

Az Ecoquest fertőtlenítő rendszerei hatékonyságának értékelése az egér norovírus titereinek csökkentésében A vizsgálatot végezte: Dr. Lela Riley, a RADIL LLC, Columbia MO.

2008. november 18.

Bevezetés

A *Norovirus* nemzetség tagjai burok nélküli, lineáris vírusok, melyek genomja pozitív szenzitású, lineáris, egyszálú RNS. A norovírusok a Caliciviridae családba tartoznak, amely magába foglalja a Sapovirus, Lagovirus és Vesivirus nemzetségeket is. A korábban "Norwalk-szerű vírusok" vagy „kis kerek-strukturált vírusok” néven ismert Norovírusok az emberben gasztroenteritist okoznak, amely általában 24-48 órán át tart és a fertőzések minden korosztályt sújtanak.

Nemrég egérből izolálták az első egér norovírust. Ez az újonnan leírt egér-kórokozó sejtkultúrában lehet kitenyészteni, s ezáltal az első példa az in vitro tenyészhető norovírusra. Ezekben a vizsgálatokban az Ecoquest fertőtlenítő rendszernek hatékonyságát értékelték a norovírus, a norovírus, a Caliciviridae család képviselőjével szemben, in vitro tenyésztési rendszer alkalmazásával.

A kísérlet menete

Vírusállomány és tenyésztési rendszer

Az ebben a vizsgálatban használt MNV-4-et RAW267.4 sejtekben, egy egér makrofág sejtvonalban tartották fenn. A sejteket Dulbecco módosított Eagle-táptalajában (DMEM) tenyésztették, 10%-os magzati szarvasmarha szérummal (FBS) kiegészítve. Elvégeztük a vírus szaporítását, koncentrációját és megtisztítását. A tisztított vírusállományokat plakktitrálással titráljuk. A vírusállományokat -80 °C-os fagyasztóban tároltuk.

A felületek előkészítése

Ahhoz, hogy értékelni tudjuk az Ecoquest ózonmentes és alacsony oxidációs hatású dekontaminációs (fertőtlenítő) rendszerek hatékonyságát az MNV-titerek csökkentésének viszonylatában, a vírussal szennyezett felületeket a fertőtlenítő rendszerrel kezeltük, különböző behatási idővel. A fertőtlenítést három különböző felület esetében értékeltük: Rozsdamentes acél, szőnyeg és szövet. Rozsdamentes acél felület vizsgálatára 1,5 és 1,25 hüvelyk méretű rozsdamentes acél kazettákat használtunk. A szőnyeg- és szövet mintákat 1 hüvelykes négyzetekre vagdostuk. A kísérlet előtt az összes felületet gőzös autoklávban sterilizáltuk. A felületek szennyezéséhez 200 µl MNV vírusállományt (1×10^7 PFU/ml) pipettáztunk az egyes felületek közepére, ~ 1-2 cm-t lefedve. A felületeket levegőn szárítottuk, egy II. típusú biológiai biztonsági szekrényben. Egy óra elteltével összegyűjtöttük a nulla időpontú kontrollmintákat, és a megmaradt beoltott felületeket nedvesített 28°C-os inkubátorba helyeztük alacsony oxidációs vagy ózonmentes kezelés céljából. Négy beoltott minta-készletet használtunk minden felületre.

A meghatározott behatási idők elérése után a felületeket 10 sml DMEM-be merítettük, amely 10 µg/ml ciprofloxacint tartalmazott. A rozsdamentes acél felületeket steril sejtkaparóval kapartuk le, hogy a vírust eltávolítsuk a kazetta felületéről. A szőnyeg- és szövetmintákat steril tasakba helyeztük, és Stomacher Lab keverőgépben 1 percig homogenizáltuk. A mintákat kivettük a tasakból, és egy 15 ml-es kúpos centrifugacsőbe helyeztük, és 1000 x g nyomáson 10 percig centrifugáltuk a maradék szőnyeg- és szövetfoszlányok eltávolítása érdekében. Kontrollként mindegyik felszín beoltottuk egyenlő mennyiségű vírussal, és kezelés nélkül 28°C inkubátorba helyeztük, hogy a 24 órás kezeletlen kontrollminták szerepét töltsék be. A dekontaminációs rendszer által kezelt minták vizsgálatát négyyszer ismételtük minden egyes tesztelési időpontra. A kontrollokat is négy példányban teszteltük. Az adatokat az összes adatvételi pont átlagaként fejeztük ki és adtuk meg.

A vírustiter és a víruscsökkenés kiszámítása

A fertőtlenítőszer meghatározott térfogatú DMEM-ben való semlegesítése után a rozsdamentes acél felületeket steril sejtkaparóval alaposan lekapartuk, hogy a vírust a DMEM-be eluáljuk. A szőnyeg- és szövetmintákat steril DMEM-ben szuszpendáltuk, és a vírus felszabadítása érdekében Stomacher-keverővel homogenizáltuk. Az egyes eluátumok vírustiterét

úgy határoztuk meg, hogy beoltottuk a sejttenyészeteket az eluátumok tízszeres hígítású oldatsorozatával, majd az MNV-vel összefüggő jellegzetes citopátiás hatások megfigyelései alapján kiszámítottuk a szövettenyészet 50%-át fertőző dózist. (TCID₅₀). A végső titert az egyes ismétlésekből kiszámított egyedi titerek átlagolásával számítottuk ki, majd ezután számítottuk ki a vírustiter csökkenését.

