

Efficacia virucida del vapore secco come sistema di disinfezione contro il Coronavirus Umano, il Virus dell'Influenza Umana e l'Echovirus

Link all'articolo originale: <https://doi.org/10.1080/15459624.2021.1989442>

Autori: Isabella Marchesi, Arianna Sala, Giuseppina Frezza, Stefania Paduano, Sara Turchi, Annalisa Bargellini, Paola Borella & Claudio Cermelli

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neurali, Sezione di Sanità Pubblica, Via Campi 287, 41125 Modena, Italia

Abstract:

Questo studio in vitro aveva lo scopo di valutare l'efficacia del vapore secco nell'inattivazione dell'Human Coronavirus OC43, il Virus dell'Influenza A/H1N1/WSN/33 e l'Echovirus 7, inoculati su materiali non porosi (acciaio inossidabile e polipropilene) e porosi (cotone). I modelli di virus sono stati scelti sulla base delle modalità di trasmissione e della resistenza ambientale. I test sono stati condotti sotto una cappa a flusso laminare, dove sono stati contaminati con una sospensione virale due pannelli di ognuno dei tre materiali. L'inoculazione è stata lasciata asciugare ed in seguito il virus sul pannello non trattato (controllo) è stato raccolto con un tampone, determinando il titolo iniziale. L'altro pannello è stato trattato con un aspiratore professionale, equipaggiato con un generatore di vapore secco. Il vapore secco viene generato in una caldaia, dove normale acqua di rubinetto viene riscaldata fino a 155°C a 5,5 bar di pressione e quindi, passando lungo il tubo flessibile, la temperatura diminuisce fino ad un valore compreso tra 100°C e 110°C all'uscita. Il vapore secco è stato applicato per 4 secondi con un tergovetro sui pannelli di metallo e di plastica, con una spazzola coperta da una cuffia in microfibra sul cotone, simulando l'uso del vapore in un contesto di pulizie di routine. Dopo il trattamento, i virus infettivi eventualmente rimasti sulle superfici sono stati raccolti seguendo le medesime procedure di tamponatura applicate per il controllo. (...) Il vapore secco è risultato efficace contro i tre virus su tutti i materiali testati, raggiungendo un fattore di riduzione media in $\text{Log}_{10} \geq 4$ nel titolo virale dei campioni trattati, verificati in comparazione con i pannelli di controllo, secondo le indicazioni di UNI EN 14476:2019. Pertanto il vapore secco può essere proposto come alternativa semplice, efficace, rapida ed atossica ai prodotti chimici per la disinfezione delle superfici, senza il rischio di danneggiamento dei materiali. Questo strumento può dunque essere impiegato non solo in strutture sanitarie ma anche in ambienti professionali, domestici e comunitari, con vantaggi per l'ambiente e la salute umana.

Introduzione

Il SARS-CoV-2 umano è un virus altamente contagioso, che viene trasmesso da uomo a uomo attraverso aerosol generati da starnuti, da colpi di tosse, dal parlare, così come attraverso le superfici contaminate (Krishan e

Kanchan 2020; Weber e Stilianakis 2021). Esso può persistere su superfici abiotiche per poche ore fino a diversi giorni; quindi una veloce e pronta inattivazione è necessaria per bloccare la trasmissione del virus (van Doremalen et al. 2020). I prodotti chimici domestici comuni come etanolo, ipoclorito di

