

# Picornavírusok inaktiválása EcoQuest Sugárzó Katalitikus Ionizáció alkalmazásával

## Bevezetés

A hepatitis A vírust is magába foglaló *Picornaviridae* víruscsalád jellemzően magába foglal olyan burok nélküli vírusokat, amelyek nem rendelkeznek egyszálú, pozitív érzékenységgű, a fizikai és kémiai inaktiválás eszközeivel szemben közismerten nagy ellenállóképességet mutató RNS-genom burokkal. (1). A Hepatitis A vírus (HAV) köztudottan főleg szennyezett ivóvíz és élelmiszer-források révén terjed. Járványkitörés idején a HAV fertőzést okozhat és fertőző maradhat különböző környezeti felületeken. A szokásos fertőtlenítési folyamatok rendszerint nem bizonyulnak hatékonynak a vírus inaktiválására a magas rezisztencia miatt. A HAV-járványok kitörésének az élelmiszeriparban történő megelőzésére ajánlottak az érintett környezet szigorú fertőtlenítési és higiénés eljárásai, az alkalmazottakra irányuló szigorú higiéniai eljárásokkal kombinálva.

A vizsgálat célja a HAV teljes hatástalanításának validálása volt, egy szoros rokonságban lévő enterovírus, mint helyettesítő vírus alkalmazásával, az EcoQuest Sugárzó Katalitikus Ionizációs Kamra™ (RCI-Cell™-rendszer™) elnevezésű rendszernek való expozíciót követően. Az RCI-rendszer™ egy olyan fejlett oxidációs eszköz, amely az UV-inaktivációt ötvözi a hidroxigyökök jelenlétével, szinergikus kapcsolat létrehozásával e két igen hatékony inaktiválási módszer között. A technológia hatékonyságának meghatározása úgy történt, hogy rozsdamentes acél szelvényeket oltottak be vírussal, majd hagyták, hogy az inokulum (oltóanyag) megszáradjon. Ebben a szakaszban kontrollmintákat vettek, majd a szelvényeket RCI-Cell™-rendszer általi behatásnak vetették alá. A kezeletlen kontrollmintákat szintén kiértékeltek, hogy összehasonlítsák a fertőző vírustiter csökkenését 24 órás időtartam alatt, kontrollált környezetben. A hatékonyság meghatározása a fertőző titer bármilyen csökkenésének a mérésével történt, elvégezve a kezelt szelvények végpont-titrálását a szövettényezetében, a kezeletlen pozitív kontrollszelvényekhez képest.

## Anyagok és módszerek

**A vírus és a sejtek** A BEV-2 szarvasmarha enterovírus (ATCC VR-754, Manassas, VA) szaporítását Madin Darby Szarvasmarha vesesejtekben (MDBK, ATCC CCL-22) végezték. Az MDBK-sejteket minimális esszenciális tápközegben (Eagle) szaporították 2 mM L-glutaminnal és Earle BSS-el; 1,5 g/l nátrium-hidrogén-karbonát, 0,1 mM nem-esszenciális aminosav valamint 7%-os magzati szarvasmarha (borjú) szérumot (FBS) tartalmazó 1,0 mM nátrium-piruvát hozzáadásával, kiegészítve 2,5 mg/l amfotericin B-vel, 0,67 g/l sztreptomocinnal és 0,3 g/l penicillinnel. Az MDBK sejteket BEV-2-vel fertőzték meg a 10% FBS hozzáadása nélkül. Az oltóanyag titerét a TCID<sub>50</sub> (szövettényezet 50%-át fertőző dózis) alkalmazásával értékelték ki, a számításokat a Reed-Muench módszerrel végezték. (2).

