

# Inaktywacja pikornawirusów za pomocą jonizacji promieniowej

## Wprowadzenie

Wirusową rodzinę *Picornaviridae*, która obejmuje wirus zapalenia wątroby typu A, charakteryzuje się tym, że obejmuje wirusy, które nie są otoczone genomami o jednoniciowym RNA, o których wiadomo, że są bardzo odporne na fizyczne i chemiczne sposoby inaktywacji (1). Wiadomo, że wirus zapalenia wątroby typu A rozprzestrzenia się przede wszystkim poprzez zanieczyszczoną wodę pitną i źródła pożywienia. Podczas epidemii HAV może się roznosić i pozostać zakaźny na różnych powierzchniach środowiska. Standardowe procesy dezynfekcji zwykle nie są skuteczne w celu dezaktywacji tego wirusa ze względu na wysoką odporność. Zalecane są rygorystyczne procedury dezynfekcji i warunków sanitarnych w zagrożonym środowisku w połączeniu z rygorystycznymi procedurami higieny pracowników w celu zapobiegania epidemiom HAV w przemyśle spożywczym.

Celem tego badania było potwierdzenie całkowitej inaktywacji HAV przy użyciu blisko spokrewnionego enterowirusa jako surogatu wirusa po ekspozycji na system EcoCuest Radiant Catalytic Ionization Cell™ (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 tej technologii określono przez zaszczepienie płytek ze stali nierdzewnej wirusem i umożliwienie wyschnięcia inokulum. W tym czasie pobrane zostały próbki kontrolne, a następnie płytki były wystawiane na działanie RCI-Cell™ przez różne czasy. Nieobróbki kontrolne również oceniono pod kątem zmniejszenia miana wirusa zakaźnego w okresie 24 godzin w kontrolowanych środowiskach. Skuteczność określono przez pomiar dowolnej redukcji miana zakaźnego przy użyciu miareczkowania w punkcie końcowym w hodowli tkankowej dla płytek obrabianych w porównaniu z niepoddawanyymi obróbce dodatkimi próbkami kontrolnymi.

## Materiały i Metody

**Wirus i komórki.** BEV-2 (ATCC VR-754, Manassas, VA) namnażano w komórkach Madin Darby Bovine Kidney (MDBK, ATCC CCL-22). Komórki MDBK namnażano w minimalnej podstawowej pożywce (Eagle) z 2 mM L-glutaminy i BSS Earle'a, tak aby zawierały 1,5 g/l wodorowęglanu sodu, 0,1 mM nieistotnych aminokwasów i 1,0 mM pirogronianu sodu z 7% płodową surowicą bydlęcą uzupełnioną 2,5 mg/L amfoterycyny B, 0,67 g/L streptomycyny i 0,3 g/l penicyliny. Komórki MDBK infekowano BEV-2 bez dodatku 10% FBS. Miano inokulum oceniano stosując infekcyjną dawkę 50 hodowli tkankowej, TCID<sub>50</sub> i obliczono metodą Reeda-Muencha (2).