sodio e perossido di idrogeno, applicati dopo la pulizia, si sono dimostrati efficaci nell'uccidere SARS-CoV-2, ma il loro uso eccessivo può essere associato ad effetti negativi sulla salute umana e può provocare danni all'ambiente ed ai materiali (Gharpure et al. 2020; Noorimotlagh et al. 2020; Sharafi et al. 2021). Una possibile alternativa è il vapore, generato con diverse tecnologie, che ha dimostrato di avere un'elevata capacità di inattivare i microrganismi, in diversi studi in vitro. (...) Durante la pandemia COVID-19 il vapore generato da micro-onde è stato uno dei quattro metodi raccomandati per la decontaminazione dai virus su mascherine chirurgiche da riutilizzare e su respiratori N95 (Seresirikachorn et al. 2021). Anche l'Istituto Superiore di Sanità italiano durante l'emergenza COVID-19, ha consigliato il vapore secco per la disinfezione in ambienti indoor di indumenti, camerini, arredi imbottiti, tende, ecc. (Gruppo di lavoro ISS COVID-19 su Biocidi 2020). Tuttavia, la letteratura sull'utilizzo del vapore contro il SARS-CoV-2 è lacunosa. La riduzione della contaminazione da SARS-CoV-2 in contesti non-sanitari è essenziale, a causa sia delle infezioni intra familiari e lavorative osservate in questa terza fase pandemica, sia delle numerose superfici contaminabili a causa dei frequenti tocchi delle mani, come ringhiere, sedili dei mezzi di trasporto, maniglie di porte e finestre, aree di consumazione del cibo, servizi igienici e rubinetti, dispositivi touchscreen, computer, mouse e tastiere, ecc.

Lo scopo del nostro studio era di valutare l'efficacia del vapore secco nell'inattivazione di tre virus patogeni umani, inoculati sperimentalmente su diversi materiali (metallo, plastica, tessuto) selezionati tra i più diffusi in ambito lavorativo, domestico e comunitario.

Metodi

Il generatore di vapore

In questo studio è stato utilizzato un'aspirapolvere portatile professionale dotato di generatore di vapore secco (Gioel G400, Gioel S.p.A, Trento, Italia). Combina l'aspirazione con il rilascio di vapore ad alta pressione per pulire e igienizzare pavimenti e superfici a frequente contatto umano. La figura 1 mostra i principali componenti del sistema di pulizia, il cui utilizzo richiede alcuni semplici passaggi. Per prima cosa viene riempita con dell'acqua una vaschetta di raccolta, dove lo sporco viene aspirato e depositato. In secondo luogo viene riempito il serbatoio di ricarica del generatore di vapore con acqua, che viene pompata all'interno della caldaia, dove viene riscaldata tramite una resistenza elettrica fino a 155° C, ad una pressione di 5,5 bar, condizioni che generano un vapore secco. Terzo, il tubo flessibile è collegato al corpo macchina e permette le funzioni di aspirazione e/o vapore selezionabili premendo i pulsanti sull'impugnatura. Infine è possibile attivare l'erogazione del vapore secco premendo il grilletto sull'impugnatura.



Figure 1. The vacuum cleaner equipped with a dry steam generator used in this study.

Virus e cellule

I test sono stati condotti su tre virus: Human Coronavirus (HCoV) OC43 (ATCC VR1558), un surrogato del nuovo SARS-CoV-2 responsabile

della pandemia di COVID 19; Virus dell'Influenza Umana sottotipo A/H1N1/WSN/33, gentilmente fornito dal Prof. Arcangeletti (Università di Parma, Italia); l'Echovirus 7 (ATCC VR37), scelto per la sua notevolissima persistenza in ambiente e la resistenza ai trattamenti fisici e chimici (Sofer et al. 2003; Sauerbrei e Wutzler 2009). HCoV-OC43 è stato coltivato in cellule HCT-8, Human Influenza Virus in cellule MDCK, E Echovirus 7 in cellule Vero. Tutte le colture cellulari sono state coltivate nel Minimum Essential Medium di Dulbecco e contengono siero fetale bovino 10% (mezzo di crescita) o 5% (mezzo di mantenimento), penicillina (100 U/mL), streptomicina (100 mg/mL), ciprofloxacina (100 mg/mL) e L-glutamina (2 mM). Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck Life Science, Milano, Italy.

