

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230380

• 海洋军事医学 •

低温等离子对模拟舰艇密闭舱室中呼吸道病毒的消杀效果

陈松¹, 翟宇佳¹, 陈怡², 贾音³, 李奕⁴, 于旭东^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军特色医学中心, 上海 200433
2. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院感染科, 上海 200433
3. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院检验科, 上海 200433
4. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院疾病预防控制科, 上海 200433

[摘要] **目的** 验证低温等离子对模拟舰艇密闭舱室环境中呼吸道病毒的消杀效果。**方法** 从患者痰液中获取新型冠状病毒(SARS-CoV-2), 均匀涂布于染毒片上。使用3间独立的隔离病房(每间约20 m²)模拟舰艇密闭舱室环境, 病房内分别放置3组(含3个检测时间点, 每组9块)染毒片, 即试验组(低温等离子处理)、阳性对照组(含氯消毒剂处理)和空白对照组, 平行处理后逐点采样进行SARS-CoV-2抗原和qPCR检测。**结果** 消毒前所有染毒片表面SARS-CoV-2抗原检测均呈阳性。消毒后1、30和60 min时, 试验组3个样本抗原均转阴, 阳性对照组分别有0、2、3个样本抗原转阴, 空白对照组分别有0、0、1个样本抗原转阴。不同处理方法对病毒开放阅读框1ab(*ORF1ab*)和核衣壳蛋白(*N*)基因Ct值的影响差异有统计学意义(P 均 <0.01), 试验组和阳性对照组病毒*ORF1ab*和*N*基因Ct值均大于空白对照组(P 均 <0.05)。试验组Ct值较大且表现稳定, 离散度较其余两组小。**结论** 低温等离子可有效杀灭SARS-CoV-2, 其消杀的彻底性和均匀性优于含氯消毒剂, 适用于舰艇舱室空气和表面消毒。

[关键词] 密闭舱室; 低温等离子; 新型冠状病毒; 消杀; 评估方法

[引用本文] 陈松, 翟宇佳, 陈怡, 等. 低温等离子对模拟舰艇密闭舱室中呼吸道病毒的消杀效果[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(12): 1481-1484. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230380.

Disinfection effect of low-temperature plasma on respiratory viruses in simulated warship airtight cabins

CHEN Song¹, ZHAI Yujia¹, CHEN Yi², JIA Yin³, LI Yi⁴, YU Xudong^{1*}

1. Naval Medical Center, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
4. Department of Disease Control and Prevention, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To verify the disinfection effect of low-temperature plasma on respiratory viruses in simulated warship airtight cabins. **Methods** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles were harvested from the sputum of a patient and coated on several smooth plastic pieces to simulate surface contamination. Three separate isolation wards (each about 20 m²) were used to simulate warship airtight cabins. Plastic pieces (3 detection time points, 9 pieces for each group) were placed in the wards for the 3 groups, namely, experimental group (treated with low-temperature plasma), positive control group (treated with chlorine-containing disinfectants), and blank control group. Samples were taken at 3 time points and detected by SARS-CoV-2 antigen test and quantitative polymerase chain reaction. **Results** The SARS-CoV-2 antigens on the surface of all contaminated pieces were positive before disinfection. At 1, 30 and 60 min after disinfection, the antigens of 3 samples turned negative in the experimental group, 0, 2 and 3 samples turned negative in the positive control group, and 0, 0 and 1 sample turned negative in the blank control group. The effects of different treatment methods on the Ct values of open reading frame 1ab (*ORF1ab*) and nucleocapsid protein (*N*) genes were significant (both $P < 0.01$), and the Ct values of *ORF1ab* and *N* genes in the experimental group and positive control group were significantly higher than those in the blank control group (all $P < 0.05$). The Ct value was high and stable in the experimental group, and the variation was smaller than the

[收稿日期] 2023-07-06

[接受日期] 2023-11-02

[基金项目] 上海市军民融合专项资金(JMRH-2018-1040). Supported by Special Fund for Shanghai Military-Civilian Integration (JMRH-2018-1040).

