



TRIClO2LOGY

CHLOORDIOXIDE (ClO2)

WERKING BIJ VIRUSSEN

TREFWOORDEN EN ACRONYMEN

ClO₂ – Chloordioxide

Covalente wijziging – Wijziging van gesynthetiseerde eiwitten, met inbegrip van de toevoeging en/of verwijdering van chemische groepen

DNA – Desoxyribonucleïnezuur

Enzymgekoppelde immuunadsorbent-techniek (in het Engels tot ELISA afgekort) – Een analytische biochemische techniek voor de opsporing van antigenen in een staal

HA (Hemagglutinine) – Een eiwit dat op het oppervlak van influenzavirussen wordt aangetroffen en dat een belangrijke rol speelt bij het vermogen om gastheercellen te infecteren

HeLa cellen – Een lijn van onsterfelijke cellen die bij wetenschappelijk onderzoek wordt gebruikt, afgeleid van baarmoederhalskankercellen van Henrietta Lacks

Gastheerel – Een levende cel waarin een virus zich vermenigvuldigt

M2-eiwit – Het eiwit M2 is een protonselectief viroporine(kanaal) in de virale omhulling van het influenzavirus type A

NA (Neuraminidase) – Een enzym op de buitenkant van influenzavirussen dat essentieel is voor het vrijkomen van virusreplica's uit een geïnfecteerde gastheerel

Pathogeniteit – Het vermogen van een microbe om ziekte/schade te veroorzaken bij een gastheer

Proton – Een subatomair deeltje met een enkelvoudige, positieve elektrische lading; ook bekend als een waterstofion (H⁺)

HPLC (hogedrukvlloeistofchromatografie) met omgekeerde fase – Een techniek voor de scheiding van mengsels met behulp van een apolaire stationaire fase

RNA – Ribonucleïnezuur

RT-PCR (reverse-transcriptase-polymerasekettingreactie) – Een techniek die de omgekeerde transcriptie van RNA in DNA en de amplificatie van specifieke DNA-delen combineert met behulp van de polymerasekettingreactie

Sedimentatieanalyse – De analyse van virusbestanddelen door centrifugatie van HeLa-cellen

Figuur 1. Vergelijking van de grootte van een menselijke rode bloedcel en die van verschillende micro-organismen. Beeld van de *Royal Society of Biology*, aangepast (<https://www.rsb.org.uk/biologist-features/158-biologist/features/1490-larger-than-life>).



ABSTRACT

Chloordioxide (ClO₂) is een krachtig biocide met bewezen werkzaamheid tegen een groot aantal micro-organismen, waaronder virussen. De virucide werking van chloordioxide en het mechanisme daarachter zijn wetenschappelijk onderzocht. Daarbij is vastgesteld dat chloordioxide virussen op verschillende manieren deactiveert. Zo wijzigt chloordioxide eiwitten en nucleïnezuuren. Inzicht in de werking van chloordioxide draagt bij tot de verbetering van producten die worden gebruikt voor infectiepreventie.

INTRODUCTIE

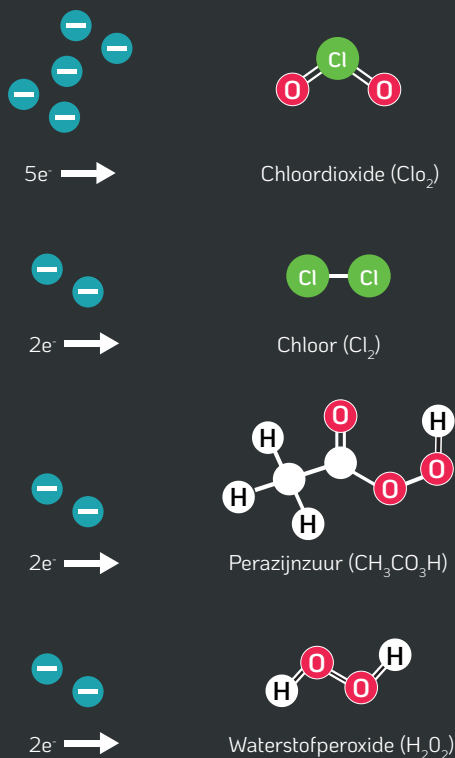
Virussen bevinden zich op de grens van wat als leven wordt beschouwd. Virussen bestaan uit genetisch materiaal, ofwel desoxyribonucleïnezuur (DNA) ofwel ribonucleïnezuur (RNA), omhuld door een laag eiwitten die de capside of eiwitmantel wordt genoemd. Bepaalde virussen zijn bedekt met een extra laag, een omhulling die uit lipiden en eiwitten bestaat. Van alle besmettelijke agentia zijn virussen de kleinste. Theoretisch zouden 500 miljoen rhinovirussen (die verkoudheden veroorzaken) op de kop van een speld passen (Microbiology Society, 2020) (Figuur 1).