Test in vitro

I virus, per ogni materiale, sono stati depositati su di un'area di 2,5 x 2,5 cm, delimitata con un pennarello indelebile su due pannelli (40 x 40 cm). Entrambe le aree sono state contaminate con 100 µl di sospensione virale, lasciata asciugare per 20 min (vedi come esempio la figura 2A, che mostra l'esperimento su un pannello di acciaio inox). Uno dei due pannelli (il pannello di prova) è stato trattato con il vapore, mentre l'altro non è stato esposto al vapore e serviva da controllo. Quindici minuti prima del test è stato attivato il dispositivo per l'erogazione del vapore. È stata impostata la potenza 2. Durante l'erogazione la temperatura del vapore scende da 155° C ad un valore tra 100° C e 110° C al punto di uscita, come descritto dal produttore. Per gli esperimenti sui pannelli di metallo e plastica è stato collegato l'accessorio tergovetro (Figura 2B), mentre sul cotone è stata utilizzata una spazzola triangolare con una cuffia in microfibra.

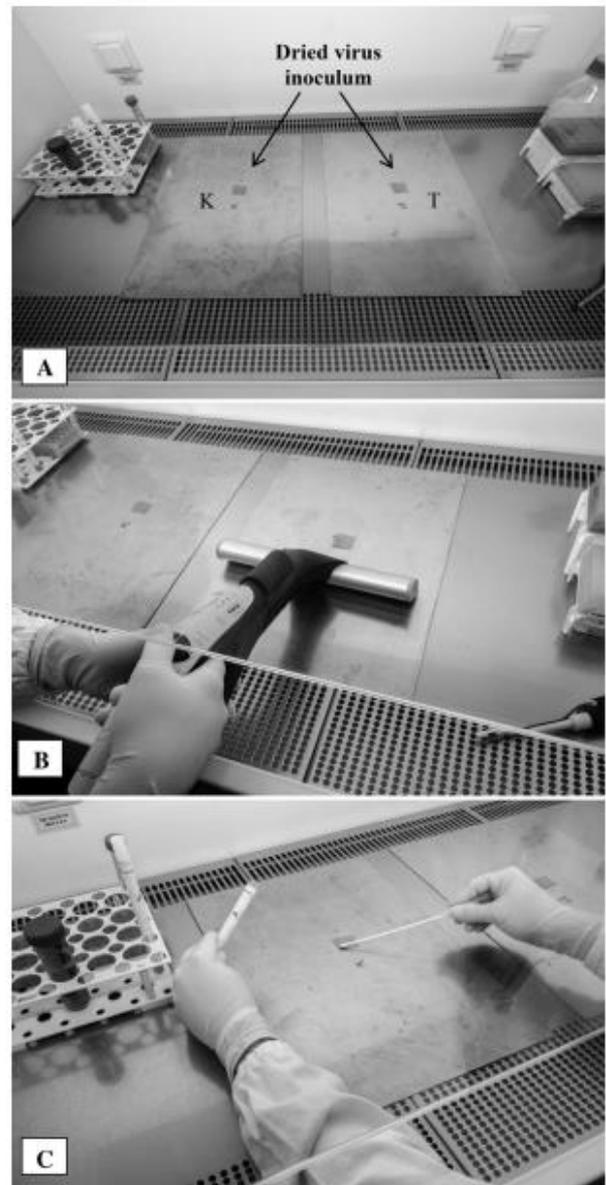


Figure 2. The pictures show the main phases of an experiment performed on stainless steel panels. (A) Virus suspension dried on squared areas in the middle of control (K, left panel) and test (T, right panel) panels. (B) Treatment with window wiper on the test panel. (C) Virus harvesting with swab from control area K.

