamente efectivas de la luz UV, pero sin los riesgos asociados para la salud humana (12-15). Varios grupos han propuesto que la luz UV_C lejana (207 o 222 nm), que puede ser generado utilizando "lámparas excimer" de bajo costo, es una tecnología antimicrobiana potencial segura y eficiente (12-18) que puede desplegarse en lugares públicos ocupados.

FIGURA 1-SUPERVIVENCIA DEL CORONAVIRUS EN FUNCIÓN DE LA DOSIS DE LUZ UV_C LEJANA.



Supervivencia fraccional, $PFU_{UV} / PFU_{\text{controles}}$, se representa en función de la dosis de 222 nm de UV_C lejano. Los resultados se informan como la formación estimada de placa unidades (UFP) / ml utilizando la conversión UFP / ml = 0,7 TCID₅₀ (29) aplicando la distribución de Poisson. Los valores son informados como media ± SEM de múltiples experimentos (n = 3 alfa HCoV-229E y n = 4 para beta HCoV-OC43); las líneas representan las regresiones de mejor ajuste a la ecuación (1) (ver texto y Tabla 1).

La base mecanicista de la biofísica basada en este enfoque de UV_C lejano (12) es esa luz en este rango de longitud de onda que tiene una profundidad de penetración muy limitada. Específicamente, la luz ultravioleta lejano (207–222 nm) es muy fuertemente absorbida por las proteínas a través del enlace peptídico y otras biomoléculas (19,20), por lo que su capacidad de penetrar materiales biológicos es muy limitada en comparación con, la luz UV germicida convencional de 254 nm (superior) (21,22). Esta limitada penetración sigue siendo mucho mayor que el tamaño de los virus y las bacterias, hasta ahora, la luz UV_C es tan eficiente para matar estos patógenos como la luz ultravioleta convencional (12–14). Sin embargo, a diferencia de la luz ultravioleta germicida, la luz ultravioleta lejano no puede penetrar ni el estrato córneo humano (la capa externa de la piel de las células muertas) ni la capa de lágrima ocular, ni siquiera el citoplasma de células humanas individuales. Por lo tanto, la luz UV_C lejano no puede alcanzar ni dañar las células vivas en la piel humana o el ojo humano, en contraste con la luz ultravioleta germicida convencional que puede llegar a estas sensibles células (7-10).

En resumen, se espera que la luz UV_C lejano tenga aproximadamente las mismas propiedades antimicrobianas que la luz UV convencional, pero sin producir efectos adversos sobre la salud. Si este fuera el caso, la luz del UV_C lejano tiene el potencial de ser utilizada en entornos públicos ocupados para evitar la transmisión en el aire de persona a persona de patógenos como los coronavirus. Anteriormente hemos demostrado que una dosis muy pequeña (2 mJ / cm²) de luz ultravioleta lejano a 222 nm fue altamente eficiente en la inactivación en aerosoles del virus de la gripe H1N1 (23). En este trabajo exploramos la eficacia de la luz de 222 nm contra dos coronavirus humanos en el aire: alfa HCoV-229E y beta HCoV-OC43. Ambos virus fueron aislados hace 50 años y son endémicos para la población humana, causando entre el 15-30% de las infecciones del tracto respiratorio cada año (24). Como el SARS-CoV-2, el virus HCoV-OC43 pertenece al género beta (25). Aquí medimos la eficiencia con la que la luz UV_C lejano inactiva estos dos coronavirus humanos cuando son expuestos en gotas de aerosol de tamaños similares a los generados durante los estornudos y la tos (26). Como todos los coronavirus tienen un tamaño físico y genómico comparable, un determinante crítico de la respuesta a la radiación UV (27), planteamos la hipótesis que ambos virus responderían de manera similar a la luz UV_C lejano, y de hecho que todos los coronavirus responderán en forma similar.

Resultados

Inactivación de coronavirus que afectan a humanos después de la exposición a la luz de 222 nm en la infectividad de ensayos de aerosoles.

