

Diferencias en la estabilidad ambiental entre las variantes de preocupación del SARS-CoV-2: Ómicron tiene mayor estabilidad

Título corriente: Ómicron tiene mayor estabilidad ambiental

Hirose,^{1,2*} Yoshito Itoh,² Hiroshi Ikegaya,³ Hajime Miyazaki, ^{1,2} Naoto Watanabe, ^{1,2} Takuma Yoshida, ^{1,2} Risa Bandou,^{1,3} Tomo Daidoji,¹ Takaaki Nakaya¹

Afilicaciones de los autores:

1 Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan.

2 Department of Molecular Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan.

3 Department of Forensic Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan. Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan.

bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.01.18.476607>; 19 de enero, 2022.

Abstracto

Analizamos las diferencias en la estabilidad ambiental viral entre el SARS-CoV-2 Wuhan y todas las variantes de preocupación (VOC, *variant of concern*).

En las superficies de plástico y en la piel, Alpha, Beta, Delta y Ómicron exhibieron una supervivencia 2 veces mayor que la cepa de Wuhan, y mantuvieron la infectividad durante más de 16 horas en las superficies de la piel.

La alta estabilidad ambiental de estas VOC podría aumentar el riesgo de transmisión por contacto, y contribuir a su propagación.

Introducción

Han surgido varias variantes del SARS-CoV-2 entre el 2020 y el 2021. En particular, las variantes del SARS-CoV-2 clasificadas como variantes de preocupación (VOC) pueden causar daños humanos y económicos significativos, y la comprensión de sus características es crucial para el control de infecciones.

Se ha informado que las VOC han aumentado la infectividad y la transmisibilidad (1). En particular, la rápida propagación de la variante Ómicron (linaje Pango: B.1.1.529) se ha convertido en una seria preocupación en todo el mundo a partir de I 2022 (2, 3).

El aumento de la infectividad/transmisibilidad puede atribuirse a varios factores, como el aumento de la carga viral que se desprende de las personas infectadas, el período prolongado

de eliminación del virus, la disminución de la carga viral mínima requerida para establecer la infección, cambios en el sitio objetivo de infección y una mayor estabilidad ambiental (4, 5).

La estabilidad ambiental del SARS-CoV-2 se ha comparado con la de otros virus, como el SARS-CoV-1 y el virus de la influenza (6, 7). Además, estudios previos han sugerido que las variantes Alfa (linaje Pango: B.1.1.7) y Beta (linaje Pango: B.1.351) tienen el mismo grado de estabilidad ambiental (8, 9). Sin embargo, las diferencias en la estabilidad viral entre todas las VOC, incluidas las variantes Ómicron y Delta (linaje Pango: B.1.617.2), no ha sido evaluada y comparada en detalle. Aquí, mejoramos nuestro modelo de evaluación previamente desarrollado, y analizamos con precisión las diferencias en la estabilidad viral y la eficacia de la desinfección entre la cepa Wuhan (linaje Pango: A) y todas las VOC.

Materiales y métodos

Virus y células

Las variantes del SARS-CoV-2 analizadas en este estudio fueron la cepa Wuhan (linaje Pango: A, hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2019), variante Alpha (linaje Pango: B.1.1.7, hCoV-19/Japón/QK002/2020), variante Beta (linaje Pango: B.1.351, hCoV-19/Japón/TY8-612/2021), variante gamma (linaje Pango: P.1, hCoV-19/Japón/TY7-501/2021), variante Delta (linaje Pango: B.1.617.2, hCoV-19/Japan/TY11-927/2021) y variante Ómicron (linaje Pango: B.1.1.529, hCoV-19/Japón/TY38-873/2021). Todos los virus fueron proporcionados generosamente por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (Tokio, Japón).

Para el cultivo y cuantificación de virus, se compraron en el Banco de Células de la Colección Japonesa de Investigación de Biorecursos (Osaka, Japón), células VeroE6/TMPRSS2, que expresan la serina proteasa transmembrana TMPRSS2, y que fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma Aldrich), complementado con suero bovino fetal al 5% y G418 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japón) (10, 11).

