

Výskum v rámci koncepcie inaktivácie vírusov: Virucidná účinnosť UV svetla o vlnovej dĺžke 405 nm v rámci inaktivácie mačacieho kalicivírusu ako model pre dekontamináciu norovírusov

Rachael M. Tomb¹ · Michelle Maclean^{1,2} · John E. Coia³ · Elizabeth Graham⁴ · Michael McDonald⁴ · Chintamani D. Atreya⁵ · Scott J. MacGregor¹ · John G. Anderson¹

Prijaté: 18 septembra 2016 / Schválené: 10 decembra 2016

© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstrakt Dopyt po nových dekontaminačných technológiách pre použitie v nemocniciach sa stupňuje. Jeden taký systém používa na inaktiváciu mikroorganizmov viditeľné svetlo o dĺžke 405 nm, ktoré pomocou ROS tieto mikroorganizmy ničí. Aj keď sa toto svetlo bežne používa pri inaktivácii baktérií a plesní, o jeho virucidných účinkoch sa vie len málo. V klinickom prostredí sa často vyskytujú ohniská gastroenteritídy spôsobenej norovírusom (NoV). Úlohou tejto štúdie bolo preskúmať potenciálne účinky svetla o dĺžke 405 nm pri inaktivácii mačacieho kalicivírusu (FCV), ktorý je NoV najviac podobný. FCV suspendovaný v organicky bohatom médiu bol vystavený svetlu 405 nm, pričom bola skúmaná virucidná účinnosť tohto svetla a zároveň aj úloha, ktorú môže biologický materiál hrať pri stanovení citlivosti vírusu na toto svetlo. Účinnosť voči

vírusu bola úspešne demonštrovaná znížením infekčnosti o 4 Log₁₀ (99,99%), keď bol vírus v médiu vystavený dávke 2,8 kJ cm⁻². FCV v umelých výkaloch, umelých slinách, krvnej plazme a iných organicky bohatých médiách po vystavení o 50–85% menšej dávke svetla vykazoval ekvivalentnú hladinu inaktivácie, čo naznačuje zvýšenú hodnotu inaktivácie v prípade, keď je vírus prítomný v organicky bohatých a biologicky relevantných médiách. Ďalší výskum v tejto oblasti by mohol pomôcť pri vývoji svetelnej technológie používajúcej svetlo o dĺžke 405 nm, ktorá by sa mohla používať na účinnú dekontamináciu NoV v nemocničnom prostredí.

Kľúčové slová: svetlo o dĺžke 405 nm, inaktivácia vírusu, mačací kalicivírus, sliny, fekálie, plazma

Názory uvedené v tomto článku nie sú oficiálnym vyjadrením a predstavujú najlepší úsudok autora. Skutočnosti uvedené v článku v nijakom prípade nezavazujú FDA k čomukoľvek.

Rachael M. Tomb rachael.tomb.2013@uni.strath.ac.uk

- ¹ The Robertson Trust Laboratory for Electronic Sterilisation Technologies (ROLEST), Department of Electronic & Electrical Engineering, University of Strathclyde, Royal College Building, 204 George Street, Glasgow G1 1XW, Scotland, UK
- ² Department of Biomedical Engineering, University of Strathclyde, Wolfson Centre, 106 Rottenrow, Glasgow, Scotland, UK
- ³ Department of Clinical Microbiology, Glasgow Royal Infirmary, Glasgow, Scotland, UK
- ⁴ School of Veterinary Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK
- ⁵ Office of Blood Research and Review, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD, USA

