



## PROGRAMA DE VOLUNTARIADO ACADÊMICO

### TRADUÇÃO LIVRE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS SOBRE O COVID-19

Este projeto visa realizar a tradução livre de artigos científicos relacionados ao COVID-19, publicados em revistas internacionais de renome, com o objetivo de fornecer material traduzido e facilitar a compreensão e acesso à informação relevante aos profissionais de saúde de diversas áreas e a população em geral. Não há conflitos de interesse.

**Título original:** Inactivation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 by WHO-Recommended Hand Rub Formulations and Alcohols

**Autores:** KRATZEL, Annika; TODT, Daniel ; V' KOVSKI, Philip; *et al.*

**Publicado em:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). April 13, 2020

**DOI:** 10.3201/eid2607.200915

## Inativação do Coronavírus 2 relacionado a Síndrome Respiratória Aguda Grave por formulações e álcoois para limpeza das mãos recomendados pela OMS

### Resumo

Instruções de controle de infecção requerem o uso de soluções de limpeza das mãos à base de álcool para inativar o coronavírus relacionado a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Nós determinamos a atividade virucida das formulações de limpeza de mãos recomendadas pela Organização Mundial de Saúde, em força total e em múltiplas diluições e dos seus ingredientes ativos. Todos os desinfetantes se mostraram eficientes para a inativação do vírus.

### Introdução

O coronavírus relacionado a síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é o terceiro coronavírus altamente patogênico a cruzar a barreira das espécies para a população humana nos últimos 20 anos (1-3). A infecção pelo SARS-CoV-2 é associada com a doença do

coronavírus (COVID-19), que se caracteriza por dificuldade respiratória grave, febre, tosse e altas taxas de mortalidade, especialmente em pessoas mais velhas e aqueles com condições de saúde subjacentes (3). A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou pandemia de SARS-CoV-2 em 11 de março de 2020 (4), e em 8 de abril foi reportado um total de 1.447.446 casos confirmados e 83.471 mortes por SARS-CoV-2 mundialmente (5).

A transmissão de humano a humano do SARS-CoV-2 é eficiente e pessoas infectadas podem transmitir o vírus mesmo quando não apresentam sintomas, ou são apenas leves (3). Por não termos drogas antivirais ou vacinas disponíveis, a contenção do vírus e prevenção de infecção são atualmente as maiores prioridades. Para limitar a disseminação do vírus a higienização efetiva das mãos é crucial. Portanto, desinfetantes facilmente disponíveis, porém eficientes são necessários. Os guias da OMS para higiene das mãos na área da saúde sugerem 2 formulações a base de álcool para higienização das mãos para reduzir a infectividade e disseminação de patógenos (6). As recomendações da OMS são baseadas em ação rápida, atividade antimicrobiana de alto espectro, além de acessibilidade

e segurança. As formulações originais da OMS falharam em atender os requisitos de eficácia da Norma Europeia 1.500 em testes prévios (7). Porém, Suchomel et al. (8) sugeriu versões modificadas com concentrações maiores de etanol: 80% (p/p) (85,5% [vol/vol]; formulação I), ou isopropanol, 75% (p/p) (81,3% [vol/vol]; formulação II). Posteriormente, complementaram estes por reduzir concentrações de glicerol (9).

Nós mostramos previamente que essas formulações modificadas da OMS conseguiram inativar o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV; 10), que estão relacionados ao SARS-CoV-2. Recomendações atuais para inativar o SARS-CoV-2 foram traduzidas de achados de outros coronavírus (11). Para avaliar se esses desinfetantes a base de álcool também inativam o SARS-CoV-2 efetivamente, nós testamos diferentes concentrações das formulações originais e modificadas I e II da OMS (6, 9), etanol e propano-2-ol para atividade viricida.

#### O estudo:

Nós propagamos SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/Munich-1.1/2020/929) em células VeroE6 (gentilmente fornecidas por M. Muller e C. Drosten; Charité, Berlim, Alemanha). Nós cultivamos células VeroE6 no meio mínimo essencial modificado de Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado em calor, 1% de aminoácidos não essenciais, 100 µg/ml de estreptomicina e 100 UI/ml de penicilina e 15 mMol de HEPES (Gibco; Thermofisher, <https://www.thermofisher.com>).