Virussen kunnen zich alleen vermenigvuldigen binnen de cellen van andere levende organismen. Deze staan bekend als gastheercellen. Daarom worden ze aangeduid als obligate intracellulaire parasieten.

Virale infecties leiden tot een groot aantal ziekten, zoals Covid-19, ebola, mazelen, griep, hepatitis, polio en pokken.

De pathogeniteit van een virus bij de mens wordt bepaald door virale affiniteit, de wijze van binnendringen in het menselijk lichaam, en de vermenigvuldiging in de gastheercellen.

Het deactiveren en vernietigen van virussen in de directe omgeving is van vitaal belang om het risico op een virale infectie te verminderen. Dit wordt voornamelijk bereikt door desinfectie en het volgen van procedures voor infectiepreventie waar van toepassing.



Figuur 2. Het oxidatievermogen van verschillende biociden. Het oxidatievermogen van chemische stoffen geeft het aantal elektronen aan dat één molecule kan accepteren van omringende moleculen, d.w.z. van micro-organismen, met inbegrip van meervoudige reducties.

MEEST RESISTENT TEGEN DESINFECTIEMIDDELEN	BACTERIËLE SPOREN	<i>Bacillus subtilis, Clostridium difficile</i>
	MYCOBACTERIËN	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	NIET-OMHULDE VIRUSSEN	<i>Poliovirus, norovirus</i>
	SCHIMMELS	<i>Candida spp., Aspergillus spp.</i>
	VEGETATIEVE BACTERIËN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	OMHULDE VIRUSSEN	<i>Coronavirus</i>
MINST RESISTENT TEGEN DESINFECTIEMIDDELEN		

Figuur 3. Weerstand van micro-organismen tegen desinfectantia. Beeld van *Centers for Disease Control and Prevention* (2008), aangepast.

CHLOORDIOXIDE ALS DESINFECTANS

Chloordioxide (ClO₂) wordt al een eeuw lang gebruikt voor de zuivering van water. De Wereldgezondheidsorganisatie (WGO) staat achter het gebruik van ClO₂ voor het desinfecteren van drinkwater. De afgelopen decennia is gebleken dat ClO₂ zowel in oplossing als in gasvorm een werkzaam biocide is tegen bacteriën, virussen, protozoën, gisten, schimmels, mycobacteriën en bacteriesporen.

ClO₂ is een oxidatiemiddel. Dat heeft het te danken aan zijn vermogen om elektronen te onttrekken aan moleculen die zich in de buurt bevinden, zoals die van virussen. ClO₂ kan in totaal vijf elektronen verwerven uit omliggende moleculen, waardoor het een superieur biocide is in vergelijking met andere oxidatiemiddelen, zoals verdunde chloor, perazijnzuur en waterstofperoxide, die slechts twee elektronen kunnen verwerven (Fukayama e.a., 1986) (Miura en Shibata, 2010) (Figuur 2).

