

INAKTYWACJA PTASIEJ GRYPY ZA POMOCĄ RCI

Wprowadzenie

Wirus grypy, członek rodziny wirusowej Orthomyxoviridae, jest scharakteryzowany jako wyizolowany wirus jednoniciowy o ujemnym sensie RNA (6), który może powodować coroczne epidemie endemiczne i bardziej poważne ogólnoswiatowe epidemie pandemiczne. Grypa A często zakaża izolaty ludzkie, świńskie, koniowate i ptasie. W przypadku wybuchu pandemii, wysoce zjadliwa grypa ptaków (H5N1) jest obecnie największym zagrożeniem ze względu na obecny stan epidemii w Azji, Europie i Afryce oraz ciągle zagrożenie rozprzestrzenieniem pandemii. Reasortacja informacji genomowych wirusa grypy może spowodować zwiększenie liczby patogennych i zakaźnych izolatów podczas trwających wybuchów epidemii, co może doprowadzić do niszczącej zaraźliwości między człowiekiem, a człowiekiem. Wirus grypy zazwyczaj rozprzestrzenia się drogą kropelkową, duże kropelki lub kontakt z zakaźnymi wydzielinami lub fomitami (4).

Szybkie zapobieganie epidemii jest ważne, aby zapobiec dalszemu rozprzestrzenianiu się choroby i zminimalizować możliwość reorganizacji. Okazało się, że grypa potrafi przetrwać na nieporowatych powierzchniach przez okres do 48 godzin, a na powierzchniach materiałowych, takich jak tkanina, papier lub tkanka, przez okres do 12 godzin po odłożeniu na poziomie około 10^5 TCID₅₀/ml (1). Oprócz sanitacji powierzchni i schematów dezynfekcji, inaktywacja powietrzna wirusa grypy ma również kluczowe znaczenie dla rozwiązania dominujących sposobów przenoszenia, takich jak aerozol i duża kropla (4). Zanieczyszczenie środowiska aerozolowanymi kroplami zawierającymi ten patogen może służyć jako źródło infekcji i musi być kontrolowane przez skuteczne protokoły sanitarne i dezynfekujące. Zminimalizowanie stopnia zanieczyszczenia środowiska wysoce skutecznymi środkami odkażającymi pomogłoby w ogólnych ograniczeniach wybuchu epidemii.

Celem tego badania jest walidacja całkowitej inaktywacji wirusów grypy A przy użyciu grypy ptasiej o niskiej zjadliwości (H5N8) jako zastępczego wirusa wysoce zjadliwej grypy ptasiej (H5N1) po ekspozycji na Promieniotwórczą Komórkę Jonizacyjną™ (RCI-Cell™). System RCI-Cell™ jest zaawansowanym narzędziem do utleniania, które łączy inaktywację UV w obecności rodników hydroksylowych, dzięki czemu zachodzi synergia między dwiema wysoce skutecznymi technologiami inaktywacji. Skuteczność zostanie określona dla wysuszonego inokulum na powierzchniach stałych, w inokulum namnażanym w kulturze komórkowej i nebulizowana w kontrolowanej komorze. Skuteczność będzie określona przez zmniejszoną lub całkowitą utratę infekcyjności w systemie hodowli komórkowej dla traktowanych próbek w porównaniu z nietraktowanymi dodatnimi próbkami kontrolnymi.

MATERIAŁY I METODY

Wirus i komórki. Nisko zjadliwa grypa ptasia H5N8 (H5N8, udostępniona przez Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) była rozmnażana w 10-dniowym zarodkowym jajku kurzym (Kansas State University Department of Poultry Science, Manhattan, KS) do około $107 \log_{10}$ TCID₅₀ (jak określono w Madin Darby Canine Kidney, komórki MDCK). Komórki utrzymywano w Minimal Essential Medium z solami Earle'a i L-glutaminą (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) i 2,2 g/l wodorowęglanu sodu (Fisher Scientific, Hampton, NH) zbiorczo określane jako MEM zawierające 10% płodowej surowicy bydłowej (FBS Hyclone Laboratories, Logan, UT) suplementowane antybiotykami [2,5 mg/L amfoterycyny B; 0,67 g/l streptomycyny; i 0,3 g/l penicyliny G (wszystkie z Fisher Scientific). Nośniki infekcyjne wytworzono przez dodanie MEM z dodatkiem trypsyny poddanej obróbce 0,1% TPCK (Fisher Scientific) i suplementowanej antybiotykami (2,5 mg/L amfoterycyny B, 0,67 g/L streptomycyny i 0,3 g/l penicyliny G).