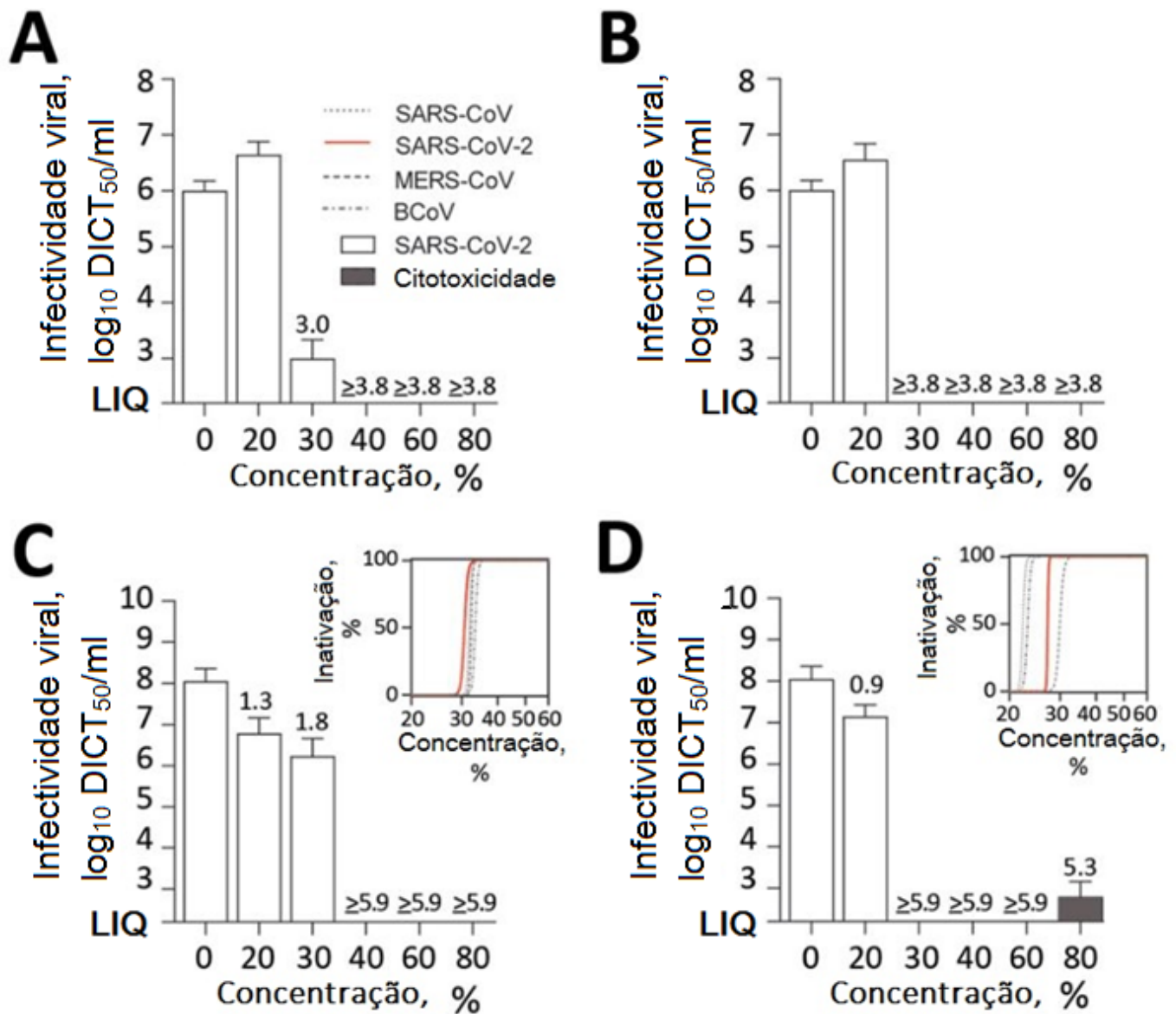
A formulação I original da OMS consiste em etanol 80% (vol/vol), glicerol 1,45% (vol/vol) e peróxido de hidrogênio 0,125% (vol/vol). A formulação II original da OMS consiste em propano-2-ol 75% (vol/vol), glicerol 1,45% (vol/vol) e peróxido de hidrogênio 0,125% (vol/vol). A formulação I modificada da OMS consiste em etanol 80% (p/p), glicerol 0,725% (vol/vol) e peróxido de hidrogênio 0,125% (vol/vol). A formulação II modificada a base de isopropil da OMS contém propano-2-ol 75% (p/p), glicerol 0,725% (vol/vol) e peróxido de hidrogênio

0,125% (vol/vol) (9). Nós também preparamos etanol (CAS 64-17-5) e propano-2-ol (CAS 64-63-0) em diluições de vol/vol para investigação.