DE VIRUCIDE WERKING VAN CHLOORDIOXIDE

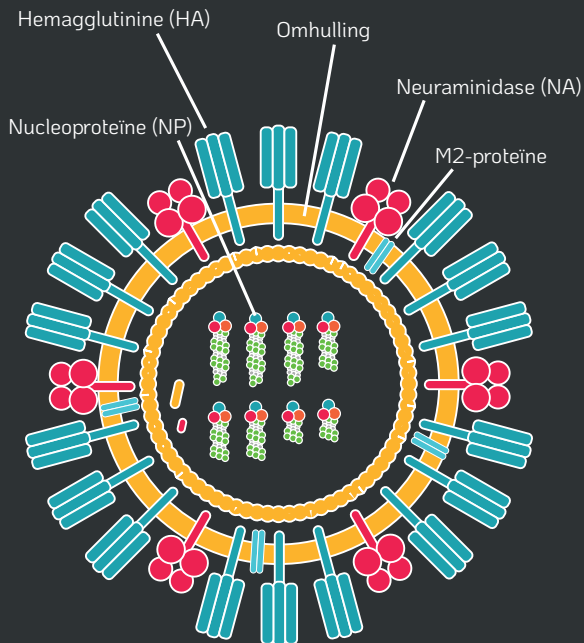
Virussen zijn ofwel omhuld ofwel niet-omhuld. Volgens de *Centers for Disease Control and Prevention* (in de VS) worden omhulde virussen door wetenschappers beschouwd als de groep micro-organismen die het meest gevoelig is voor deactivatie door desinfectantia. Van vegetatieve bacteriën, schimmels, niet-omhulde virussen, mycobacteriën en sporen van bacteriën wordt aangenomen dat ze moeilijker te deactiveren zijn met behulp van desinfecterende middelen (Centers for Disease Control and Prevention, 2008) (Figuur 3).

Tristels desinfectiemiddelen op basis van chloordioxide zijn getest in overeenstemming met de normen inzake virusbestrijding (EN 14476 en EN 14675). Dat zijn de normen van de Europese regulator inzake het gebruik van virucide desinfectantia op respectievelijk geneeskundig en diergeneeskundig gebied.

Bij de uitvoering van medische tests maken wetenschappers gebruik van knaagdiernorovirussen, het poliovirus type 1 en het adenovirus type 5. Dat komt omdat deze representatief zijn voor de meest resistente virussen. Als de werkzaamheid tegen deze virussen evenals de naleving van EN 14476 worden aangetoond, dan impliceert dit werkzaamheid tegen alle virussen (ongeacht of deze omhuld of niet omhuld zijn).

Voor diergeneeskundige tests wordt er gekozen voor het bovine enterovirus type 1 als meest resistente testvirus om de werkzaamheid tegen alle virussen te testen.

Een aantal van Tristel's desinfectiemiddelen op basis van chloordioxide voldoen ook aan de richtlijnen van de *Environmental Protection Agency* (EPA) in de Verenigde Staten. Ze beantwoorden immers aan de ASTM E1053-methode.



Figuur 4. Structuur van een omhuld virus - Het Influenzavirus

“ Bij de uitvoering van medische tests maken wetenschappers gebruik van knaagdiernorovirussen, het poliovirus type 1 en het adenovirus type 5. Dat komt omdat deze representatief zijn voor de meest resistente virussen. ”

“ ...Werkzaamheid tegen deze virussen betekent werkzaamheid tegen alle virussen. ”

Tristel's chloordioxideproducten zijn het voorwerp geweest van studies inzake infectiepreventie die zich toespitsten op het humaan papillomavirus (HPV) en SARS-CoV-2 (het virus verantwoordelijk voor de COVID-19 pandemie). Meyers, et al., (2020) tonen aan dat Tristels ClO_2 -gebaseerde producten, Tristel Duo en het Tristel Trio Wipes System, binnen een contacttijd van 30 seconden werkzaam zijn tegen het besmettelijke HPV type 16 en type 18 die op medische hulpmiddelen worden aangetroffen (endocavitaire ultrasoon probes en nasendoscopen).

In Jerry et al., (2020), werd Tristel Fuse for Surfaces (een product op basis van chloordioxide) gebruikt voor het decontamineren van de kamers van coronapatiënten, corona-afdelingen en verpleegposten. De studie toonde aan dat het gebruik van chloordioxide naast andere maatregelen doeltreffend de verspreiding van SARS-CoV-2 vanuit gecontamineerde patiëntenkamers en ziekenhuisafdelingen voorkomt.