[作者简介] 陈松, 硕士, 助理研究员. E-mail: chensong529237@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81883815, E-mail: yuxudongtoy@263.net

other 2 groups. **Conclusion** Low-temperature plasma can effectively inactivate SARS-CoV-2, and its thoroughness and uniformity are prior to chlorine-containing disinfectants. It is suitable for disinfection of the air and surface of the ship cabin.

[**Key words**] airtight cabin; low-temperature plasma; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; disinfection; evaluation method

[**Citation**] CHEN S, ZHAI Y, CHEN Y, et al. Disinfection effect of low-temperature plasma on respiratory viruses in simulated warship airtight cabins[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(12): 1481-1484. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230380.

近年来,呼吸道病毒陆续造成了大规模全球性流行的突发传染病^[1]。舰艇生活环境相对封闭、人员分布密集,防疫压力和难度较大。为积极应对呼吸道病毒感染的威胁,保障航海安全,于旭东研究员课题组研制了低温等离子动态空气消毒机。本研究以新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)为模式种,设计简易消杀评估方案,验证低温等离子清除模拟密闭舱室中呼吸道病毒气溶胶的有效性,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 试剂与器材 ZDBL-III型低温等离子动态空气消毒机[190 mm×190 mm×50 mm,消毒产品许可证号为沪卫消字证(2020)0030号]由于旭东研究员课题组研制(图1)。染毒片由塑料薄片改制,规格为50 mm×50 mm,表面平整光滑,预先用75%乙醇擦拭消毒并晾干,用于模拟表面染毒。三氯异氰尿酸消毒片[有效氯含量为(500±50) mg/片]由杭州朗索医用消毒剂有限公司生产,配制成1 000 mg/L含氯消毒剂后使用。SARS-CoV-2抗原检测试剂购自武汉明德生物科技股份有限公司。SARS-CoV-2核酸抽提试剂、qPCR检测试剂和EX9600型核酸提取仪购自上海之江生物科技股份有限公司。LightCycler 480 II型荧光qPCR仪为瑞士Roche公司产品。



图1 ZDBL-III型低温等离子动态空气消毒机

1.2 病毒采集 患者为老年女性,因“发热伴咳嗽2 d”入院,诊断为普通型新型冠状病毒肺炎。次日胸部CT示双肺下叶斑片模糊影,呈磨玻璃样改变。采样当日鼻咽拭子SARS-CoV-2核酸检测阳性,其中开放阅读框1ab(open reading frame 1ab, ORF1ab)基因Ct值为24,核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N)基因Ct值为22。采集前向患者告知本研究所需体液材料均为无创方式取得的鼻咽拭子和痰液样本,仅用于现场消杀试验,患者对研究方案知情同意。提取样本时,患者发病时间≤3 d,在样本采集前30 min嘱患者禁止饮食饮水。先进行鼻咽拭子采样,再请患者自主咳痰采集痰液样本。同时进行痰和鼻咽拭子抗原检测,结果显示该患者的鼻拭子样本呈阴性,而痰液样本呈阳性,故用痰液样本制作染毒片。

1.3 染毒片涂布 用预先润湿的拭子蘸取痰液,均匀涂布于染毒片上,随机分为3组(试验组、空白对照组和阳性对照组),在3间独立的隔离病房(每间约20 m²)内分别放置3组(含3个检测时间点,每组9块)的染毒片,避免在同一空间内互相干扰,用以模拟舰艇密闭舱室环境中的病毒污染。