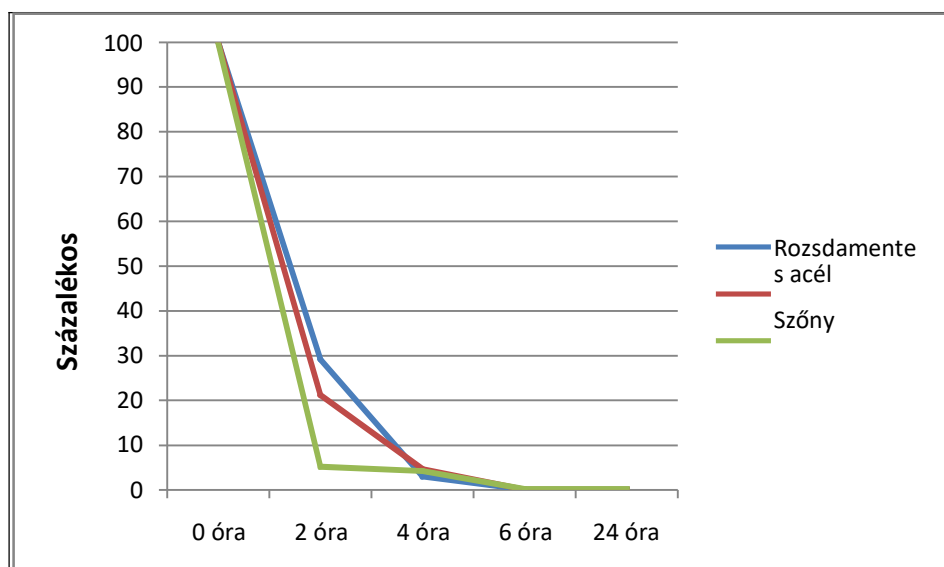
Eredmények

Az alábbi táblázatok összefoglalják a kísérletek eredményeit.

1. táblázat Az egér norovírus-titerének csökkenése az Ecoquest ózonmentes fertőtlenítést követően

Kezelési idő	Rozsdamentes acél			Szőnyeg			Szövetdarab		
	Kezeletlen (TCID ₅₀ /ml)	Kezelt (TCID ₅₀ /ml)	Százalékos csökkené	Kezeletlen (TCID ₅₀ /ml)	Kezelt (TCID ₅₀ /ml)	Százalékos csökken	Kezeletlen (TCID ₅₀ /ml)	Kezelt (TCID ₅₀ /ml)	Százalékos csökkené
0 óra	1,2 x10 ⁶			1,6 x10 ⁶			4,0 x10 ⁵		
2 óra		3,5 x 10 ⁵	70,8		3,4 x 10 ⁵	78,8		2,1 x 10 ⁴	94,8
4 óra		3,6 x 10 ⁴	97,0		7,5 x 10 ⁴	95,3		1,7 x 10 ⁴	95,8
6 óra		1 x 10 ²	99,9		<1 x10 ³	>99,9		<1 x10 ³	>99,8
24 óra	1 x 10 ³	1 x10 ²	99,9	<1 x10 ³	<1 x10 ³	>99,9	8,6 x 10 ²	<1 x10 ³	>99,8

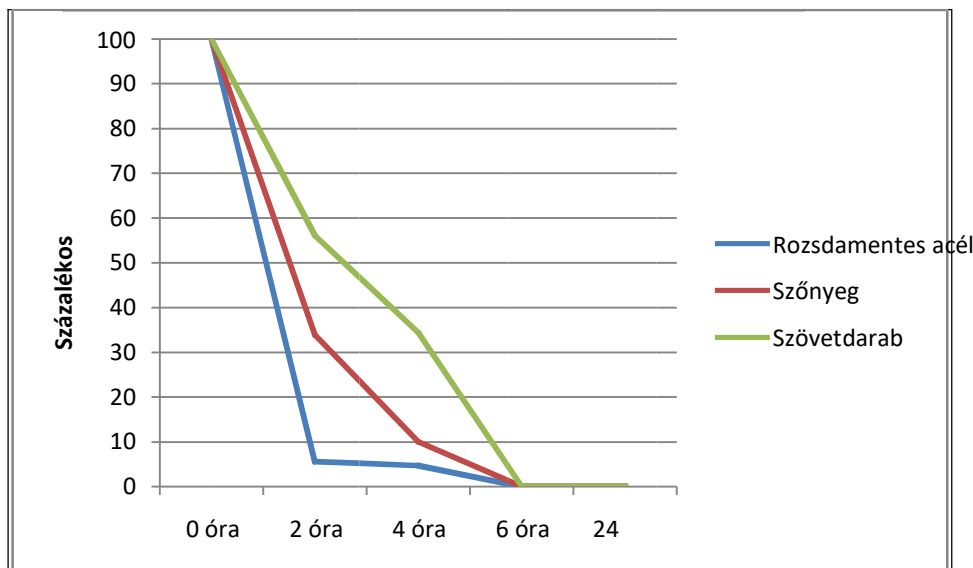
1. ábra: Az egér norovírus (MNV) túlélése az ózonmentes fertőtlenítést követően