Úvod

Norovírus (NoV), jedna z najbežnejších príčin epizodickej akútnej gastroenteritídy (Hall a kol. 2013), sa môže prenášať kontaminovaným jedlom a vodou, kontaktom medzi ľuďmi alebo kontaktom s kontaminovaným povrchom (Robilotti a kol. 2015). Stabilita prostredia a odolnosť voči dezinfekčným prostriedkom ďalej napomáhajú prenosu NoV, pričom častice vírusu sa na povrchoch detegujú až 42 dní po kontaminácii (Escudero et al. 2012). Ak je dekontaminácia prostredia nedostatočná, môže to mať za následok uzatvorenie nemocničných oddelení, čo môže pre nemocnicu znamenať značné prevádzkové a finančné škody (Wu a kol. 2005; Danial a kol. 2011). Epidémie NoV v zdravotníckych zariadeniach a zariadeniach, kde sa na jednom mieste združuje viac ľudí, napr. domy sociálnych služieb, školy a reštaurácie (Robilotti et al. 2015), zvýšili dopyt po nových dekontaminačných systémoch.

Pokročilé dekontaminačné technológie používané pri nozokomiálnych nákazách zahŕňajú ozón, pary peroxidu vodíka a systémy ultrafialového žiarenia (Maclean a kol.

2015). Tieto technológie sú časovo náročné, pretože nemocničné oddelenia musia byť v čase ich aplikácie prázdne, aby sa zabránilo pôsobeniu škodlivých účinkov na pacientov a personál (Otter a kol. 2013). Na zabezpečenie nepretržitej dekontaminácie obsadeného nemocničného prostredia bola vyvinutá technológia využívajúca viditeľné svetlo 405 nm fialového a modrého spektra (Ma-clean a kol. 2014). Bolo demonštrované použitie 405 nm svetla na dekontamináciu nemocničných priestorov, pričom úroveň bakteriálnej kontaminácie na povrchoch v okolí obsadených izolačných miestností bola znížená až o 86% v porovnaní s tradičným čistením (Maclean a kol. 2010, 2013a Bache a kol. 2012).

Bolo dokázané, že 405 nm svetlo fialového a modrého spektra má germicídny účinok na rad baktérií a húb (Guffey a Wilborn 2006; Enwemeka a kol. 2008; Maclean a kol. 2009, 2013b; Murdoch a kol. 2013). Svetlo excituje endogénne fotocitlivé molekuly porfyrínu v mikrobiálnych bunkách, čím spôsobuje produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) (napr. singletový kyslík), čo vedie k oxidačnému poškodeniu a smrti mikrobiálnych buniek (Hamblin a Hasan 2004; Maclean a kol. 2008; Murdoch a kol., 2013). Štúdiá skúmajúca účinnosť 405 nm svetla na bakteriofág C31 naznačila, že fág je citlivý na vysoké dávky 405 nm svetla, pričom citlivosť sa významne zvyšuje, keď je fág umiestnený v médiu bohatom na živiny (Tomb a kol. 2014). Pretože však virióny neobsahujú endogénne porfyríny (Gelderblom 1996), chýbajú nám v súčasnosti poznatky o účinnosti svetla 405 nm pri ničení medicínsky významných ľudských a zvieracích vírusoch.

Táto štúdiá bola navrhnutá ako výskumná koncepcia potvrdzujúca interakciu úzkopásmového svetla (405 nm) a mačacieho kalicivírusu (FCV) v rámci modelu študujúceho antivírusové účinky tohto svetla na NoV. Ako náhrada NoV bol vybraný mačací kalicivírus, pretože pre NoV v súčasnosti neexistuje štandardizovaný systém bunkových kultúr (Duizer a kol. 2004a; Richards 2012; Cromeans a kol. 2014). Naše údaje preukazujú vplyv použitých médií vrátane biologicky relevantných tekutín na citlivosť vírusov. Táto štúdiá poskytuje dôkazy o antivírusovej účinnosti svetla o vlnovej dĺžke 405 nm a rozoberá potenciálny mechanizmus inaktivácie vírusu.