1.4 消杀处理 各组均进行平行处理,设置3个检测时间点,分别为消毒后1、30和60 min。试验组安置低温等离子动态空气消毒机,在试验前先开机2 h进行空间低温等离子预充盈,试验开始时在距低温等离子动态空气消毒机的低温等离子出口水平10 cm处放置染毒片进行消毒。空白对照组安置不产生低温等离子体的模拟装置,染毒片完全按照试验组布局,仅静置而不做任何消毒处理。阳性对照组按照试验组布局好染毒片后,在染毒片水平间距10 cm处喷洒含氯消毒剂1次。每组及每个时间点平行设置3个染毒片。

1.5 采样检测 用0.9%氯化钠注射液润湿拭子,然后在上述时间点分别进行表面擦拭采样,按说明书要求进行SARS-CoV-2抗原检测,同时按试剂说

说明书进行qPCR检测。

1.6 统计学处理 应用SPSS 22.0软件进行统计分析。计数资料以频次表示；计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用双因素方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 抗原检测法评估消杀效果 消毒前所有染毒片表面SARS-CoV-2抗原检测均呈阳性。消毒后各组样本的抗原检测结果显示，试验组消毒后1、30和60 min时3个样本抗原均为阴性；阳性对照组消毒后1 min时3个样本抗原均为阳性，30 min时有2个样本抗原转阴，60 min时3个样本抗原均转阴；空白对照组在静置1 min和30 min时3个样本均为阳性，60 min时仅有1个样本抗原转阴。

2.2 qPCR法评估消杀效果 消毒前所有染毒片

表面均检出ORF1ab和N基因阳性。消毒后各组样本的qPCR检测结果见图2。在为期60 min的消杀过程中，试验组的ORF1ab和N基因Ct值较大、表现稳定，并且离散度较低，在3个时间点的标准差范围为0.58~2.00；阳性对照组和空白对照组的ORF1ab和N基因Ct值较小、波动较大，呈现出“V”形变化趋势，其中N基因Ct值在1 min和30 min时的差异有统计学意义(P 均 <0.05)，并且离散度较大，在3个时间点的标准差范围分别为1.53~6.43和0.58~5.13，随作用时间延长呈现逐渐增大趋势。不同处理方法对ORF1ab和N基因Ct值的影响差异有统计学意义(P 均 <0.01)，试验组和阳性对照组在3个时间点的Ct值均高于空白对照组(P 均 <0.05)，试验组与阳性对照组的Ct值差异无统计学意义($P>0.05$)。

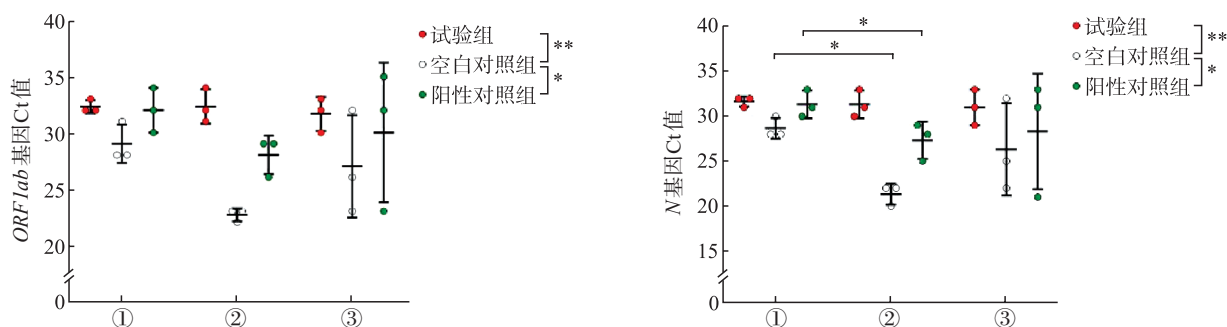


图2 各处理组新型冠状病毒的qPCR检测结果

①、②、③分别为消毒或静置1、30、60 min时。* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。n=3, $\bar{x} \pm s$ 。qPCR:定量聚合酶链反应;ORF1ab:开放阅读框1ab;N:核衣壳蛋白。