Nós realizamos os estudos de atividade virucida usando um teste de suspensão quantitativo com 30 segundos de tempo de exposição (6). Em suma, nós misturamos 1 parte de suspensão de vírus com 1 parte de carga orgânica (0,3% de albumina sérica bovina como substância de interferência) e 8 partes de solução desinfetante de diferentes concentrações. Após 30 segundos de exposição, nós diluímos serialmente as amostras e determinamos a dose infectante de 50% por cultura de tecido (DICT<sub>50</sub>) por milímetro usando um corante de violeta cristal e, subsequentemente, pontuando o número de sítios com efeitos citopáticos. Nós calculamos o DICT<sub>50</sub> pelo algoritmo de Spearman-Kärber, como descrito (12). Nós monitoramos os efeitos citotóxicos dos desinfetantes usando o corante de violeta cristal e análise óptica para alterações de densidade e morfologia da monocamada celular na ausência do vírus. Nós quantificamos efeitos citotóxicos de forma análoga o DICT<sub>50</sub>/ml de infectividade do vírus.

Determinamos curvas de dose-resposta como percentual normalizado de inativação do vírus versus percentual logaritmo de concentração de desinfetante por regressão não linear usando um método robusto de adequação no DICT<sub>50</sub> normalizado implementado na versão 8.0.3 Prisma (GraphPad, <https://www.graphpad.com>). Nós traçamos curvas de referência para o SARS-CoV, MERS-CoV e CoV bovino (BCoV) usando dados publicados anteriormente (9). O BCoV é frequentemente utilizado como substituto para CoVs humanos altamente patogênicos. Avaliamos o DICT<sub>50</sub> médio e os desvios padrão das médias de três experimentos individuais. Identificamos valores discrepantes usando o teste de Grubb no Prism. Calculamos fatores de redução (FRs) para cada condição de tratamento da seguinte maneira:

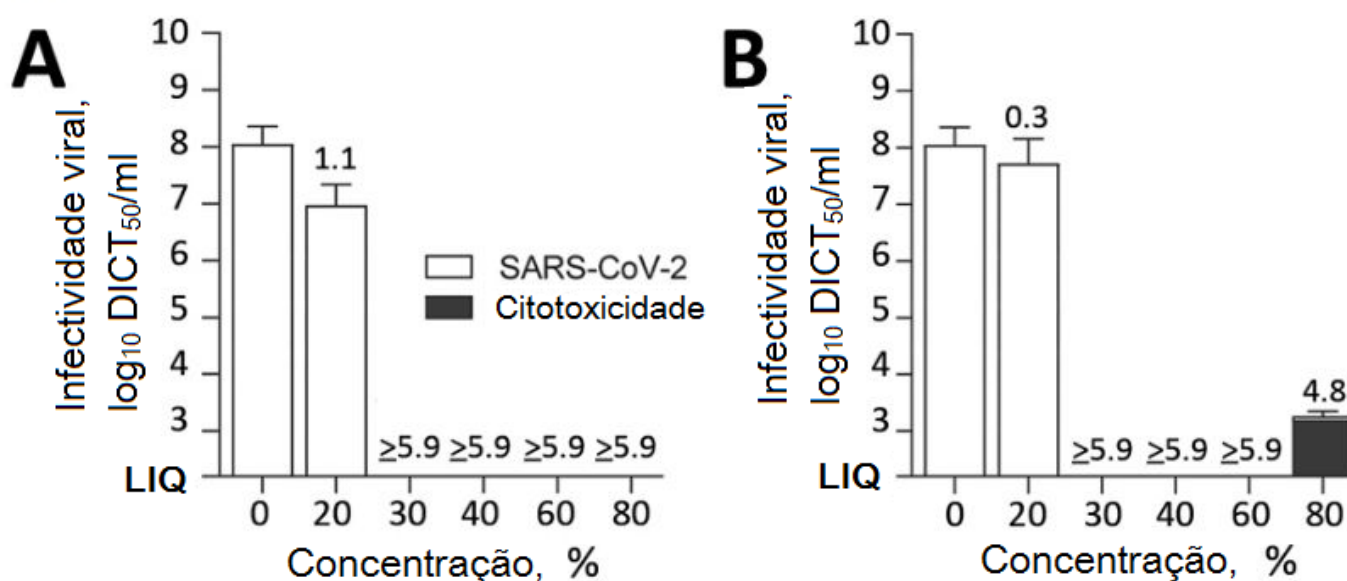
$$FR = \text{tratamento} - \text{controle} = \log_{10} \left( \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) - \log_{10} \left( \frac{\sum_{j=1}^m x_j}{m} \right)$$