Metodológia

Bunková a vírusová kultúra

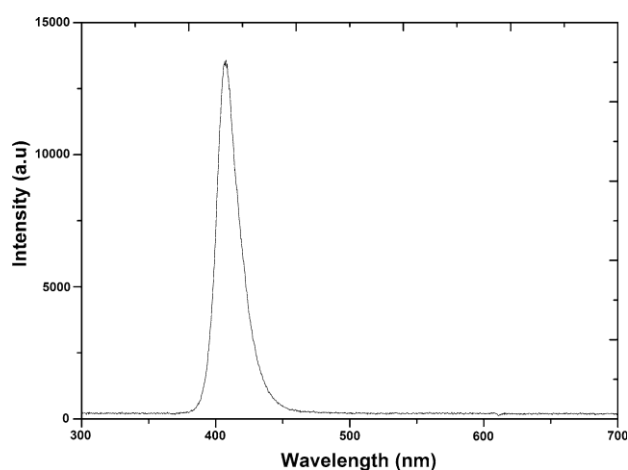
Mačacie embryonálne bunky, kmeň FEA (Jarrett a kol. 1973), sa kultivovali v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) doplnenom o 10% fetálne bovinné sérum (FBS), 2 mM L-glutamín, 1 mM pyruvát sodný a 240 U ml⁻¹ penicilín-streptomycín (Gibco, Life Technologies, UK), za účelom vzniku 10% FBS-DMEM. Bunky boli uchovávané pri teplote 37 ° C v 5% CO₂.

Zároveň bola pripravená aj vakcína v rámci kmeňa FCV F9, kde sa do monovrstiev FEA pridalo inokulum vírusu (School of Veterinary Medicine, University of Glasgow) (850 cm², valcovité banky) (Corning, USA). Po 90 minútach inkubácie naočkovaných buniek na rotačnom valcovom stojane pri 37 ° C v 5% CO₂ sa pridalo čerstvé kultivačné médium a inkubácia prebiehala ďalších 24 hodín. To malo za následok vírusom indukovanú deštrukciu takmer 90% bunkovej monovrstvy.

Z každej banky sme odobrali supernatant tkanivovej kultúry a médium a podrobili sme ich dvom cyklom zmrazenia a roztopenia pred vyčistením centrifugáciou pri 33009 x g po dobu 10 minút. Supernatant obsahujúci vírus sa potom skladoval pri -80 ° C. Koncentrácia infekčných FCV bola približne 2 x 10⁷ jednotiek na mililitr (PFU ml⁻¹). Koncentráciu sme stanovili štandardnou technikou stanovovania prítomnosti vírusu (Ormerod a Jarret 1978).

Zdroj svetla o dĺžke 405

Použitým zdrojom svetla bolo pole s diódami emitujúcimi svetlo (LED) s dĺžkou 405 nm (ENFIS PhotonStar Innovate UNO 24; PhotonStar Technologies, Veľká Británia) napájané z 40 V Philips Xitanium LED Driver (Phillips, Holandsko). Pole malo vrcholovú vlnovú dĺžku v hodnote 405 nm a šírku pásma približne 19 nm (obr. 1), ale pre uľahčenie bude v tomto texte označované ďalej len ako svetlo o vlnovej dĺžke 405 nm. Pole bolo pripojené k chladiču a chladiacemu ventilátoru, aby sa minimalizoval prenos tepla k testovaným vzorkám, takže nedošlo k významnému zahrievaniu vzorky. Svetelný zdroj bol umiestnený na stojane z PVC vo vzdialenosti 4 cm od mikrobiálnych vzoriek, a teda hodnota ožiarenia dosiahla 155,8 mW cm⁻² na povrchu vzorky [merané pomocou merača vyžarovaného výkonu a fotodiódového detektora (LOT Oriol, USA)].