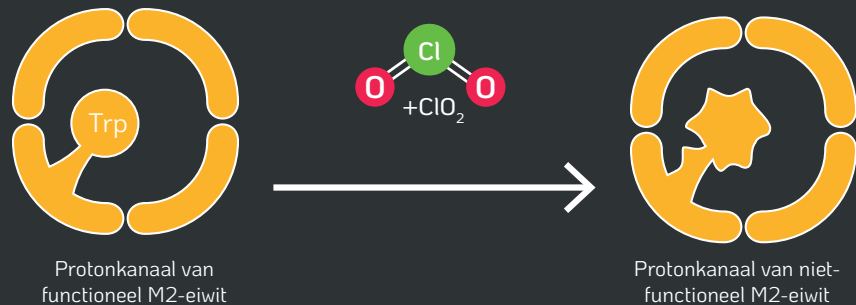
HET MECHANISME ACHTER VIRALE INACTIVERING DOOR CHLOORDIOXIDE

Chloordioxide reageert met virale componenten die uit eiwitten (ketens van aminozuurresiduen) en genetisch materiaal (nucleïnezuuren) bestaan. Deze reacties tasten de virussen aan, waardoor ze op verschillende manieren worden gedeactiveerd. Het wetenschappelijke onderzoek naar de manier waarop chloordioxide virussen aanvalt en hoe deze actieve molecule specifiek met virale moleculen interageert, blijft verder evolueren.

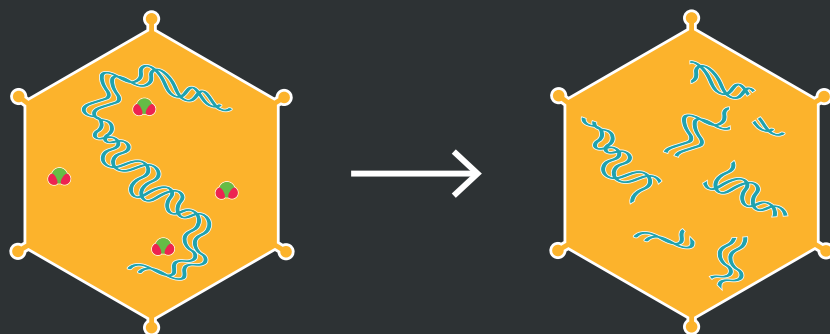
INWERKING OP VIRUSEIWITTEN

In tegenstelling tot andere oxiderende stoffen is ClO_2 erg selectief en reageert het extreem langzaam (of helemaal niet) met de meeste organische verbindingen (zoals levend weefsel). Deze staan ervoor bekend dat ze andere oxiderende chemische stoffen, zoals verdunde chloor, deactiveren. ClO_2 reageert echter specifiek met de aminozuren cysteine, methionine, tyrosine en tryptofaan, en wijzigt deze oxidatief (Noszticzius et al., 2013).

Ogata & Shibata (2008), toonden aan dat een behandeling met ClO_2 leidt tot de denaturering van hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA) bij het influenzavirus type A. Vier modelpeptiden (HA1, HA2, NA1 en NA2) werden behandeld met ClO_2 en werden vervolgens geanalyseerd door middel van HPLC-chromatografie met omgekeerde fase. In de chromatogrammen werden verschillende nieuwe peptidepieken gevonden die volledig verschilden van de oorspronkelijke peptidepieken. Dit gaf aan dat de oorspronkelijke peptiden covalent waren gewijzigd door een reactie met ClO_2 . De covalente modificatie van de aminozuurresiduen van tryptofaan en tyrosine door ClO_2 werd bevestigd met massaspectrometrie (MS). Dergelijke modificaties van aminozuurresiduen leiden kennelijk tot een denaturering van de HA- en NA-eiwitten van het influenzavirus type A. Deze eiwitten zijn essentieel voor het infectievermogen van het virus. Denaturering zorgt bijgevolg voor een deactivatie van het virus.



Figuur 5. Denaturering van een M2-eiwit (Matrix-2) door chloordioxide. Het M2-eiwit is een protonselectief viroporine(kanaal) in de virale omhulling van het influenzavirus type A. Een tryptofaan-residu (Trp) werkt als een poort om het protontransport mogelijk te maken.