Los virus fueron concentrados y purificados de la siguiente manera: 96 horas después de la infección, el medio de cultivo se cosechó y centrifugó durante 10 minutos a $2500 \times g$ a $4^\circ C$, para eliminar los restos celulares. Los viriones en el sobrenadante se sedimentaron a través de un cojín de sacarosa al 20% (p/p) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a través de ultracentrifugación a 27.000 rpm durante 2,5 h a $4^\circ C$, utilizando un rotor Beckman SW28 (12, 13).

Los títulos del virus se midieron en términos de dosis infecciosa de cultivo tisular al 50% (TCID₅₀) en células VeroE6/TMPRSS2. 3 días después de la inoculación, el efecto citopático en cada pozo fue cuantificado bajo un microscopio, y se calculó el TCID₅₀.

Construcción de un modelo de piel para evaluar la estabilidad del virus y la eficacia desinfectante

Se recolectó piel humana a partir de muestras obtenidas del Departamento de Medicina Forense, Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto, en autopsias de piel abdominal. Se cortaron muestras de sujetos de 20 a 70 años, obtenidos aproximadamente 1 día después de la muerte, en cuadrados con unas dimensiones aproximadas de 4 cm \times 8 cm. Aquellos cuya piel estaba considerablemente dañada, por quemaduras o ahogamiento, se excluyeron.

Usando las muestras de autopsia de piel, se desarrolló un modelo "ex vivo" para evaluar la estabilidad de diferentes virus en la superficie de la piel humana, y la eficacia de diferentes desinfectantes contra virus, en la piel humana (6, 14). La piel, la cual se lavó con PBS, y se

extrajo el panículo, se colocó en un inserto de cultivo (Corning, Corning, NY, Estados Unidos) en una membrana con un tamaño de poro de 8,0 μm . Los insertos de cultivo se colocaron en placas de 6 pocillos que contenían 1,0 ml de DMEM (Sigma-Aldrich).

Evaluación de la estabilidad del virus en superficies plásticas y de piel humana

La supervivencia del virus se evaluó en la superficie del plástico (placa de poliestireno) y de la piel humana (modelo construido de piel). Se aplicaron soluciones de virus ($5,0 \times 10^4$ TCID₅₀ en 2 μL de PBS) sobre la superficie de plástico o piel humana. Cada muestra se incubó en un ambiente controlado (25 °C, 45–55 % de humedad relativa) durante 0–120 horas. A continuación, se recogió el virus que quedaba en la superficie en 1,0 mL de DMEM y se tituló (6). El límite de detección para el título del virus que queda en la superficie fue $10^{0,5}$ TCID₅₀. El tiempo de supervivencia se definió como el tiempo hasta el momento en que el virus ya no era detectado en la superficie. Se realizaron 3 experimentos independientes para cada condición, y los resultados de los títulos de virus residuales en las superficies se expresaron como la media \pm error estándar de la media.

Evaluación de la eficacia de los desinfectantes a base de alcohol

La eficacia de los desinfectantes a base de etanol se evaluó a diferentes concentraciones. La efectividad del etanol (EA, Nacalai Tesque) fue probada en concentraciones de 80%, 60%, 50%, 40%, 35%, 32,5%, 30%, 27,5%, 25%, 22,5% y 20% (p/p). El isopropanol (IPA, Nacalai Tesque) se ensayó a una concentración del 70% (p/p).

En primer lugar, se realizó una evaluación in vitro de la eficacia del desinfectante. En un tubo de 1500 μL ; Se mezclaron 5 μL de PBS que contenía virus ($5,0 \times 10^4$ TCID₅₀ en 5 μL de PBS) con 45 μL de varios desinfectantes durante 15 segundos. Posteriormente, las soluciones resultantes se neutralizaron con 450 μL de DMEM, y se midieron los títulos virales restantes (14). Los títulos límite de detección del virus fueron $10^{0,2}$ de TCID₅₀.