Obr. 1 Optické emisné spektrum 405 nm LED podľa, merané pomocou spektrometra HR4000 (Ocean Optics, Nemecko) a verzie softvéru Spectra Suite 2.0.151

Expozícia suspenzií vírusu svetlu o vlnovej dĺžke 405 nm

Vírus mačacieho kalicivírusu bol rozmrazený pri izbovej teplote a zriedený na 2×10^5 PFU ml⁻¹ vo fyziologickom roztoku pufrovanom fosfátom Dulbecco doplnenom vápnikom a horčíkom (DPBS; Hyclone, Thermo Fischer Scientific, UK) - „minimálne médium“ (MM). Suspenzia vírusu 1,5 ml bola prenesená do štyroch centrálnych jamiek 24-jamkovej kultivačnej platničky (Techno Plastic Products, Švajčiarsko), ktorá bola umiestnená na vyvýšenom stojane, pričom jamky na vzorky boli umiestnené 4 cm priamo pod zdrojom svetla, pričom veko platničky zamedzovalo odparovaniu. Testované vzorky boli vystavené zvyšujúcim sa dávkam 405 nm svetla pri laboratórnej teplote, pričom dávka bola vypočítaná ako ožiarenie (mW cm^{-2}) x doba expozície (s). Kontrolné vzorky sa pripravili za rovnakých podmienok, ale bez ožiarenia svetlom o vlnovej dĺžke 405 nm. Po expozícii sa vzorky FCV riedili v MM za účelom stanovenia koncentrácie vírusu pomocou plakovej metódy.

FCV vzorky boli vystavené svetlu opakovane, vždy za použitia iných „organicky bohatých médií“ (ORM): DMEM, 10% FBS-DMEM, umelé sliny, umelé výkaly a krvná plazma. Umelé sliny boli upravené podľa štúdie Margomenou a kol. (2000) [5,2 g NaHCO₃, 0,88 g NaCl, 1,36 g K₂HPO₄, 0,48 g KCl, 2 000 jednotiek α -amylázy a 2 g bravčového žalúdočného mucínu (Sigma-Aldrich, UK) v 1 litri sterilnej vody], hodnota pH 7–7,5 čím sa napodobnila variabilita pH v ľudských slinách a predišlo sa inaktivácii FCV (Duiser a kol. 2004b; Edgar a kol. 2004). Umelé výkaly boli upravené podľa štúdie Colón a kol. (2015) [30 g inaktivovaného droždia (Marigold, UK), 7 g fyziolu (Buy Whole Foods Online, UK), 11 g miso pasty (Yuaka, UK), 8 g celulózy, 1,6 g NaCl, 0,8 g CaCl, 1,6 g KCl (Sigma-Aldrich) v 920 ml sterilnej vody], pH sa upravilo na 7. Úpravy zloženia umelých slín a výkalov mali zabezpečiť kompatibilitu s bunkami FEA. Čerstvá zmrazená ľudská krvná plazma bola dodaná Škótskou národnou krvnou transfúznou službou (SNBTS, UK) a pred použitím sa rozmrazila. FCV bol riedený v MM doplnenom o riboflavín, s aj bez tyrozínu, tryptofánu, pyridoxínu a kyseliny listovej (používa sa v rovnakých koncentráciách ako v DMEM: 0,4, 104, 16, 4 a 4 mg L⁻¹ v uvedenom poradí).

Plaková metóda

Pred začiatkom experimentu boli 6-jamkové kultivačné platničky na kultiváciu buniek (Thermo Fischer Scientific) naplnené $7,5 \times 10^5$ FEA bunkami na jamku. Do každej jamky boli vložené 3 ml bunkovej suspenzie v rastovom médiu. Nasledovala inkubácia pri teplote 37 ° C v 5% CO₂ po dobu 20 hodín – výsledkom bola jednoliata vrstva.

Po expozícii FCV bolo rastové médium odstránené a nahradené 1 mL FCV.

Platničky boli inkubované pri 37 ° C v atmosfére s obsahom 5% CO₂ po dobu 90 minút, pričom sa platničkami hýbalo každých 15 minút, aby sa zabezpečila rovnomerná distribúcia inokula po každej vrstve.