Figuur 6. Chloordioxidemoleculen infiltreren een niet-omhuld virus (bv. een poliovirus) en reageren met het RNA. Beeld van Thurman en Gerba (1988), aangepast.

Het M2-eiwit van influenza A is een protonkanaal dat de pH-waarde in heel het virale membraan in evenwicht houdt wanneer het virus de cel binnendringt. Het eiwit zorgt ervoor dat het virale genoom in de gastheercel vrijkomt zodat het virus zich kan gaan vermenigvuldigen (Cady et al., 2009). Een tryptofaanresidu reikt tot in het M2-eiwitkanaal en fungeert als een poort voor protonen. Aangezien ClO_2 reageert met tryptofaan bij verschillende peptiden, is het waarschijnlijk dat het tryptofaanresidu in het M2-eiwitkanaal eveneens werd gewijzigd door de chloordioxide, waardoor de belangrijkste functies stilvallen (Figuur 5).

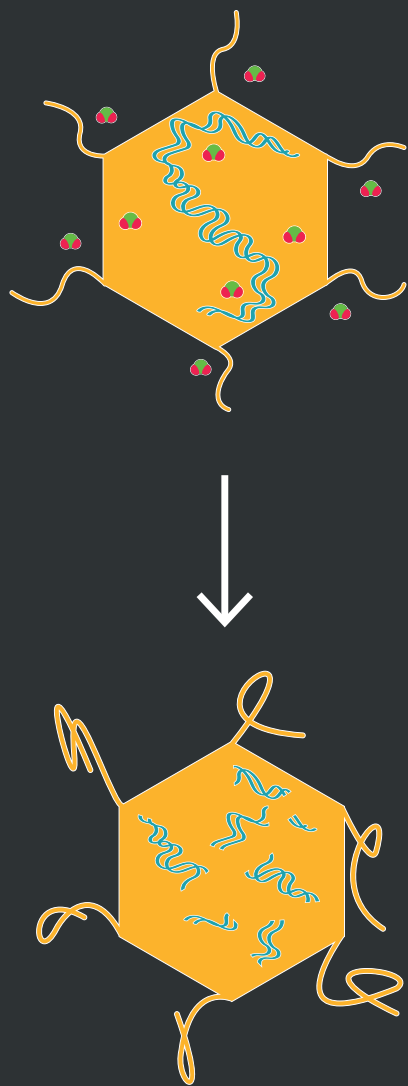
INWERKING OP HET VIRALE GENOOM

Alvarez en O'Brien (1982) concludeerden dat ClO_2 poliovirussen (deze zijn niet omhuld) deactiveert door zich te richten op het virale RNA. Hierdoor kan het virale genoom niet langer dienen als sjabloon voor virale replicatie. Sedimentatieanalyse van extracten van HeLa-cellen die geïnfecteerd werden met ClO_2 -gedeactiveerde virussen wees op een verminderde incorporatie van uridine (een van de vier basisbestanddelen van RNA) in nieuw viraal RNA. Bij deze studie was het kritische doel van ClO_2 het RNA van het virus. Hierdoor kon het virus zich niet langer vermenigvuldigen (Figuur 6).

Bij chloordioxide is ook vastgesteld dat het hepatitis A (HAV), een ander niet-omhuld virus, deactiveert door tegelijk de antigeniciteit te vernietigen en het virale genoom te beschadigen. Antigeniciteit is het vermogen van een antigeen (op de eiwitmantel van het HAV) om zich specifiek te binden aan een complementair eiwit, d.w.z. receptoren van gastheercellen.

Li e.a. (2004) maten deze antigeniciteit met behulp van ELISA (een enzymgekoppelde immuunadsorbent-techniek) en analyseerden het virale genoom met behulp van een sterk overlappende polymerasekettingreactie met omgekeerde transcriptie (RT-PCR). Daaruit bleek dat het 5'-niet-getranslateerde gebied beschadigd was door chloordioxide. De studie concludeerde dat chloordioxide zowel met het virale RNA als met het virale manteleiwit reageerde. Daardoor kon het HAV zich niet langer hechten aan gastheercellen, kon het deze niet langer penetreren, en kon het zich daar niet langer vermenigvuldigen (Figuur 7).