Inaktywacja H5N8. Płytki ze stali nierdzewnej typu 302 (McMasterCarr, Atlanta, GA) (2 x 10 cm², grubość 0,8 mm) sterylizowano w autoklawie przez 15 minut w temperaturze 121 °C. W szafce bezpieczeństwa biologicznego II dodano 100 µl H5N8 propagowanego przez komórki jajowe. Przetestowano płytki i ułożono, aby pokryć całą powierzchnię za pomocą końcówki pipety i pozostawiono do całkowitego wyschnięcia na około 10-15 minut. Następnie zaszczerpione płytki umieszczono w sterylnym pojemniku transportowym i przetransportowano do komory testowej. Testowe płytki następnie przymocowano do klipsów w komorze testowej, tak aby wszystkie strony płytki były wystawione na działanie RCI-Cell™. Jedna płytka została usunięta przed rozpoczęciem leczenia RCI-Cell™ do zastosowania jako początkowa próbka kontrolna. Następnie włączono urządzenie RCI-Cell™ i pobrano próbki w różnych odstępach czasu (2, 4, 8, 12, 24 godziny) po usunięciu próbnej płytki i przygotowanie jej do odzyskiwania wirusa, jak opisano poniżej.

Odzyskiwanie wirusa. Wirus H5N8 odzyskano z powierzchni stali nierdzewnej przez dodanie testowej płytki do sterylnej 50 ml stożkowej fiolki (Fisher Scientific) zawierającej 5 ml podłoża zakaźnego. Następnie próbki wirowano przez 1 min. Miareczkowanie rozcieńczeniem punktu końcowego przeprowadzono w komórkach MDCK przez dodanie 220 µl z pożywki infekcyjnej o pojemności 5 ml zawierającej dowolny zawieszony wirus do pierwszego dołka rozcieńczenia w co najmniej 6 dołkach 96-dołkowej płytki do mikromiareczkowania zawierającej konfluentne komórki MDCK. Następnie przygotowano seryjne rozcieńczenia 1:10 przez dodanie 20 µl z pierwszego dołka do kolejnych 6 dołków, z których każdy zawierał 180 µl podłoża zakaźnego. Końcowy dołek zawierał jedynie 200 µl medium infekcyjności służącego jako negatywna kontrola komórkowa. Płytki inkubowano w 37 °C, 5% CO₂ przez 48 godzin. Efekt cytopatyczny (CPE) został określony dla każdego dołka, a liczbę wirusów podano jako TCID₅₀/ml, jak obliczono przez Reed i Muench (3).

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (rRT-PCR).

Wirusowe RNA odzyskano przy użyciu zestawu QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Ilościową detekcję wyekstrahowanego RNA wirusa grypy przeprowadzono za pomocą rRT-PCR przy użyciu fluorescencyjnie znakowanej sondy TaqMan. Primer i sekwencje sond rRT-PCR zostały dostarczone przez Molecular Genetics Influenza Branch, Centers for Disease Control and Prevention w Atlancie, GA. Próg wykrywania skutecznie wykrywający RNA wirusa grypy był sygnalizowany fluorescencyjnie $FAM \geq 3$ przy użyciu SmartCycler.

WYNIKI

Średnia ilość H5N8 odzyskanego z płytek ze stali nierdzewnej we wszystkich doświadczeniach wyniosła 5,35 log₁₀ TCID₅₀/ml. Po leczeniu RCI-Cell™, średnia log redukcji wirusa H5N8 wynosiła 1,85, 2,79, 4,16, 5,35 i 5,35 log₁₀ TCID₅₀/ml po 2, 4, 8, 12 i 24-godzinnej obróbce (Figura 1) w celu odzyskania zakaźnego wirusa.