Ogni trattamento è stato condotto simulando la pulizia di routine ed è consistito in tre passaggi avanti e indietro erogando vapore, seguiti da un unico passaggio finale di aspirazione per rimuovere la condensa, per un tempo totale di applicazione del vapore di 4 sec. La sospensione virale asciutta sul pannello di controllo è stata raccolta con un tampone di cotone (Biolife Italia, Milan, Italy), passato sull'area per 1 minuto (Figura 2C). Dopo il trattamento con il vapore, la stessa

procedura è stata ripetuta per raccogliere il virus sul pannello di controllo. I tamponi sono stati posti in sospensione in 1 mL di tampone fosfato salino, ruotandolo per 1 minuto. Serie di diluizioni per 10 di queste sospensioni sono state seminate in duplicato su idonee colture cellulari in piastre a 96 pozzetti (Euroclone, Milan, Italy). Dopo l'incubazione, le colture cellulari sono state osservate giornalmente con un microscopio a luce inversa (Carl Zeiss, Milano, Italy). La valutazione dell'effetto citopatico virale è stata possibile anche alle diluizioni più basse, poiché non è stata osservata alcuna citotossicità, che possa confondere, come previsto in assenza di sostanze chimiche, potenzialmente dannose per le colture cellulari. HCoV-OC43 ed Echovirus 7 sono stati quantificati con titolazione punto-finale, come descritto precedentemente (Ascione et al. 2017). Il titolo di entrambi i virus è stato stabilito come la diluizione più elevata, che mostri il tipico effetto citopatico dei virus (arrotondamento e distacco delle cellule) ed i risultati sono stati espressi come 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID50). Il virus A/H1N1 è stato titolato mediante un test di riduzione della placca, come riportato da Ascione e colleghi (2017). In questo caso, il titolo virale è stato definito con il conteggio delle placche di citolisi ed i risultati sono stati espressi come placche formanti unità (PFU/mL). Il limite di rilevamento (LoD) è stato di 1 TCID50 per titolazione finale e 5 PFU/mL per test di riduzione della placca.

Per ogni materiale, abbiamo eseguito tre esperimenti indipendenti con ciascun virus. I campioni sono stati analizzati in duplicato in ogni esperimento. L'efficacia virucida del vapore è stata definita come una riduzione $\text{Log}_{10} \geq 4$ del titolo del virus sui campioni trattati, comparati con i controlli, secondo UNI EN 14476:2019.

Inoltre, limitatamente ai test con Echovirus 7, è stata analizzata l'acqua sporca del recipiente di raccolta dell'aspirapolvere, mediante ultrafiltrazione (sistema Pellicon XL, Merck Life Science, Milano, Italia) per valutare la possibile presenza di virus infettivo.

Risultati

(...) La figura 3 mostra la riduzione logaritmica della carica virale di ogni virus sulle tre superfici prese in considerazione, calcolata come la differenza tra il titolo virale di controllo espresso come Log_{10} e quello del campione trattato con il vapore. Il trattamento con vapore secco ha portato ad una completa inattivazione dei virus su tutte le superfici testate, ottenendo un fattore di riduzione medio $\text{Log}_{10} \geq 4$ nel titolo del virus, corrispondente ad una percentuale di riduzione del 99,99% (figura 3). (...) Inoltre, non è stato rilevato Echovirus 7 infettivo nemmeno nell'acqua sporca all'interno della vaschetta di raccolta, dove vengono aspirate e trattenute le impurità.

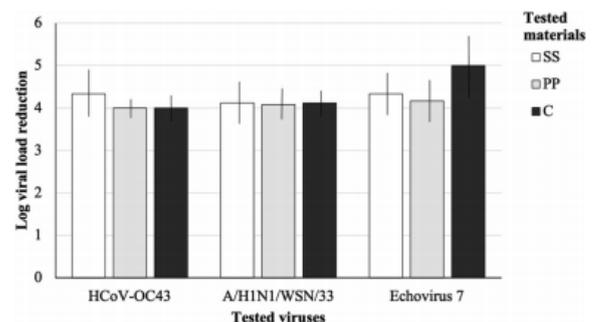


Figure 3. Logarithmic viral load reduction by the dry steam system on the different surfaces. Data reported in figure are mean values (\pm standard deviation) from three different experiments performed. SS = stainless steel, PP = polypropylene, C = cotton fabric.