Het poliovirus en het HAV zijn beide niet-omhulde virussen, die het meest resistent zijn tegen desinfectantia. Is een stof werkzaam tegen deze virussen, dan betekent dit ook dat ze ook doeltreffend inwerkt op andere virussen met een vergelijkbare structuur en op de minder resistente omhulde virussen.



Figuur 7. Chloordioxidemoleculen die reageren met HAV-antigenen en RNA, wat resulteert in wijzigingen die de besmettelijkheid verminderen. Beeld van Thurman en Gerba (1988), aangepast.

CONCLUSIE

De virucide werking van chloordioxide werd bij de bovengenoemde studies en bij de viruswerkzaamheidstests volgens Europese en Amerikaanse normen duidelijk aangetoond. Dankzij deze inzichten kan de sector worden voorzien van desinfectantia die afgestemd zijn op de preventie van virale infecties.

Het werkzame bestanddeel van veel Tristel-producten is een eigen chloordioxideformulering. Deze producten maken deel uit van het Tristel-assortiment voor de decontaminatie van medische instrumenten, waaronder het Tristel Trio Wipes System en Tristel Duo. Tot dat aanbod behoort ook De Cache Collectie, die uit milieuvriendelijke oppervlakte-reinigers en desinfectantia bestaat, waaronder JET en FUSE.

Verschillende studies toonden aan dat chloordioxide reageert met virussen, afhankelijk van hun moleculaire samenstelling en structuur. Deze nuances zullen verder worden opgehelderd naarmate het onderzoek vordert.

REFERENTIES

Alvarez, M. E. and O'Brien, R. T. (1982) 'Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine', *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), pp. 1064–1071. doi: 10.1128/aem.44.5.1064-1071.1982.

Cady, S. D. *et al.* (2009) 'Structure and function of the influenza A M2 proton channel', *Biochemistry*, 48(31), pp. 7356–7364. doi: 10.1021/bi9008837.

Centers for Disease Control and Prevention (2008) 'Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008; Miscellaneous Inactivating Agents', *CDC website*, (May), pp. 9–13. doi: 1.

Fukayama, M. Y. *et al.* (1986) 'Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with model food compounds', *Environmental Health Perspectives*, Vol. 69, pp. 267–274. doi: 10.1289/ehp.8669267.

Jerry, J. *et al.* (2020) 'Do established infection prevention and control measures prevent spread of SARS-CoV-2 to the hospital environment beyond the patient room?', *Journal of Hospital Infection*. The Healthcare Infection Society. doi: 10.1016/j.jhin.2020.06.026.

Li, J. W. *et al.* (2004) 'Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide', *Water Research*, 38(6), pp. 1514–1519.

doi: 10.1016/j.watres.2003.12.021.

Meyers, C., Milici, J. and Robison, R. (2020) 'The ability of two chlorine dioxide chemistries to inactivate human papillomavirus-contaminated endocavitary ultrasound probes and nasendoscopes', *Journal of Medical Virology*, (November 2019). doi: 10.1002/jmv.25666.

Miura, T. and Shibata, T. (2010) 'Antiviral Effect of Chlorine Dioxide against Influenza Virus and Its Application for Infection Control', *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 2(2), pp. 71–78. doi: 10.2174/1876518101002020071.

Noszticzus, Z. *et al.* (2013) 'Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0079157.

Society, M. (2020) *Viruses*. Available at: <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/viruses.html> (Accessed: 25 June 2020).

Thurman, R. B. and Gerba, C. P. (1988) 'Molecular Mechanisms of Viral Inactivation by Water Disinfectants', *Advances in Applied Microbiology*, 33(C), pp. 75–105. doi: 10.1016/S0065-2164(08)70205-3.

TRICOLOGY



Gecreëerd door: Tristel Solutions Ltd

T +44 (0) 1638 721500 - **E** mail@tristel.com - **W** www.tristel.com

Tristel NV - **T** +32 3 889 26 40 - **E** belgium@tristel.com

Tristel B.V. - **T** 020 808 51 34 - **E** nederland@tristel.com

Voor informatie over de octrooien: <http://www.our-patents.info/tristel>

Copyright © Tristel Solutions TRS-046-1 - October 2020