2. táblázat Az egér norovírus túlélése Alacsony oxidációs hatású fertőtlenítést követően

Kezelési idő	Rozsdamentes acél			Szőnyeg			Szövetdarab		
	Kezeletlen (TCID ₀ /ml)	Kezelt (TCID ₅₀ /ml)	Százalékos csökkenés	Kezeletlen (TCID ₅₀ /ml)	Kezelt (TCID ₅₀ /ml)	Százalékos csökkenés	Kezeletlen (TCID ₅₀ /ml)	Kezelt (TCID ₅₀ /ml)	Százalékos csökkenés
0 óra	1,6 x 10 ⁵			2,8 x 10 ⁵			2,5 x 10 ⁴		
2 óra		9,03 x 10 ³	94,4		9,5 x 10 ⁴	66,1		1,4 x 10 ⁴	44,0
4 óra		7,6 x 10 ³	95,3		2,8 x 10 ⁴	90,0		8,6 x 10 ³	65,6
6 óra		<1 x 10 ²	>99,9		<1 x 10 ³	>99,9		<1 x 10 ²	>99,6
24 óra	9,3 x 10 ³	<1 x 10 ²	>99,9	<1 x 10 ³	<1 x 10 ³	>99,9	<1 x 10 ²	<1 x 10 ²	>99,6

2. ábra: Az MNV túlélése Alacsony oxidációs hatású fertőtlenítést követően



A vizsgálati jegyzőkönyvet készítette:

Lela K. Riley

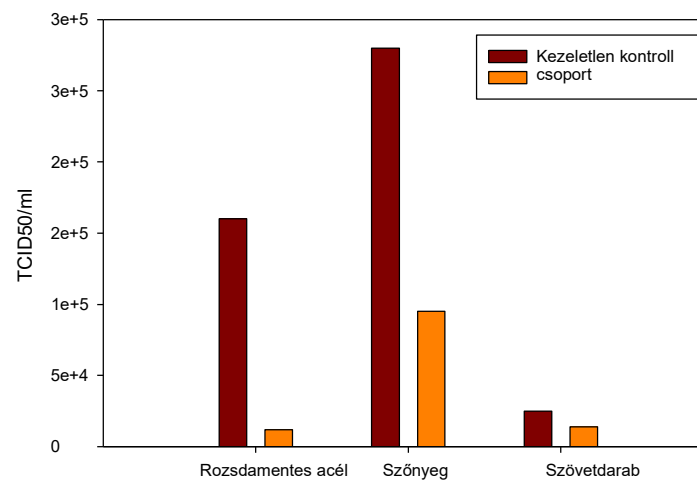
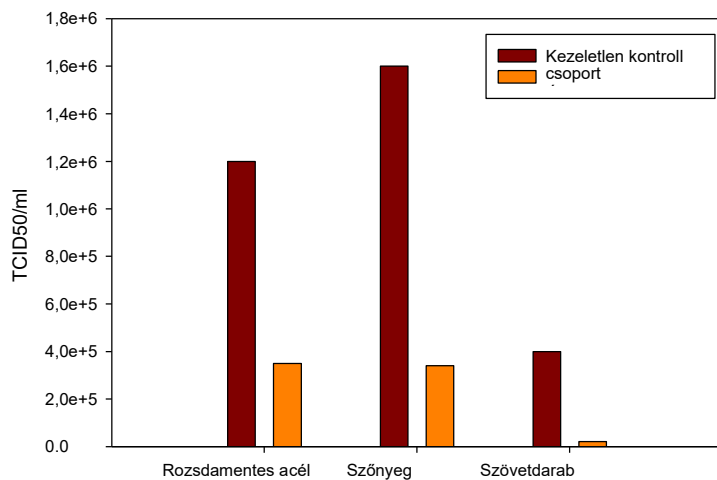
2008. november 19.

Lela K. Riley, PhD
 Ügyvezető partner, RADIL LLC

Kelt:

MNV-4 titerek a két órás Ózonmentes aktív tiszta sejtkezelést alkalmazó technológiát követően

MNV-4 titerek a két órás Alacsony oxidációs hatású aktív tiszta sejtkezelést alkalmazó technológiát követően



MNV-4 titerek a két órás Ózonmentes aktív tiszta sejtkezelést alkalmazó technológiát követően

MNV-4 titerek az Alacsony oxidációs hatású aktív tiszta sejtkezelést alkalmazó technológiát követően