A continuación, se evaluó la eficacia de los desinfectantes contra virus en la piel humana utilizando el modelo construido (evaluación ex vivo). Cada solución de virus ($1,0 \times 10^5$ TCID₅₀ en 2 μL PBS) se aplicó a la superficie de la piel humana. A continuación, cada muestra de piel se incubó durante 15 minutos a 25 °C con 45%–55% de humedad relativa, para secar completamente la mezcla viral en la piel.

Posteriormente, se aplicaron 18 μL de desinfectante a cada superficie de muestra de piel durante 15 segundos y luego se secó al aire durante 5 min. Después del secado, los virus restantes en la piel se recuperaron con 1000 μL de DMEM y se midió la carga viral restante (14). Los títulos límite de detección del virus fueron $10^{0,5}$ TCID₅₀. Para determinar la efectividad de los desinfectantes bajo cada condición, se calcularon las reducciones logarítmicas en los títulos de virus, normalizándose con los títulos de control de PBS.

Se realizaron 3 experimentos independientes para cada condición y los resultados fueron expresado como la media \pm error estándar de la media.

Consideraciones éticas

El protocolo del estudio, incluidos los procedimientos de recolección de muestras, fue revisado y aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kioto (ERB-C-1593). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes del estudio.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con GraphPad Prism 7 (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). El tiempo se definió como una variable explicativa (eje X), y el log del título de virus se definió como una variable explicada (eje Y). Se realizó un análisis de regresión lineal con una función de enlace logarítmico para crear una curva de regresión. El límite de medición del título de SARS-CoV-2 fue $10^{0,5}$ DICT⁵⁰; por lo tanto, el tiempo de supervivencia se definió como el valor X, cuando los valores Y de las curvas de regresión fueron 0,5. La vida media se calculó a partir de la pendiente de cada curva de regresión cuando los títulos de virus que quedaban en la superficie eran de 2,0 y 3,0 log₁₀ TCID₅₀ (6, 12).

Resultados

Los títulos de virus que quedaban en las superficies de plástico o piel humana se midieron a lo largo del tiempo (**Figura complementaria S1**), y el tiempo de supervivencia y la vida media se calcularon a partir de estos valores de los títulos, por análisis de regresión (**Figura complementaria S2**).

En el análisis de la **superficie plástica**, los tiempos de supervivencia de la cepa Wuhan, la variante Alfa, la variante Beta, la variante Gamma, la variante Delta y la variante Ómicron fueron 56,0 horas (intervalo de confianza [IC] del 95 %, 39,0–76,7 h), 191,3 horas (IC del 95 %, 152,5–232,1 h), 156,6 horas (95 % IC, 122,7–192,9 h), 59,3 horas (95 % IC, 43,9–77,7 h), 114,0 horas (95 % IC, 91,3–139,1 h) y 193,5 horas (IC 95 %, 153,1–236,2 h), respectivamente (**Figura 1A y Tabla complementaria S1**).

En el análisis de la **superficie de la piel humana**, los tiempos de supervivencia de la cepa de Wuhan, la variante alfa, la variante beta, la variante gamma, la variante delta y la variante Ómicron fueron 8,6 horas (95 % IC, 6,5–10,9 h), 19,6 horas (IC 95 %, 14,8–25,3 h), 19,1 horas (IC 95 %, 13,9–25,3 h), 11,0 horas (IC 95 %, 8,1–14,7 h), 16,8 horas (IC 95 %, 13,1–21,1 h) y 21,1 horas (IC 95 %, 15,8–27,6 h), respectivamente (**Figura 1B y Tabla Suplementaria S1**).

Las variantes Alfa, Beta, Delta y Ómicron tuvieron tiempos de supervivencia significativamente más largos que la cepa Wuhan, y la variante Ómicron tuvo el mayor tiempo de supervivencia. Además, la vida media mostró la misma tendencia que el tiempo de supervivencia (**Figura 1C y 1D y Tabla complementaria S2**).

