



14 października 2009 r

Do: Joseph Urso – Aerus - Electrolux / ActivTek Environmental

Od: James Marsden, Ph.D.

Temat: Inaktywacja wirusa grypy A H1N1 przy użyciu promieniowej jonizacji katalitycznej (RCI™)

Tymczasowy raport postępu

Jest to okresowe sprawozdanie z postępów w ocenie systemu RCI™ służącego do dezaktywacji grypy H1N1 na powierzchniach środowiskowych. Planowane są dalsze badania w celu pełnej oceny wpływu reaktywnych form tlenu (ROS) wytwarzanych przez system RCI™ na grypę H1N1 w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych.

Zalecam, aby Aerus Corporation spotkała się z przedstawicielami FDA w celu uzyskania wskazówek dotyczących przyszłych badań i najlepszych sposobów pozycjonowania technologii RCI dla konsumentów.

Tło

Nowa grypa A (H1N1) to nowy wirus grypy pochodzenia świńskiego, który po raz pierwszy spowodował chorobę w Meksyku i Stanach Zjednoczonych w marcu i kwietniu 2009 roku. H1N1 jest ostrym i wysoce zaraźliwym wirusem oddechowym podobnym do grypy sezonowej, ale dotyka młodszej grupy wiekowej. Mniejsza jest też odporność na ten nowy szczep grypy niż na grypę sezonową. Grypa H1N1 u ludzi może mieć różny stopień nasilenia od łagodnego do ciężkiego. Uważa się, że wirus H1N1 rozprzestrzenił się w ten sam sposób, w jaki rozprzestrzeniła się grypa sezonowa: od osoby do osoby, poprzez kropelki wytwarzane przez kaszel i kichanie, lub dotykając zanieczyszczonych powierzchni, a następnie dotykając ust, nosa lub oczu. Dowiedziono, że nowe zakażenie H1N1 wywołuje szeroki zakres objawów grypopodobnych, w tym gorączkę, kaszel, ból gardła, bóle ciała, ból głowy, dreszcze i zmęczenie. Ponadto wiele osób zgłaszało również nudności, wymioty i/lub biegunkę. Wirus może pozostać przy życiu na powierzchniach i rękach i ciele przez co najmniej dwie godziny.

Pierwotny pacjent H1N1 w Stanach Zjednoczonych został potwierdzony testami laboratoryjnymi w CDC 15 kwietnia 2009 r. Drugi pacjent został potwierdzony 17 kwietnia 2009 r. Szybko ustalono, że wirus rozprzestrzenił się z osoby na osobę. 22 kwietnia CDC uruchomiło Centrum Alarmowe, aby lepiej skoordynować ochronę zdrowia publicznego. 26 kwietnia 2009 r. rząd Stanów Zjednoczonych ogłosił alarm dla zdrowia publicznego i aktywnie i agresywnie wdraża krajowy plan reagowania na pandemię.

Do 19 czerwca 2009 r. wszystkie 50 stanów w Stanach Zjednoczonych, Dystrykt Kolumbii, Portoryko i Wyspy Dziewicze Stanów Zjednoczonych zgłosiły nowe zakażenie H1N1. Podczas gdy ogólnokrajowe systemy nadzoru grypy amerykańskiej wskazują, że ogólna aktywność grypy w tym kraju zmniejsza się w tym czasie, nowe ogniska H1N1 pojawiają się w niektórych częściach USA, w niektórych przypadkach z intensywną aktywnością.

Wstępny eksperyment - Inaktywacja wirusa grypy A H1N1 na zaszczepionych powierzchniach ze stali nierdzewnej

W tym badaniu oceniano grypę A H1N1 (ATCC # VR-333). Procedury utrzymania kultury wirusa i wyliczenia wirusa przed i po leczeniu uzyskano od dr Rick Falkenberg - FSPT. Hodowlę wirusa utrzymywano na pożywce wzrostowej ATCC i minimalnej pożywce podstawowej (ATCC, Manassas, VA., USA) z 2 μM Lglutaminy i BSS Earle'a, tak aby zawierały 1,5 g/l wodorowęglanu sodu, 0,1 μM nieistotnych aminokwasów, i 1,0 μM pirogronianu sodu, 90%; płodową surowicę bydlęcą, 10% i hodowaną w Trypticase Soy Agar z dodatkiem; wodorowęglan sodu, nieistotne aminokwasy oraz połączenie pirogronianu sodu i płodowej surowicy bydlęcej, w warunkach wzrostu aerobowego w 37,0 °C i grypie A w 33-35 °C. 1. Komórki z obu powyższych (około 1×10^7 CFU/ml) z 24-godzinnej hodowli statycznej inkubowanej w 37,0 °C i grypy A w 33-35 °C użyto do zaszczepienia różnych płytek ze stali nierdzewnej o wymiarach 5 cm x 3 cm. Zawiesiny inokulum wyliczono przez powlekanie

powierzchniowe w duplikatach próbek na TSA po seryjnym rozcieńczeniu w 0,1% roztworze peptonu. Płytki inkubowano przez 24 godziny w 37,0 °C.