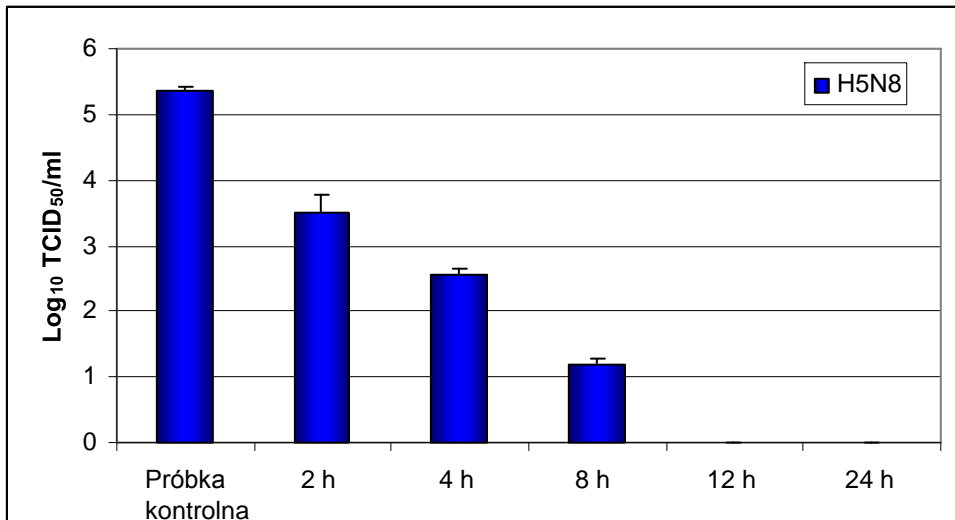


Figura 1: Odzyskanie H5N8 po leczeniu za pomocą RCI-Cell™ opartego na TCID₅₀/ml w komórkach MDCK.

Średnia ilość wirusowego RNA H5N8 odzyskanego z płytek ze stali nierdzewnej we wszystkich doświadczeniach wynosiła 4,00 log₁₀ w oparciu o ilościowy RT-PCR dostępny dla wirusów grypy A. Po leczeniu RCI-Cell™, średnia log redukcji wirusa H5N8 w oparciu o ilość odzyskanego RNA wahała się od 0,23 do 0,54 log₁₀ po wszystkich czasach ekspozycji (2, 4, 8, 12 i 24 godziny) wskazując, że mechanizm działania na rzecz utraty infekcyjności był bardziej prawdopodobny w wyniku przzerwania otoczki lipidowej lub białek strukturalnych niż w przypadku degradacji wirusowego kwasu nukleinowego (Figura 2).

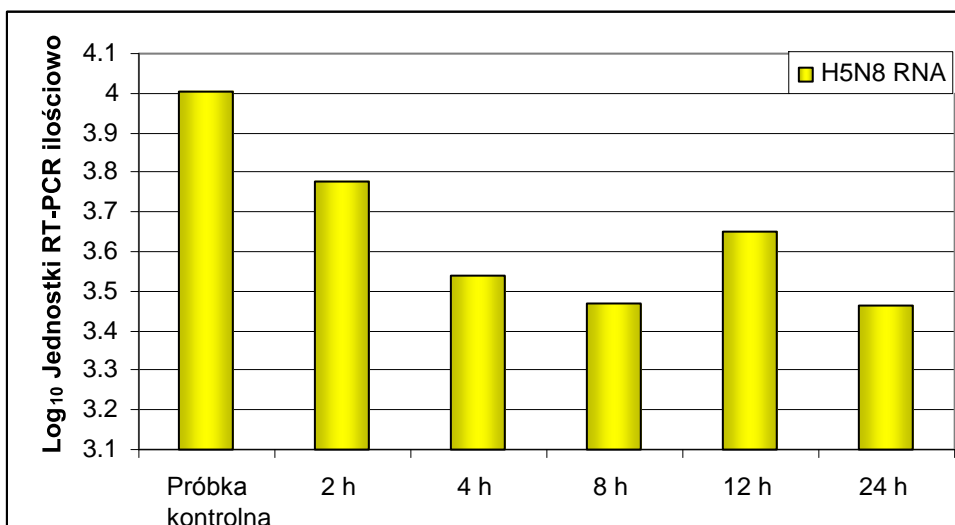


Figura 2: Odzyskanie RNA po traktowaniu H5N8 za pomocą RCI-Cell™ na podstawie ilościowego RT-PCR.