La evaluación de la **eficacia del desinfectante** in vitro mostró que la cepa Wuhan y la variante gamma se inactivaron por completo en 15 segundos por 32.5% EA (reducción logarítmica > 4), las variantes Alpha, Beta y Delta se desactivaron por completo en 15 segundos con un 35 % de EA, y la variante Ómicron se inactivó por completo en 15 segundos por 40% EA (**Figura 2A y Tabla complementaria S3**).

Las variantes Alpha, Beta, Delta y Ómicron fueron, por lo tanto, ligeramente más resistentes al etanol que la cepa de Wuhan.

Sin embargo, en la piel humana, una evaluación modelo ex vivo mostró que todos los virus eran completamente inactivados después de la exposición a 35% de EA durante, 15 segundos (reducción logarítmica > 4; **Figura 2B y Tabla complementaria S4**).

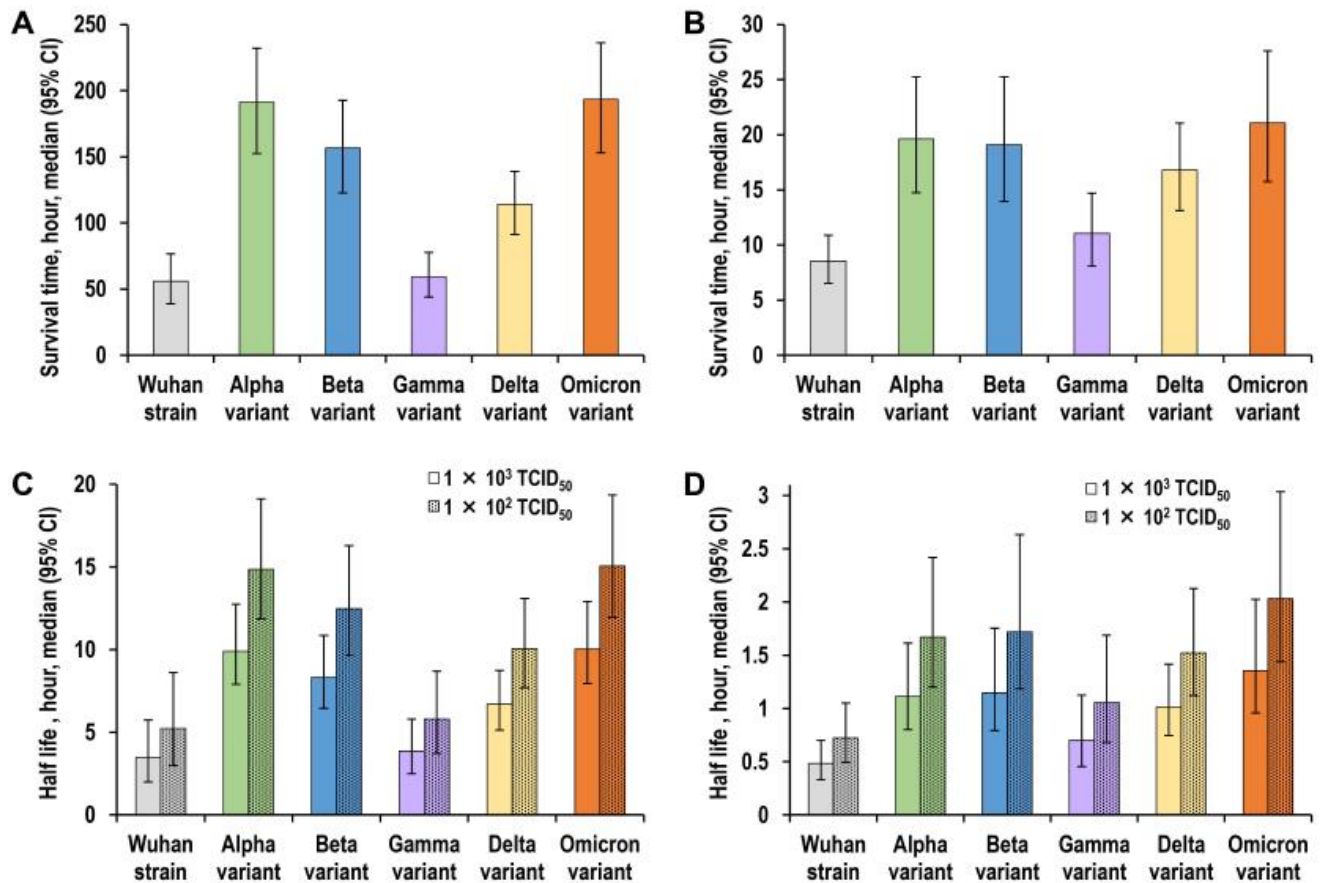


Figure 1. Survival times and half-lives of viruses on plastic and skin surfaces. (A, C)

Survival times (A) and half-lives (C) of various viruses on a plastic surface. (B, D) Survival times (B) and half-lives (D) of various viruses on the human skin surface. Survival time was defined as the time until the virus on the surface could no longer be detected. All half-lives in the graphs refer to the half-life when 1×10^2 or 1×10^3 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of virus remained on the skin surface. Data are expressed as the median \pm 95% confidence interval.