Kroplę 100 µl z początkowej zawiesiny inokulum każdej z bakterii/wirusów użyto do zaszczepienia powierzchni zewnętrznej (6,3 cm x 1,8 cm) na płytkach ze stali nierdzewnej nr 8. Dało to końcowy poziom inokulum około 7,0-log CFU/5 g próbki. Zaszczepione próbki suszono powietrzem przez 1 godzinę w 22,0 °C przed zapoczątkowaniem leczenia RCITM. 1-godzinne suszenie umożliwia zaszczepionym komórkom przyłączenie się do powierzchniowego gospodarza i zminimalizowanie wzrostu zaszczepionych komórek podczas suszenia. Do każdego czasu próbkowania użyto czterech płytek ze stali nierdzewnej.

Komorę biokonserwacji wyposażono w komórkę RCITM (uzyskaną z Aerus Corporation) i pozostawiono do zrównoważenia przez okres dwóch godzin przed umieszczeniem 12 inokulowanych płytek wewnątrz komory. Efekt leczenia RCITM mierzono przy 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 godzinach. Badanie kontrolne przeprowadzono w tej samej komorze bez obecności komórki RCI. Temperaturę, wilgotność względną i otaczające poziomy ozonu i poziomy nadtlenu wodoru monitorowano w komorze.

Po obróbce, każdą z 5 cm x 3 cm płytek przeniesiono do 400 ml stomachera (Fisher Scientific Inc., USA) w połączeniu z 50 ml jałowego roztworu 0,1% peptonu, a następnie zmieszano stomacherem AES Easy Mix. (AES Laboratories, Princeton, NJ., USA) przez 2 minuty przy normalnej prędkości. Płyn płuczący rozcieńczano seryjnie, a następnie powlecano powierzchniowo w celu wyliczenia. Zastosowano metodę wirowania w celu odzyskania niskiej populacji uszkodzonych przez ROS bakterii i wirusów. Metoda wirowania (Mossel i in. 1991) została zmodyfikowana i użyta do zatężenia populacji bakterii i wirusów w płynie do przemywania tak, że w wyniku pokrywania powierzchni można policzyć mniej niż 250 CFU/ml bakterii.

Wyniki i omówienie

Tabela 1. Średnie wartości odzysku (Log CFU/cm²) z zaszczepionych płytek ze stali nierdzewnej H1N1 wirusa grypy leczonych przy użyciu komórkowej RCI™ przez okres 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 godzin

| Próbka | Grypa A H1N1 Leczona komórką RCI | Próbka kontrolna Grypy A H1N1 |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Początek – Czas 0 | 6.8 | 6.9 |
| 1 godzina | 4.1 | 6.7 |
| 2 godziny | 3.4 | 6.4 |
| 4 godziny | 1.2 | 6.1 |
| 6 godzin | BDL | 5.5 |
| 8 godzin | BDL | 5.7 |
| 12 godzin | BDL | 5.7 |
| 24 godziny | BDL | 5.7 |

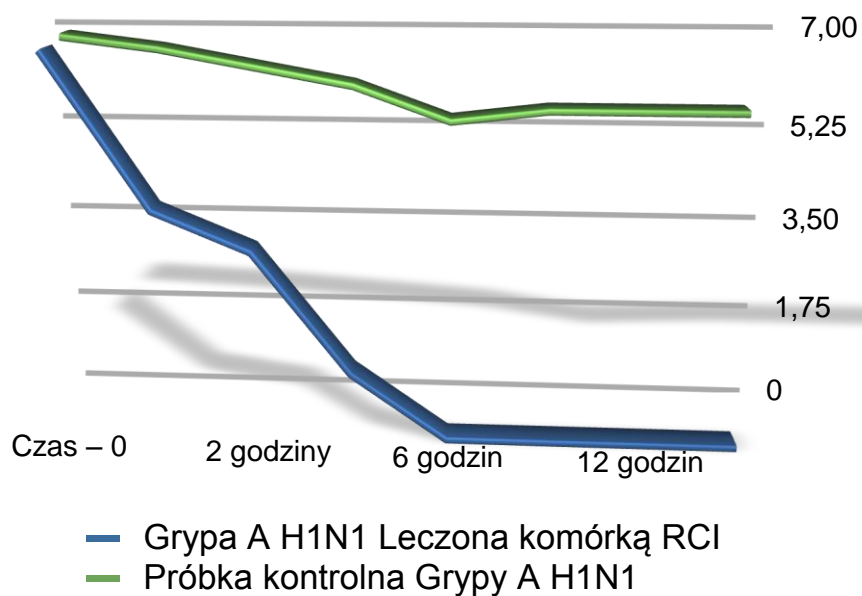


Tabela 1 podsumowuje wyniki wstępnego badania. W badaniu wykazano skuteczność reaktywnych form tlenu wytwarzanych przez komórkę RCITM w inaktywacji grypy A - H1N1. Po 6 godzinach obróbki poziomy wirusa H1N1 na zaszczipionych płytkach ze stali nierdzewnej były poniżej granicy wykrywalności. Nie zaobserwowano poprawy po 8, 12 lub 24 godzinach. Poziom ozonu w komorze wahał się od 0,02 do 0,04 PPM. Poziomy odparowanego nadtlenu wodoru wahały się od 0,06 do 0,09 PPM. Wilgotność względna wahała się od 45 - 57%, a temperatura od 70 do 73 stopni F.

W oparciu o wyniki tego wstępnego badania okazało się, że reaktywne formy tlenu wytwarzane przez komórkę RCI™ są skuteczne w dezaktywacji wirusa grypy A H1N1 na zaszczipionych płytkach stali nierdzewnej w warunkach tych testów. Dodatkowe testy są zalecane w celu oceny innych szczepów wirusa i innych powierzchni środowiskowych oraz parametrów aplikacji.