Utilizamos un enfoque estándar para medir la inactivación viral, analizando la infectividad del coronavirus en células hospedadoras humanas (células pulmonares normales), en este caso después de la exposición

en aerosoles a diferentes dosis de luz UV_C lejana. Cuantificamos la infecciosidad del virus con el cultivo de tejidos con una dosis infecciosa de 50% en el ensayo TCID₅₀ (28), y se estimó el correspondiente en unidades formadoras de placa (PFU) / ml utilizando la conversión PFU / ml = 0.7 TCID₅₀ (29). La figura 1 muestra la supervivencia fraccional de coronavirus en aerosoles de HCoV-229E y HCoV-OC43 expresados como controles PFU_{UV} / PFU en función de la dosis incidente de luz de 222 nm. La regresión lineal robusta (Tabla 1) usando cuadrados mínimos repesados iterados (30) indicando que la supervivencia de ambos géneros alfa y beta es consistente con un modelo de desinfección exponencial UV clásico ($R^2 = 0.86$ para HCoV-229E y $R^2 = 0.78$ para HCoV-OC43). Para el coronavirus alfa HCoV-229E, la tasa de inactivación constante (tasa de susceptibilidad) fue $k = 4.1 \text{ cm}^2 / \text{mJ}$ (intervalos de confianza del 95% (IC 2.5–4.8) que corresponde a una sección transversal de inactivación (o la dosis requerida para matar el 90% de los virus expuestos) de $D_{90} = 0.56 \text{ mJ} / \text{cm}^2$. Del mismo modo, la tasa de susceptibilidad para el beta coronavirus HCoV-OC43 fue $k = 5.9 \text{ cm}^2 / \text{mJ}$ (95% IC 3.8–7.1) que corresponde a una sección transversal de inactivación de $D_{90} = 0,39 \text{ mJ} / \text{cm}^2$.

Ensayo de integración viral.

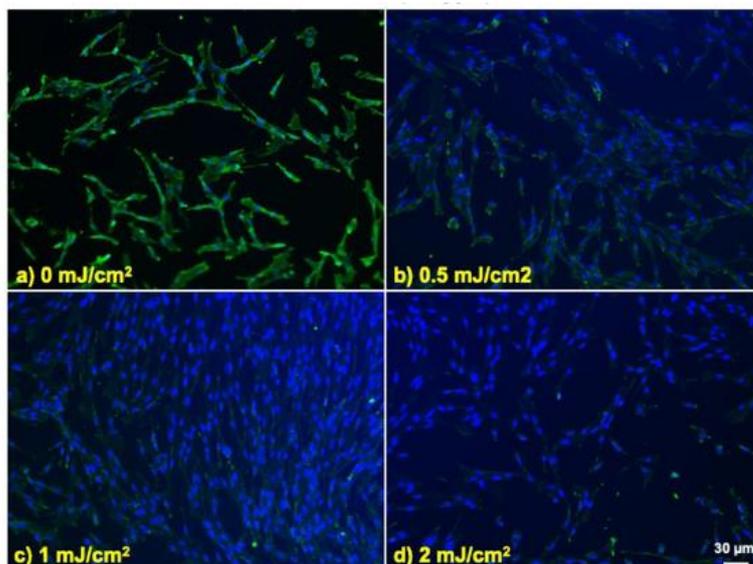
Investigamos nuevamente la integración del coronavirus a las células huésped del pulmón humano, después de la exposición en aerosoles a diferentes dosis de luz UV_C lejana. Las figuras 2 y 3 muestran imágenes fluorescentes tomadas con 10x de células pulmonares humanas MRC-5 y WI-38 incubadas, respectivamente, con HCoV-229E (Figura 2) y HCoV-OC43 (Figura 3), que habían sido expuestos en forma de aerosol a diferentes dosis de UV_C lejano. La solución viral se recogió del BioSampler después de pasar por la cámara de aerosol mientras se exponía a 0, 0.5, 1 o 2 mJ/cm² de luz de 222-nm. Las células fueron incubadas con el virus expuesto durante una hora, el medio fue reemplazado con medio de infección reciente, y la inmunofluorescencia se realizó 24 horas después. Evaluamos las líneas celulares para la expresión de la glicoproteína de la espiga viral, cuya subunidad funcional S2 está altamente conservada entre los coronavirus (31,32). En las Figuras 2 y 3, la fluorescencia verde (Alexa Fluor-488 utilizada como anticuerpo secundario contra anticuerpo anti-glicoproteína de la espiga de coronavirus humano) indica cualitativamente la infección de células con virus vivos, mientras que los núcleos se tiñeron con DAPI apareciendo como fluorescencia azul. Tanto para alfa HCoV-229E, como para el beta HCoV-OC43, la exposición a la luz de 222 nm, redujo la expresión de la glicoproteína de la espiga viral como se observa por una reducción en la fluorescencia verde.