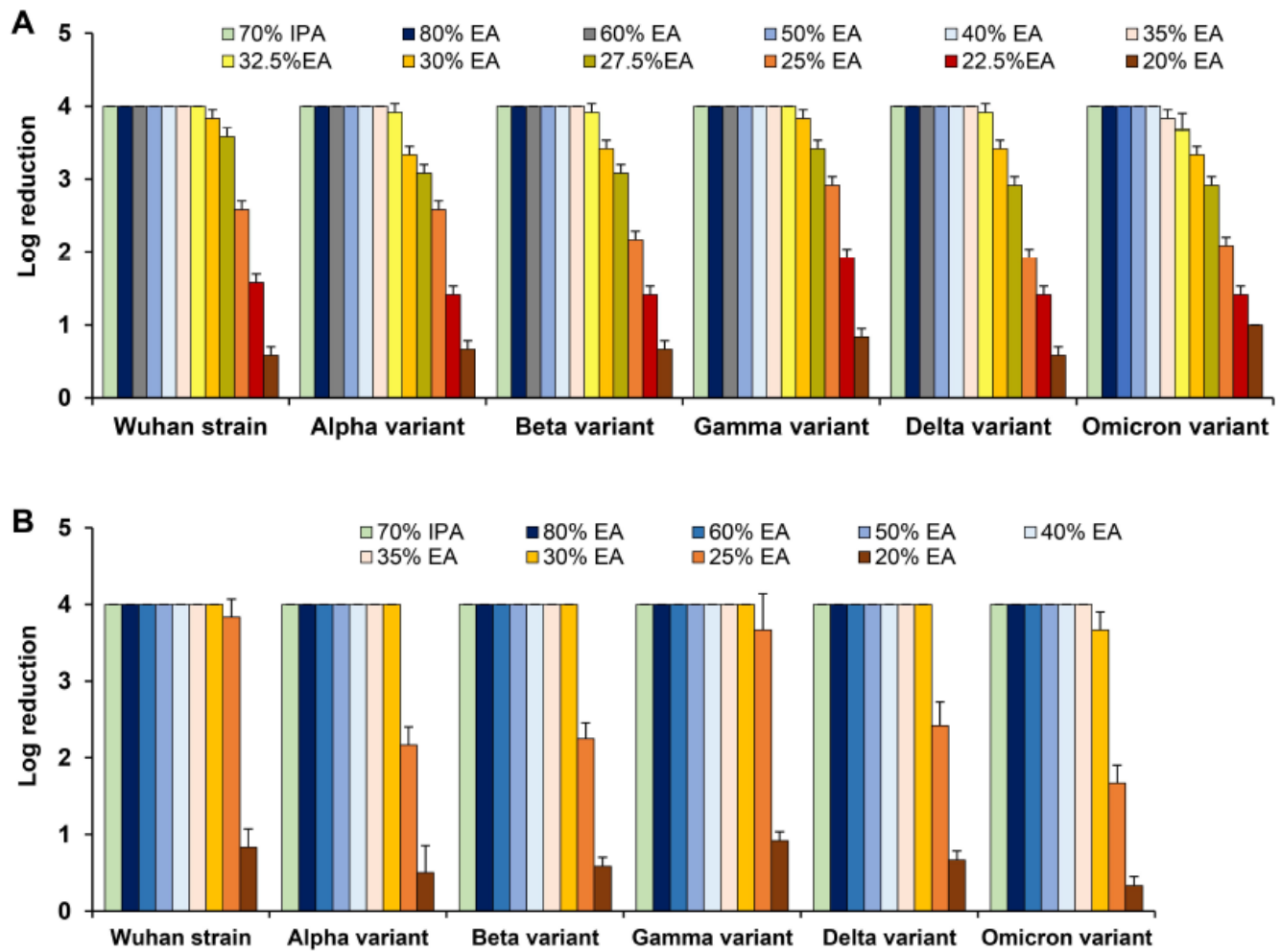


Figure 2. Evaluation of disinfectant effectiveness. Both *in vitro* evaluation (A) and *ex vivo* evaluation (B) were performed, and the log reduction was calculated from the residual viral titer after each alcohol-based disinfectant exposure (see Supplementary Table S3 and S4). The results are expressed as the mean \pm standard error. EA, ethyl alcohol; IPA, isopropanol.

Discusión

En el año 2020, la estabilidad ambiental de la cepa Wuhan se informó en varios estudios (6, 7, 15). Además, algunos estudios sugirieron que las variantes Alfa y Beta tienen el mismo grado de estabilidad ambiental (8, 9). Sin embargo, ningún estudio ha comparado directamente otras cepas con la cepa de Wuhan, y las diferencias en la estabilidad ambiental entre la cepa de Wuhan y todas las VOC, incluidas las variantes Ómicron y Delta, no se conocían previamente.

Nuestro estudio mostró que, en superficies plásticas y de piel, las variantes Alpha, Beta, Delta y Ómicron exhibieron tiempos de supervivencia 2 veces más largos que los de la cepa Wuhan y mantuvieron la infectividad durante más de 16 horas en las superficies de la piel.

La alta estabilidad ambiental de estas VOC podría aumentar el riesgo de transmisión por contacto y contribuir a su propagación.