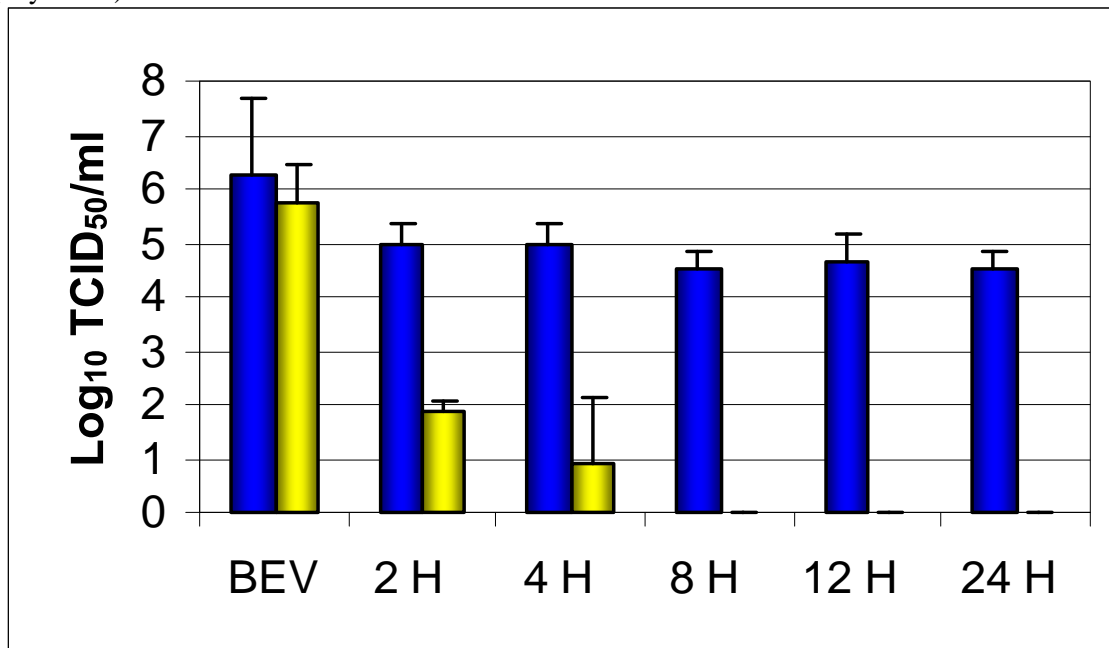
**Inaktywacja wirusa.** Płytki ze stali nierdzewnej typu 302 (McMasterCarr, Atlanta, GA) (2 x 10 cm<sup>2</sup>, grubość 0,8 mm) sterylizowano w autoklawie przez 15 minut w temperaturze 121 °C. W szafce bezpieczeństwa biologicznego II dodano 100 µl BEV-2 do każdej z nich, przetestowano płytkę i rozprowadzono, aby pokryć całą powierzchnię za pomocą końcówki pipety i pozostawiono do całkowitego wyschnięcia na około 20 minut. Następnie zaszczepione płytki umieszczono w sterylnym pojemniku transportowym i przetransportowano do komory testowej. Badane płytki umieszczono następnie w komorze testowej i wystawiono na działanie systemu RCI-Cell™ przez 24 godziny. Jako płytki kontrolne nie będące poddawane obróbce przygotowano również próbne próbki, jak opisano powyżej i dodano je do komory testowej, która nie była narażona na działanie systemu RCI-Cell™ przez okres 24 godzin. Jedna inokulowana

plytka została początkowo usunięta zarówno z komory RCI-Cell™, jak i nietraktowanej komory kontrolnej, do użycia jako początkowa miara wyjściowego miana wirusa. Następnie włączono urządzenie RCI-Cell™ i próbki usunięto z obu komór testowych po 2, 4, 8, 12 i 24 godzinach, usuwając próbną płytke i przygotowując ją do odzyskiwania wirusa, jak opisano poniżej.

**Odzyskiwanie wirusa.** BEV-2 odzyskano z powierzchni stali nierdzewnej, dodając płytke kontrolną do jałowej 50 ml fiolki stożkowej zawierającej 5 ml pożywki infekcyjnej. Następnie próbki wirowano przez 1 minutę, aby uwolnić wirus z nieobrabananej płytki. Próbki miareczkowano przez infekcję konfluentnych dołków MDBK w formacie 96-dołkowym z zastosowaniem miareczkowania punktu końcowego TCID<sub>50</sub>. Płytki inkubowano w 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> przez 48 godzin. Efekt cytotatyczny (CPE) typowy dla BEV-2 został określony dla każdego dołka, a miana wirusów podano jako TCID<sub>50</sub>/ml.

## Wyniki

Średnia ilość wirusa BEV-2 odzyskanego z próbek kontrolnych ze stali nierdzewnej we wszystkich doświadczeniach wynosiła 6,00 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml. Po leczeniu RHI-Cell™, średnia log redukcji zakaźnego wirusa BEV-2 wynosiła 3,87 i 4,87 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml po 2 i 4-godzinnej terapii (Wykres 1). Żaden zakaźny BEV-2 nie został odzyskany po 8, 12 lub 24-godzinnej ekspozycji na system RCI-Cell™. Infekcyjny BEV-2 został odzyskany ze wszystkich płytek pobranych po 2, 4, 8, 12 lub 24-godzinnych okresach w komorze bez obróbki RCI-Cell™ (Wykres 1)



Wykres1: Infekcyjny BEV odzyskany i zaobserwowane jako TCID<sub>50</sub>/ml w komórkach MDBK po obróbce RCI-Cell™ (żółte słupki) lub bez obróbki RCI-Cell™ (niebieskie słupki) w próbkowaniu po 2, 4, 8, 12 lub 24 godzinach.

## Odnosiniki:

1. Hollinger, F. B., and S. U. Emerson. 2003. Hepatitis A Virus, p. 799-840. *In* D.

M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, Fourth ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

2. **Reed, L. J., and H. Muench.** 1932. A simple method for estimating 50% endpoints. *Am J Hyg* **27**:493-497.