**Figura 1.** Atividade virucida das formulações originais e modificadas I e II de higienização das mãos recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para inativar o coronavírus 2 relacionado a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). As médias de 3 experimentos independentes com desvio padrão-DP (barras de erros) e a porcentagem de inativação em diferentes concentrações são mostradas. A) formulação original I da OMS; B) formulação original II da OMS; C) formulação modificada I da OMS; D) formulação modificada II da OMS. As inserções nos painéis C e D mostram análises de regressão da inativação do coronavírus. A barra cinza escura mostra efeitos citotóxicos, calculados de forma análoga à infectividade do vírus. Os fatores de redução estão incluídos acima da barra. As diluições das formulações da OMS variaram de 0 a 80%, com um tempo de exposição de 30 segundos. Os títulos virais são exibidos como valores de DICT<sub>50</sub>/mL. BCoV, coronavírus bovino; LIQ, limite inferior de quantificação; MERS-CoV, coronavírus relacionando a síndrome respiratória do Oriente Médio; SARS-CoV, coronavírus relacionado a síndrome respiratória aguda grave; SARS-CoV-2, coronavírus 2 relacionado a síndrome respiratória aguda grave; DICT<sub>50</sub>/mL, dose infectante de 50% por cultura de tecido.

Nossos resultados mostraram que o SARS-CoV-2 foi altamente suscetível às formulações originais e modificadas da OMS (Figura 1). As versões originais e modificadas da formulação I inativaram eficientemente o vírus. A formulação original I de 80% (vol. / vol.) de etanol tinha um FR de  $\geq 3,8$  (Figura 1, painel A) e a formulação modificada I de 80% (p/p) de etanol tinha um FR de  $\geq 5,9$  (Figura 1, painel C). Diluições  $\geq 40\%$  ainda eram efetivas (Figura 1, painéis A e C). A análise de regressão subsequente da formulação modificada I revelou perfis de inativação semelhantes em comparação com SARS-CoV, MERS-CoV e BCoV. (Figura

1, painel C). As versões original e modificada da formulação II também foram eficazes. A formulação original II com 75% (vol. / vol.) de propano-2-ol teve uma redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) de  $\geq 3,8$  (Figura 1, painel B) e a formulação modificada II de 75% (p / p) de propano-2-ol teve uma redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) de  $\geq 5,9$ . Diluição  $\geq 30\%$  (vol. / vol.) também resultou em inativação viral completa (Figura 1, painel D). A análise de regressão da formulação II modificada da OMS mostrou que o perfil de inativação de SARS-CoV-2 era comparável ao de SARS-CoV, BCoV e MERS-CoV (Figura 1, painel D).



**Figura 2.** Efeito de álcoois disponíveis comercialmente na inativação de SARS-CoV-2. As médias de 3 experimentos independentes com desvio padrão-DP (barras de erros) são mostradas. A) Resultados para etanol. B) Resultados para propano-2-ol. A barra cinza escura indica efeitos citotóxicos, calculados de forma análoga à infectividade do vírus. A linha tracejada representa o limite de detecção. Os fatores de redução estão incluídos acima da barra. As concentrações de biocidas variaram de 0 a 80%, com um tempo de exposição de 30 segundos. Os títulos virais são exibidos como valores de DICT<sub>50</sub>/mL. LIQ, limite inferior de quantificação; SARS-CoV-2, coronavírus 2 relacionado a síndrome respiratória aguda grave; DICT<sub>50</sub>/mL, dose infectante de 50% por cultura de tecidos.