Además, en este análisis, no hubo diferencia significativa en los tiempos de supervivencia entre las variantes Alfa y Beta, y tuvieron una estabilidad ambiental similar, que es consistente con los resultados de estudios previos (8, 9).

La variante Ómicron es actualmente una gran preocupación debido al rápido aumento número de pacientes infectados en todo el mundo. El cambio en el sitio objetivo de la infección, desde la parte inferior del tracto respiratorio al tracto respiratorio superior, y el escape de los anticuerpos neutralizantes podrían ser factores potenciales para la propagación de la variante Ómicron (1-5).

Este estudio mostró que la variante Ómicron también tiene la mayor estabilidad ambiental entre los VOC, lo que sugiere que esta alta estabilidad también podría ser uno de los factores que han permitido que la variante Ómicron reemplace a la variante Delta y que se extienda rápidamente.

Aunque las variantes Alfa, Beta, Delta y Ómicron mostraron un ligero aumento en la resistencia al etanol en respuesta al aumento de la estabilidad ambiental, todas las VOC en la superficie de la piel fueron completamente inactivadas por 15 segundos de exposición a alcohol etílico (EA) al 35%. Por lo tanto, se recomienda enfáticamente que las prácticas actuales de control de infecciones (higiene de manos) utilicen desinfectantes con concentraciones apropiadas de EA (>52 p/p% o >60 v/v%), según lo propuesto por la Organización Mundial de la Salud (16, 17).