Discussione

A nostra conoscenza, questo è il primo studio in vitro, che dimostri l'efficacia virucida del vapore secco contro i Coronavirus umani

(HCoV), con contaminazioni su diverse superfici. Abbiamo testato l'HCoV-OC43 che ha una somiglianza strutturale col SARS-CoV-2 ed è comunemente considerato un surrogato dell'altamente patogeno HCoV (Gerchman et al. 2020). Numerosi studi confermano una persistenza simile su superfici ambientali tra CoV umani e animali (Aboubakr et al. 2020; Bueckert et al. 2020; Malik 2020; Ren et al. 2020), supportando un'efficacia del vapore secco contro HCoV-OC43 and SARS-Cov-2 comparabile. Inoltre, questa similarità è suggerita dall'evidenza che le cellule T che reagiscono agli epitopi SARS-CoV-2 reagiscono in modo incrociato con le corrispondenti sequenze omologhe del HCoV-OC43 e di altri HCoVs che circolano comunemente (Mateus et al. 2020; Steiner et al. 2020).

Sono stati testati altri due virus, scelti in base alle loro vie di trasmissione (tramite goccioline e/o percorso oro-fecale) e resistenza ambientale. Il Virus respiratorio dell'Influenza Umana A è fragile e meno stabile dei Coronavirus fuori dall'ospite, mentre l'Echovirus 7, trasmesso principalmente attraverso le feci, è tra i virus più resistenti (Sofer et al. 2003; Sauerbrei e Wutzler 2009). La notevole attività virucida del vapore secco contro un virus così resistente fornisce ulteriore supporto alla possibilità di un'azione efficace contro il meno stabile SARS-CoV-2. Interessante notare che è stata provata la presenza di SARS-CoV-2 in feci, cosa che suggerisce la possibilità di trasmissione attraverso fomite di feci contaminate (Amirian 2020; Tian et al. 2020). Pertanto, pulire con il vapore secco, insieme ad un'accurata igiene delle mani, può aiutare a prevenire il rischio di trasmissione del SARS-CoV-2 via fecale-orale, in ambienti dove si possano trovare facilmente elementi fecali, come per esempio in scuole dell'infanzia e strutture con ospiti incontinenti.

I nostri risultati, che mostrano un'elevata efficienza del vapore secco nell'inattivazione dei virus, soddisfano lo standard Europeo per l'efficacia antivirale (riduzione 4-Log₁₀) contro i virus testati, senza differenze tra materiali duri (acciaio e plastica) e materiali porosi (cotone) (Ente Nazionale Italiano di Unificazione 2019). Le superfici non porose sono note per una maggiore persistenza virale rispetto a quelle porose, dalle quali, comunque, è più difficile rimuovere i virus con trattamenti chimici (Noorimotlagh et al. 2020).

Per valutare l'efficacia virucida del vapore secco, abbiamo scelto di effettuare un test biologico su colture di tessuti, poiché, sebbene meno sensibile rispetto al rilevamento e quantificazione di RNA, è l'unico test che offre risultati sull'infettività del virus recuperato dalle superfici. Come riportato da Atkinson e Petersen (2020), la presenza del solo acido nucleico non può essere usata per definire la diffusione virale o il potenziale di infezione. Inoltre, è ben noto che l'RNA di molti altri virus come SARS-CoV, MERS-CoV, Influenza Virus, etc., può essere rintracciato molto dopo che la capacità infettiva del virus sia sparita (Bueckert et al. 2020).

Anche se non può essere esclusa una rimozione del virus attraverso l'azione delle spazzole, l'assenza dell'Echovirus infettivo nell'acqua sporca, supporta l'ipotesi che la notevole riduzione della carica virale è dovuta all'inattivazione del virus da parte del vapore secco. Inoltre, né lo sfregamento del tampone per recuperare il virus residuo né la reazione fisico-chimica tra il vapore ed i materiali hanno generato alcun composto tossico, come evidenziato dall'assenza di qualsiasi citotossicità osservata alla titolazione del virus, anche alle diluizioni più basse.