Também investigamos a suscetibilidade do SARS-CoV-2 contra os componentes ativos das formulações recomendadas pela OMS, que também são os ingredientes ativos dos desinfetantes para as mãos disponíveis no mercado. O etanol (Figura 2, painel A) e propano-2-ol (Figura 2, painel B) foram capazes de reduzir

os títulos virais aos níveis basais em 30 segundos com FRs entre 4,8 e  $\geq 5,9$ . Além disso, observamos que uma concentração de  $\geq 30\%$  (vol. / vol.) de etanol ou propano-2-ol é suficiente para a inativação viral completa (Figura 2).

## Conclusões

Descobrimos que o SARS-CoV-2 foi inativado eficientemente pelas formulações recomendadas pela OMS, apoiando seu uso em sistemas de saúde e surtos virais. Ambas as formulações originais e modificadas foram capazes de reduzir os títulos virais para o nível basal dentro de 30 segundos. Além disso, etanol e propano-2-ol foram eficientes na inativação do vírus em 30 segundos a uma concentração > 30% (vol. / vol.). O álcool constitui a base de muitos antissépticos para mãos rotineiramente usadas em serviços de saúde. Uma ressalva deste estudo é o tempo de inativação definido em exatamente 30 segundos, o qual é o tempo recomendado, mas não realizado rotineiramente na prática. Nossas descobertas são cruciais para minimizar a transmissão viral e maximizar a inativação do vírus no atual surto de SARS-CoV-2.

Kratzel é candidata a PhD afiliada ao Instituto de Virologia e Imunologia, Berna e Mittelhäusern, Suíça, Departamento de Doenças Infecciosas e Patobiologia, Faculdade Vetsuisse, Universidade de Berna, Berna, Suíça e Escola de Pós-Graduação em Ciências Celular e Biomédica, Universidade de Berna. Seus interesses de pesquisa incluem coronavírus.

## Reconhecimento

Este artigo foi pré-impresso em <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.10.986711v1>.

## Referências

1. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348:1967–76.
2. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012;367:1814–20.
3. Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55:105924.
4. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19: 11 March 2020 [cited 2020 Apr 8] <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
5. Gardner L. Update January 31: modeling the spreading risk of 2019-nCoV. Johns Hopkins University Center for Systems Science and Engineering; 2020 Jan 31 [cited 2020 Mar 31] <https://systems.jhu.edu/research/public-health/ncov-model-2>
6. World Health Organization. WHO guidelines on hand hygiene in health care: first global patient safety challenge clean care is safer care. Geneva: the Organization; 2009 [cited 2020 Apr 08] [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44102/9789241597906\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44102/9789241597906_eng.pdf)
7. European Committee for Standardization. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic hand disinfection. Test method and requirement. Brussels: the Committee; 2013 [cited 2020 Apr 8] <https://standards.globalspec.com/std/1597777/EN%201500>
8. Suchomel M, Kundi M, Allegranzi B, Pittet D, Rotter ML. Testing of the World Health Organization-recommended formulations for surgical hand preparation and proposals for increased efficacy. *J Hosp Infect*. 2011;79:115–8.
9. Suchomel M, Kundi M, Pittet D, Rotter ML. Modified World Health Organization hand rub formulations comply with European efficacy requirements for preoperative surgical hand preparations. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:245–50.

10. Siddharta A, Pfaender S, Vielle NJ, Dijkman R, Friesland M, Becker B, et al. Virucidal activity of World Health Organization-recommended formulations against enveloped viruses, including Zika, Ebola, and emerging coronaviruses. *J Infect Dis.* 2017;215:902–6.
11. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* 2020;104:246–51.
12. George VG, Hierholzer JC, Ades EW. Cell culture. In: *Virology methods manual*. Mahy BWJ, Kangro HO, editors. Academic Press: London; 1996. p. 3–24.

---

**Traduzido por**<sup>1</sup>: Paola Bernardi da Silva e Rodrigo Ribas Azzolini

**Revisado por**<sup>1</sup>: Brenda Malucelli Rocha, Christyan H. T. Takahashi, Giovanna Dias Escarante

**Supervisão**<sup>2</sup>: Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize

1. Acadêmicos de Medicina da Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Toledo.
2. Professor do curso de Medicina da UFPR, campus Toledo.