Este estudio tuvo 3 limitaciones. En primer lugar, la razón de la mayor estabilidad ambiental de las variantes Alfa, Beta, Delta y Ómicron se desconoce en esta etapa, y la evaluación usando los virus recombinantes podrían identificar los factores que determinan esto.

En segundo lugar, el tiempo de supervivencia y la vida media obtenida en esta evaluación de estabilidad ambiental, puede variar dependiendo de las condiciones externas del medio ambiente, y la composición de los fluidos corporales que contienen el virus. En este estudio, al analizar con precisión las diferencias en la estabilidad entre las VOC, el virus objetivo fue purificado por ultracentrifugación, y se utilizó PBS como disolvente.

En tercer lugar, la relación entre la cantidad del virus que permanece en la superficie y el riesgo de transmisión aún no está claro en esta etapa. Por lo tanto, podría ser razonable interpretar el valor del tiempo de supervivencia en este estudio como un valor de referencia.

En conclusión, aclaramos la estabilidad ambiental de las VOC, lo que es una importante información para el control de infecciones. Además, estos hallazgos contribuirán en gran medida a dilucidar el mecanismo de propagación de a con la adición de análisis genéticos.

Referencias

1. Tracking SARS-CoV-2 variants: World Health Organization; 2021 [Available from: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>].
2. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant - United States, December 1-8, 2021. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2021;70(50):1731-4.
3. National Center for I, Respiratory Diseases DoVD. Science Brief: Omicron (B.1.1.529) Variant. CDC COVID-19 Science Briefs. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US) Unless a copyright is indicated, information on CDC's sites, blogs, and applications is in the public domain and may be copied and distributed without permission.; 2020.
4. Enhancing readiness for Omicron (B.1.1.529): Technical brief and priority actions for Member States. World Health Organization: World Health Organization; 2021 [Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/2021-12-23-global-technical-brief-and-priority-action-on-omicron.pdf?sfvrsn=d0e9fb6c_8].
5. He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. MedComm. 2021;2(4):838-45.
6. Hirose R, Ikegaya H, Naito Y, Watanabe N, Yoshida T, Bandou R, et al. Survival of SARS-CoV-2 and influenza virus on the human skin: Importance of hand hygiene in COVID-19. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2020.
7. 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. The New England journal of medicine. 2020;382(16):1564-7.
8. Pottage T, Garratt I, Onianwa O, Spencer A, Paton S, Verlander NQ, et al. A comparison of persistence of SARS-CoV-2 variants on stainless steel. The Journal of hospital infection. 2021;114:163-6.
9. Meister TL, Fortmann J, Todt D, Heinen N, Ludwig A, Brüggemann Y, et al. Comparable Environmental Stability and Disinfection Profiles of the Currently Circulating SARS-CoV-2 Variants of Concern B.1.1.7 and B.1.351. The Journal of infectious diseases. 2021;224(3):420-4.
10. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2020;117(13):7001-3.

11. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *Journal of virology*. 2010;84(24):12658-64.
12. Hirose R, Itoh Y, Ikegaya H, Miyazaki H, Watanabe N, Yoshida T, et al. Evaluation of the Residual Disinfection Effects of Commonly Used Skin Disinfectants against Viruses: An Innovative Contact Transmission Control Method. *Environmental Science & Technology*. 2021;55(23):16044-55.
13. Barcena M, Oostergetel GT, Bartelink W, Faas FG, Verkleij A, Rottier PJ, et al. Cryoelectron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(2):582-7.
14. Hirose R, Bandou R, Ikegaya H, Watanabe N, Yoshida T, Daidoji T, et al. Disinfectant effectiveness against SARS-CoV-2 and influenza viruses present on human skin: model-based evaluation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2021.
15. Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen HL, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe*. 2020;1(1):e10.
16. Golin AP, Choi D, Ghahary A. Hand sanitizers: A review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery, and efficacy against coronaviruses. *American journal of infection control*. 2020;48(9):1062-7.
17. Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. World Health Organization.: World Health Organization; 2020 [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331495>].