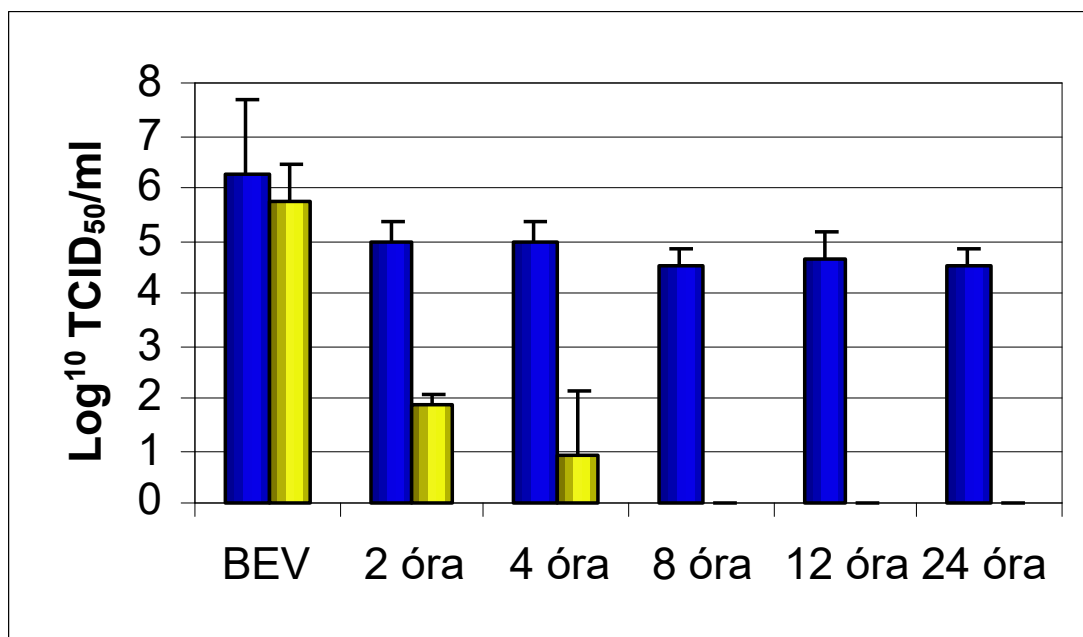
**A vírus hatástalanítása** 302 típusú rozsdamentes acél (McMasterCarr, Atlanta, GA) szelvényeket (2x 10 cm<sup>2</sup>, vastagságuk: 0,8 mm) autoklávban sterilizáltak 15 percig 121°C-os programban. Egy II. biológiai biztonsági osztályú szekrényben minden vizsgálati szelvényhez 100 µl BEV-2-t adtak, a teljes felületen szétterítve a pipetta hegyével, majd körülbelül 20 percet hagytak a teljes száradásra. Ezután az oltott szelvényeket steril konténerbe helyezték és átszállították a tesztkamrába. A tesztjelvényeket ezután tesztkamrába helyezték, majd 24 órán át kezelték az RCI-Cell™-rendszerrel. Kezeletlen kontroll tesztjelvényeket is készítettek a fent leírtak szerint, amelyeket azután olyan tesztkamrába helyeztek, amelyet nem lett kitéve az RCI-Cell™-rendszerrel történő 24 órás behatásnak. Az egyik beoltott szelvény az elején el lett távolítva, hogy mind az RCI-Cell™-kamra, mind a kezeletlen kontrollkamra felhasználható legyen a vírus kezdő titerének kiindulási mértékéként. Ezután bekapcsolták az RCI-Cell™-berendezést, majd a mintákat mindkét tesztkamrából 2, 4, 8, 12 és 24 óra elteltével eltávolították, úgy, hogy az egyik tesztjelvényt eltávolították és előkészítették a vírus kinyeréséhez az alább

leírtak szerint.

**A vírus kimutatása.** A BEV-2 kinyerése a rozsdamentes acél felületekről úgy történt, hogy a tesztszelvényt egy steril, 50 ml-es kúpos fiolába helyezték, amely 5 ml fertőző tápközeget tartalmazott. A csöveket ezután 1 percig vortexelték, hogy a vírus a beoltott szelvényről fel tudjon szabadulni. A minták titrálását konfluens 96-lyukú MDBK-sejttenyésztőlemezekre szélesztve végezték, TCID<sub>50</sub> végpont titrálást alkalmazva. A lemezeket 37°C-on inkubálták 48 órán át 5%-os CO<sub>2</sub> szint mellett. Meghatározták a BEV-2-re jellemző citopátiás hatást (CPE) minden egyes lyukra vonatkozóan, a vírusitereket TCID<sub>50</sub>/ml-ben adták meg.

## Eredmények

Az összes kísérlet során a rozsdamentes acél kontrollszelvényekből kinyert BEV-2 vírus átlagos mennyisége 6,00 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml volt. Az RCI-Cell<sup>TM</sup>-kamrával végzett kezelés után a fertőző BEV-2 vírus átlagos logaritmikusan csökkenése 3,87 és 4,87 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml volt 2 és 4 órás kezelést követően. (1. ábra). Az RCI-Cell<sup>TM</sup>-rendszerrel történő 8, 12 vagy 24 órás expozíció után fertőző BEV-2 nem volt kimutatható. A fertőző BEV-2 kimutatható volt az összes olyan szelvényen, amelyekről a mintavétel 2, 4, 8, 12 vagy 24 órás kamrában töltött periódus után történt, az RCI-Cell<sup>TM</sup>-rendszerrel történő kezelés nélkül. (1. ábra)



1. ábra: Az MDBK sejtekben kimutatott és TCID<sub>50</sub>/ml-ben megadott fertőző BEV az RCI-Cell<sup>TM</sup> kezelés után (sárga oszlopok), vagy RCI-Cell<sup>TM</sup> kezelés nélkül (kék oszlopok) a 2, 4, 8, 12 vagy 24 órás mintavételi időket követően.

## Hivatkozás:

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.