TABLA 1

Human coronavirus type	k (cm ² /mJ)	k 95% confidence interval		p value	R ²	D ₉₀ (mJ/cm ²)
		Lower	Upper			
HCoV-229E	4.1	2.5	4.8	0.0003	0.86	0.56
HCoV-OC43	5.9	3.8	7.1	0.0001	0.78	0.39

Parámetros de regresión lineal para valores normalizados de $\ln [S]$ [supervivencia] (ecuación 1) como dependientes de dosis variable y UV (D , mJ / cm²) como variable independiente. k es la tasa de inactivación UV constante o factor de susceptibilidad (cm² / mJ). La regresión lineal se realizó con el término de intercepción establecido en cero representando la definición de 100% de supervivencia relativa a dosis cero de UV. La sección transversal de inactivación de coronavirus, D_{90} (la dosis UV que inactiva el 90% del virus expuesto) se calculó usando $D_{90} = - \ln [1 - 0.90] / k$.

FIGURA 2
Alfa HCoV-229E en fibroblastos pulmonares humanos MRC5
 Verde-anti proteína de la espiga Azul-DAPI

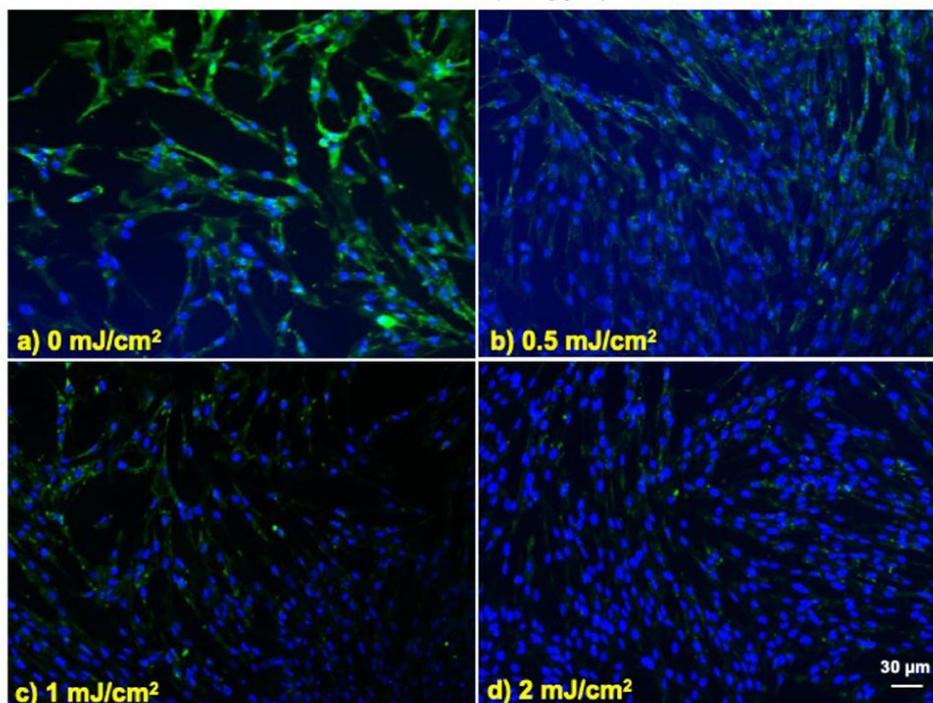


Infección de células pulmonares humanas de alfa HCoV-229E en aerosol irradiado en función de la dosis de luz UV_C lejana. Imágenes fluorescentes representativas de fibroblastos de pulmón humanos normales MRC-5 infectados con alfa coronavirus 229E humanos expuesto en forma de aerosol. La solución viral se recogió del BioSampler después de que atraviesa la cámara de aerosol mientras se expone a (a) 0, (b) 0.5, (c) 1 o (d) 2 mJ / cm² de luz de 222 nm. La fluorescencia verde indica cualitativamente las células infectadas (Verde = Alexa Fluor-488 utilizada como anticuerpo secundario contra anticuerpo anti-glucoproteína de la espiga del coronavirus humano; **Azul** = mancha nuclear DAPI). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 10 x; La barra de escala se aplica a todos los paneles de la figura.