È importante sottolineare che in questo studio tutti gli esperimenti sono stati condotti su sospensioni virali ottenute in terreni di coltura cellulare completi, con siero bovino fetale e altro materiale organico, simulando così le condizioni di sporco che si possono trovare su superfici ambientali reali. (...)

Il vapore secco inattiva i virus in pochi secondi senza lasciare residui, mentre i prodotti chimici richiedono un'iniziale fase di pulizia per rimuovere la materia organica, un tempo di contatto di 5-10 minuti, potrebbe essere necessaria anche una ventilazione extra dopo la disinfezione, che può rilasciare sottoprodotti di disinfezione (Sexton et al. 2011; De Lorenzi et al. 2012; Gillespie et al. 2013; Oztoprak et al. 2019). Queste caratteristiche, insieme alla facilità d'uso paragonabile a quella di qualsiasi altro aspirapolvere domestico, fa sì che il vapore secco sia particolarmente adatto per la disinfezione delle superfici in ambienti di lavoro e comunitari come uffici, trasporti pubblici, hotels, ristoranti, palestre, scuole, case, ecc. Inoltre, grazie alla sua attività contro i virus enterici, il vapore secco potrebbe essere utilizzato efficacemente in presenza di contaminazione fecale in asili nido, strutture per anziani, reparti pediatrici, ecc.

Altri vantaggi del vapore secco sono l'assenza di scivolosi tensioattivi e il trascurabile volume d'acqua lasciato sulle superfici trattate dopo la disinfezione (Tannatore 2011). Pertanto, i potenziali rischi di scivolamento sono insignificanti. Di più, i tessuti non vengono danneggiati dal vapore secco (gruppo di lavoro ISS COVID-19 sui biocidi 2020). Il rischio di scottature è minimo, poiché la temperatura del vapore diminuisce rapidamente a pochi centimetri dall'ugello di emissione. Evidentemente serve attenzione affinché il

vapore secco non causi danni durante la disinfezione di dispositivi elettrici e apparecchiature elettroniche. Infine Echovirus 7 infettivo non è stato trovato nel serbatoio dell'acqua sporca, indicando che la pulizia del dispositivo non è pericolosa per gli utenti.

Conclusioni

In conclusione, il nostro studio conferma che il vapore secco può essere proposto come un'alternativa efficace ai prodotti chimici, rispettosa dell'ambiente e veloce, per la disinfezione di superfici ambientali potenzialmente contaminate da virus, proteggendo gli utenti dall'esposizione a sostanze tossiche o sottoprodotti irritanti.

Dichiarazione di divulgazione degli interessi concorrenziali

Gli autori dichiarano di non avere interessi finanziari concorrenti o rapporti personali con la società Gioel S.p.A., che avrebbero potuto influenzare il lavoro riportato in questo documento. La società Gioel S.p.A. ha fornito il dispositivo a vapore secco utilizzato nello studio e supporto tecnico per utilizzarlo correttamente sui diversi materiali testati, ma non è stata coinvolta nel progetto dello studio, nell'analisi e presentazione dei dati, o nello scrivere il manoscritto. Risultati preliminari di questo studio, limitati all'efficacia del vapore secco nell'inattivare il Coronavirus Umano OC43 su substrati in acciaio inossidabile e cotone, sono stati utilizzati da Gioel S.p.A. per scopi commerciali.

Nota dei traduttori: il presente articolo rappresenta la traduzione in lingua italiana dell'originale, consultabile al link <https://doi.org/10.1080/15459624.2021.1989442>. Negli spazi indicati con "(...)" sono state omesse poche note, considerate molto tecniche e non essenziali per il senso dello studio. Per consultare l'articolo nella sua interezza invitiamo ad accedere all'originale in lingua inglese. La bibliografia è consultabile in calce all'articolo originale.