3 讨论

人群对SARS-CoV-2普遍易感，该病毒传染性极强，可通过上呼吸道侵入人体，引起呼吸道症状、消化道症状、全身症状等一系列表现^[2-3]。SARS-CoV-2作为具有高传染性和高致病性的呼吸道病毒模式种，对于消杀试验具有较高的普适性和代表性；同时其抗原检测方法具有快速方便等特点^[4]，可进行样本初筛，只有当痰液样本抗原检测结果呈阳性时，才意味着能够获取足量有活性的病毒。

低温等离子发生装置消毒原理较为独特，无须额外添加消毒因子，仅利用空气在高压交流电场中阻挡放电便可产生大量低温非平衡态等离子体，主要包括活性氧（以臭氧为主）、高能电子和其他自由基，这些消毒因子与病原微生物（细菌和病毒）碰撞瞬间产生强烈氧化和分子蚀刻作用，破坏

其膜结构组分，从而诱导快速灭活效应^[5]。根据前期抗病毒活性实验（数据未发表），低温等离子作用2 h即可对20 m²空间内的SARS-CoV-2近缘株——广西穿山甲冠状病毒（GX/P2V/2017）^[6]产生99.99%的杀灭效率。然而有研究表明不同种类冠状病毒的环境稳定性存在较大差异^[7]，因此有必要开展现场试验，对模拟舰艇密闭舱室环境中低温等离子体的消杀效能进行再验证。基于低温等离子发生装置的消毒原理，推测只有当空间中存在足够浓度的等离子体时，才能充分地与病毒颗粒发生碰撞，从而取得满意的消杀效果。因此本研究的试验组房间提前2 h开启设备，进行等离子预充盈，待正式试验时再予以持续补充，以确保充分发挥病毒杀灭效应。

SARS-CoV-2抗原检测原理是特异性抗体能够识别并结合N蛋白的天然立体构象表位，即呈现阳性条带^[8]；当N蛋白变性而丧失其构象时即失去

了结合能力,遂无法检出。本研究结果表明试验组消毒后 1 min 即观察到所有抗原检测结果呈阴性,而空白对照组则均呈阳性,提示预充盈的等离子足以对塑料表面沾染的 SARS-CoV-2 产生迅速且强烈的蛋白质变性作用,使之丧失与检测抗体结合的能力。使用含氯消毒剂作为阳性对照,抗原检测结果也印证了其消杀的有效性,在作用后 30 min 即能观察到 2 个样本抗原转阴,但 1 个样本仍能检出抗原阳性。这可能是由于喷洒消毒难以使消毒剂全面、均匀地作用于病毒,残存消杀盲点。此外,空白对照组静置 60 min 时也有 1 个样本转阴,这可能是由于 SARS-CoV-2 在室温环境下的生存能力不强,随着时间的延长其 N 蛋白活性逐渐丧失。

qPCR 检测结果能够与抗原结果互相印证。空白对照组染毒样本 *ORF1ab* 和 *N* 基因 Ct 值较低,提示其病毒载量较高;试验组染毒样本 *ORF1ab* 和 *N* 基因 Ct 值较高且保持平稳,提示其病毒载量始终较低,这说明在消杀机制上,低温等离子体能够同时使 SARS-CoV-2 发生蛋白质变性和 RNA 降解。此外,试验组数据的离散度较小,说明低温等离子消杀法的均匀性和彻底性较好,基本不会出现消杀盲点。阳性对照组染毒样本 *ORF1ab* 和 *N* 基因 Ct 值离散度随消毒时间的延长逐渐变大,进一步印证了喷洒消毒存在漏洞,难以消杀彻底,始终存在传染隐患。