Discusión

La gravedad de la pandemia de COVID-19, garantiza el rápido desarrollo y despliegue de medidas para reducir la transmisión de persona a persona en interiores. Hemos desarrollado un enfoque prometedor utilizando luz UV_C lejana de longitud de onda única a 222 nm generada por lámparas de excímero filtradas, que desactiva el virus en el aire sin inducir daño biológico en células y tejidos humanos expuestos (11-18). El enfoque se basa en el principio de base biofísica que la luz UV_C lejana, debido a su penetración muy limitada en materiales biológicos, puede atravesar y matar virus y bacterias que normalmente tienen dimensiones micrométricas o más pequeñas, pero no puede penetrar en las capas externas de células muertas de la piel, ni la capa externa de lágrimas en la superficie del ojo humano (12).

FIGURA 3



Infección de células pulmonares humanas a partir de beta HCoV-OC43 en aerosol irradiado en función de la dosis de luz UV_c lejana. Imágenes fluorescentes representativas de fibroblastos pulmonares humanos normales WI-38 infectados con betacoronavirus OC43 humanos expuesto en forma de aerosol. La solución viral se recogió del BioSampler después de que atraviesa la cámara de aerosol mientras se expone a (a) 0, (b) 0.5, (c) 1 o (d) 2 mJ / cm² de luz de 222 nm. La fluorescencia verde indica cualitativamente las células infectadas (Verde = Alexa Fluor-488 utilizada como anticuerpo secundario contra anticuerpo de glucoproteína de la espiga de coronavirus humano; Azul = mancha nuclear DAPI). Imágenes fueron tomadas con un objetivo 10 x; La barra de escala se aplica a todos los paneles de la figura.

Bibliografía

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. Available on: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (2020).
2. van Doremalen, N. et al. Aerosol and surface stability of sars-cov-2 as compared with sars-cov-1. *N. Engl. J. Med.*, (2020).
3. Bai, Y. et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of covid-19. *JAMA*, (2020).
4. Kowalski, W. J. *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection*. New York: Springer, (2009).
5. Budowsky, E. I. et al. Principles of selective inactivation of viral genome. I. UV-induced inactivation of influenza virus. *Arch. Virol.* 68(3-4), 239–47 (1981).
6. Naunovic, Z., Lim, S. & Blatchley, E. R. III. Investigation of microbial inactivation efficiency of a UV disinfection system employing an excimer lamp. *Water Res.* 42(19), 4838–46 (2008).
7. Trevisan, A. et al. Unusual high exposure to ultraviolet-C radiation. *Photochem. Photobiol.* 82(4), 1077–9 (2006).
8. Zaffina, S. et al. Accidental exposure to UV radiation produced by germicidal lamp: case report and risk assessment. *Photochem. Photobiol.* 88(4), 1001–4 (2012).
9. Setlow, R. B. et al. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(14), 6666–70 (1993).
10. Balasubramanian, D. Ultraviolet radiation and cataract. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 16(3), 285–97 (2000).
11. Narita, K. et al. 222-nm UVC inactivates a wide spectrum of microbial pathogens. *J Hosp Infect* (2020).
12. Buonanno, M. et al. 207-nm UV light - a promising tool for safe low-cost reduction of surgical site infections. I: in vitro studies. *Plos One* 8(10), e76968 (2013).
13. Buonanno, M. et al. 207-nm UV light-a promising tool for safe low-cost reduction of surgical site infections. II: In-Vivo Safety Studies. *PLoS One* 11(6), e0138418 (2016).