OMÓWIENIE

Aby lepiej zrozumieć inaktywację wirusa grypy przy użyciu RCI-Cell™, oceniano skuteczność przy użyciu izolatu o niskiej chorobotwórczej ptasiej grypie, H5N8 zaszczepionego na powierzchniach ze stali nierdzewnej. Skuteczność inaktywacji określono zgodnie z aktualnymi wytycznymi EPA dotyczącymi określania dezynfekcji wirusowej (2), która umożliwia odzysk obrabianego wirusa jako rozcieńczenia punktu końcowego, w tym test odzysku TCID₅₀ zakaźnego wirusa. Oprócz odzyskiwania zakaźnego wirusa, chcieliśmy ustalić, czy wystąpiło jakiegokolwiek zakłócenie wirusowego RNA, stosując ilościowy test RT-PCR specyficzny dla wirusów grypy A w naszych doświadczeniach.

W oparciu o aktualne wytyczne EPA mające na celu obniżenie wyjściowego miana wirusa o > 4,0 log₁₀ (2), leczenie RCI-Cell™ przez 8 godzin lub dłużej spowodowało pomyślną inaktywację izolatu H5N8 (Figura 1) dla początkowego poziomu zanieczyszczenia 5,35 log₁₀ TCID₅₀/ml. Wymagane będą dodatkowe badania w celu ustalenia, czy krótsze czasy narażenia spowodują całkowitą inaktywację w przypadku poziomów zanieczyszczeń niższych niż 5,35 log₁₀ TCID₅₀/ml, co może być bardziej reprezentatywne w prawdziwym wybuchu choroby (1, 5).

Ilościowe wyniki RT-PCR wskazują, że degradacja wirusowego RNA (Figura 2) nie była głównym mechanizmem inaktywacji wirusów, ponieważ poziomy RNA odzyskanego po każdym czasie leczenia nie różniły się znacząco od siebie, $P > 0,05$. Inne możliwe cele wirusowe obejmują otoczkę lipidową i białka strukturalne, na które prawdopodobnie wpłynęła obróbka RCI-Cell™. Mechanizm oksydacyjny tego leczenia prawdopodobnie zakłócił względnie podatną otoczkę i mógł doprowadzić do denaturacji białek

strukturalnych powierzchni wirusa grypy, niezbędnych do skutecznego mechanizmu przywiązania i wejścia istotnego dla infekcyjności.

Wyniki uzyskane w tym doświadczeniu badawczym pokazują, że ekspozycja na system RCI-Cell™ przez 8 godzin skutkuje wymaganym poziomem inaktywacji izolatu ptasiej grypy, H5N8, który został użyty jako bezpieczny surogat dla wysoce zjadliwego izolatu H5N1. Mechanizm działania tej technologii prawdopodobnie wynika z chemii oksydacyjnej, która powoduje zarówno przerwanie otoczki lipidowej, jak i efekt denaturujący na strukturalne białka wirusowe niezbędne do replikacji wirusa.

ODNOŚNIKI:

1. **Bean, B., B. M. Moore, B. Sterner, L. R. Peterson, D. N. Gerding, and H. H. J. Balfour.** 1982. Survival of Influenza Viruses on Environmental Surfaces. *The Journal of Infectious Diseases* **146**:47-51.
2. **EPA** 2005, posting date. Antimicrobial Science Policies Disinfectant Technical Science Section. [Online.]
3. **Reed, L. J., and H. Muench.** 1932. A simple method for estimating 50% endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**:493-497.
4. **Tellier, R.** 2006. Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. *Emerging Infectious Disease* **12**.
5. **WHO.** 2006. Nonpharmaceutical Interventions for Pandemic Influenza, International Measures. *Emerging Infectious Disease* **12**:81-87.
6. **Wright, P. F., and R. G. Webster.** 2001. *Orthomyxoviruses*, Fourth ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.