值得注意的是,空白对照组和阳性对照组染毒样本 *ORF1ab* 和 *N* 基因 Ct 值均呈“V”形变化趋势,在作用 30 min 时 Ct 值进入低谷,意味着此时病毒 RNA 的检出量增加。鉴于 N 蛋白作为结构蛋白与病毒 RNA 紧密结合,对病毒 RNA 的稳定与复制均有关键作用^[9],因而推测在自发灭活或化学消毒剂诱导的病毒结构破坏过程中,N 蛋白与 RNA 链解离,裸露的 RNA 链有利于反转录效率提升,使得模板 cDNA 增加,故 RNA 检出量增加。这也从侧面说明含氯消毒剂对 SARS-CoV-2 的消杀机制是一个序贯事件,即首先使蛋白质变性,然后才是 RNA 破坏。SARS-CoV-2 的自发灭活过程似乎也遵循这一规律。

生物气溶胶采样是开展空气消杀现场试验的关键环节,由于试验条件难以均一化,因此采样误差对结果的判断影响甚大^[10],在实践中因条件制约不易准确评估低温等离子体的消杀效果。本研究开发了一种简便易行的替代方法,将空气采样转化为表面染毒方式,通过作用距离和时间 2 个参数来确认低

温等离子动态空气消毒机的应用条件,可有效控制实验误差,利用通用的抗原和核酸检测方法来定量评价其消杀效果,初步取得了可靠的结论。今后将进一步开展低温等离子对不同呼吸道病毒的消杀作用参数研究,以确认低温等离子动态空气消毒机的有效消杀距离和最短消杀时间。

综上所述,低温等离子可以有效杀灭 SARS-CoV-2,在模拟舰艇密闭舱室消毒的现场试验中表现优异。低温等离子消杀的彻底性和均匀性优于含氯消毒剂喷洒方法,适用于舰艇密闭舱室中的空气和表面消毒,为航海期间生物安全防御提供有力保障。

[参考文献]

- [1] ZHANG X, ZHANG W, CHEN S. Shanghai's life-saving efforts against the current omicron wave of the COVID-19 pandemic[J]. Lancet, 2022, 399(10340): 2011-2012. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00838-8.
- [2] 吕莹,袁伟,施冬玲,等. 2019 新型冠状病毒奥密克戎变异株感染者的临床特征分析[J]. 中华传染病杂志, 2022, 40(5): 257-263.
- [3] GU H, KRISHNAN P, NG D Y M, et al. Probable transmission of SARS-CoV-2 omicron variant in quarantine hotel, Hong Kong, China, November 2021[J]. Emerg Infect Dis, 2022, 28(2): 460-462. DOI: 10.3201/eid2802.212422.
- [4] 国家卫生健康委员会. 新冠病毒抗原检测应用方案(试行)[J]. 全科医学临床与教育, 2022, 20(4): 293-294. DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.004.002.
- [5] SABANCI A U, ERKAN ALKAN P, MUJDE C, et al. Nanobubble ozone stored in hyaluronic acid decorated liposomes: antibacterial, anti-SARS-CoV-2 effect and biocompatibility tests[J]. Int J Nanomed, 2022, 17: 351-379. DOI: 10.2147/IJN.S328090.
- [6] LAM T T Y, JIA N, ZHANG Y W, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins[J]. Nature, 2020, 583(7815): 282-285. DOI: 10.1038/s41586-020-2169-0.
- [7] VAN DOREMALEN N, BUSHMAKER T, MORRIS D H, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1[J]. N Engl J Med, 2020, 382(16): 1564-1567. DOI: 10.1056/NEJMc2004973.
- [8] 陈晨,胡劲超,曹姗姗,等. 新型冠状病毒抗原快速检测研发现状及展望[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6): 119-128. DOI: 10.13523/j.cb.2105056.
- [9] KIM D, LEE J Y, YANG J S, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome[J]. Cell, 2020, 181(4): 914-921.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
- [10] 张惠力,甄世祺,周明浩,等. 生物气溶胶采样技术研究进展[J]. 环境监测管理与技术, 2011, 23(4): 18-21. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2009.2011.04.005.

[本文编辑] 孙岩