14. Buonanno, M. et al. Germicidal efficacy and mammalian skin safety of 222-nm uv light. *Radiat. Res.* 187(4), 483–491 (2017).
15. Ponnaiya, B. et al. Far-UVC light prevents MRSA infection of superficial wounds in vivo. *Plos One* 13(2), e0192053 (2018).
16. Narita, K. et al. Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mouse wounds. *J. Photochem. Photobiol. B* 178(Supplement C), 10–18 (2018).
17. Narita, K. et al. Chronic irradiation with 222-nm UVC light induces neither DNA damage nor epidermal lesions in mouse skin, even at high doses. *PLoS One* 13(7), e0201259 (2018).
18. Yamano, N. et al. Long-term effects of 222 nm ultraviolet radiation C sterilizing lamps on mice susceptible to ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol.* (2020).
19. Goldfarb, A. R. & Sidel, L. J. Ultraviolet absorption spectra of proteins. *Science* 114(2954), 156–7 (1951).
20. Setlow, J. The molecular basis of biological effects of ultraviolet radiation and photoreactivation, in *Current topics in radiation research*, M. Ebert & A. Howard, Editors., North Holland Publishing Company: Amsterdam. p. 195–248 (1966).
21. Coohill, T. P. Virus-cell interactions as probes for vacuum-ultraviolet radiation damage and repair. *Photochem. Photobiol.* 44(3),359–63 (1986).
22. Green, H. et al. Cytotoxicity and mutagenicity of low intensity, 248 and 193 nm excimer laser radiation in mammalian cells. *Cancer Res.* 47(2), 410–3 (1987).
23. Welch, D. et al. Far-UVC light: A new tool to control the spread of airborne-mediated microbial diseases. *Sci. Rep.* 8(1), 2752 (2018).
24. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 1282, 1–23 (2015).
25. Woo, P. C. et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2(8), 1804–20 (2010).
26. Papineni, R. S. & Rosenthal, F. S. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J. Aerosol Med.* 10(2), 105–116 (1997).
27. Sparrow, A. H., Underbrink, A. G. & Sparrow, R. C. Chromosomes and cellular radiosensitivity. I. The relationship of D0 to chromosome volume and complexity in seventy-nine different organisms. *Radiat. Res.* 32(4), 915–45 (1967).
28. Lindenbach, B. D. Measuring HCV infectivity produced in cell culture and in vivo. *Methods Mol. Biol.* 510, 329–36 (2009).
29. Mahy, B. & Kangro, H. *Virology Methods manual.* Academic Press (1996).
30. Bjorck, A. *Numerical Methods For Linear Least Squares Problems.* Computer Science (1996).
31. Walls, A. C. et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114(42), 11157–11162 (2017).
32. Madu, I. G. et al. Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide. *J. Virol.* 83(15), 7411–21 (2009).
33. Modrow, S. et al. *Molecular virology.* Springer Berlin Heidelberg (2013).
34. Kangro, H. O. & Mahy, B. W. *Virology methods manual.* Elsevier (1996).
35. Walker, C. M. & Ko, G. Effect of Ultraviolet Germicidal Irradiation on Viral Aerosols. *Env. Sci. Technol.* 41(15), 5460–5465 (2007).
36. The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys.* 87(2), p. 171–186 (2004).
37. ACGIH(R), 2017 TLVs and BEIs. Threshold Limit Value (TLV) for chemical substances and physical agents and Biological Exposure Indices (BEIs). Signature Publications (2017).
38. Reed, L. J. & Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27(3), 493–497 (1938).
39. Keene, O. N. The log transformation is special. *Stat. Med.* 14(8), 811–9 (1995).
40. Venables, W. N. & Ripley, B. D. *Modern applied statistics with S.* 4th ed. Statistics and computing, New York: Springer, xi, 495 p (2002).
41. Marazzi, A. *Algorithm, Routines, and S functions for Robust Statistics.* (Wadsworth & Brooks/cole, Pacific Grove, California, 1993).
42. Durbin, J. & Watson, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression. I. *Biometrika* 37(3-4), 409–28 (1950).
43. Breusch, T. & Pagan, A. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. *Econometrica* 47(5), 1287–1294 (1979).