Po uplynutí inkubačnej doby sa inokulum odobralo a jamka sa premyla médiom (10% FBS-DMEM alebo DPBS) a následne sa pridali 4 ml zmesi pozostávajúcej z 2 x doplneného DMEM v pomere 1:1 s 2 x agarózou. 2 x doplnené DMEM sa pripravilo použitím 20 ml sterilizovaného a filtrovaného roztoku 10 x DMEM, pričom sa pridali rovnaké zložky, ako je uvedené vyššie, plus 9,86 ml roztoku hydrogenuhličitanu sodného (Gibco) a 100 ml sterilnej vody. 2x agaróza sa pripravila rozpustením 2 g agarózy (Sigma-Aldrich) v 100 ml deionizovanej destilovanej vody a následne sa sterilizovala (autokláv). Vrchná vrstva sa nechala ustáliť ešte pred tým, ako sa začalo s inkubáciou (44 - 48 hodín pri 37 ° C v 5% CO₂).

Po inkubácii - vrstvy sa cez noc zafarbili - 0,5% kryštalická fialová v pufrovanom neutrálnom 10% formalíne. Agarózové zátky a farbivo sa následne odstránili, platničky sa nechali vysušiť. Plakovou metódou sa zistila koncentrácia vírusu, ktorá sa vyjadřila ako PFU ml⁻¹.

Spektrofotometria

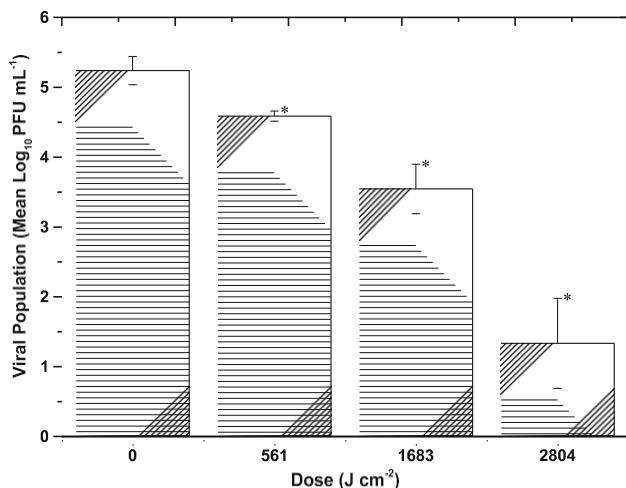
Prechod svetla 405 nm cez suspenzné médium sa meral pomocou spektrofotometra Biomate 5-UV – Visible (Thermo Fischer Scientific). Prítomnosť porfyrínov alebo iných zložiek so schopnosťou absorbovať 405 nm svetlo a emitovať fluorescenčné žiarenie v suspenznom médiu sa stanovila pomocou fluorescenčnej spektrofotometrie. Média boli čerstvo pripravené a merania fluorescencie sa uskutočňovali pomocou PC spektrofluorofotometra RF-5301 PC (Shimadzu, USA). Excitácia sa uskutočňovala pri 405 nm, emisné spektrá v rozmedzí 425 a 700 nm.

Analýza údajov

Údaje predstavujú priemerné výsledky a smerodajnú odchýlku (SD) v rámci troch nezávislých pokusov ($n \geq 3$). Pôsobenie 405 nm svetla na vírus sa stanovilo výpočtom zníženia úrovne infekčnosti z rozdielu medzi hodnotami Log₁₀ pre exponované a kontrolné vzorky. Významné rozdiely sa vypočítali na hladine významnosti 95% pomocou párových t-testov alebo ANOVA pre 1 faktor (štatistický softvér Minitab 16), s výsledkami, ktoré boli signifikantné na hladine $P < 0,05$.

Výsledky

Mačací kalicivírus bol umiestnený v MM a ORM a následne bol vystavovaný zvyšujúcim sa dávkam 405 nm svetla pri ožiarení 155,8 mW cm⁻². Výsledky (obr. 2) ukazujú, že



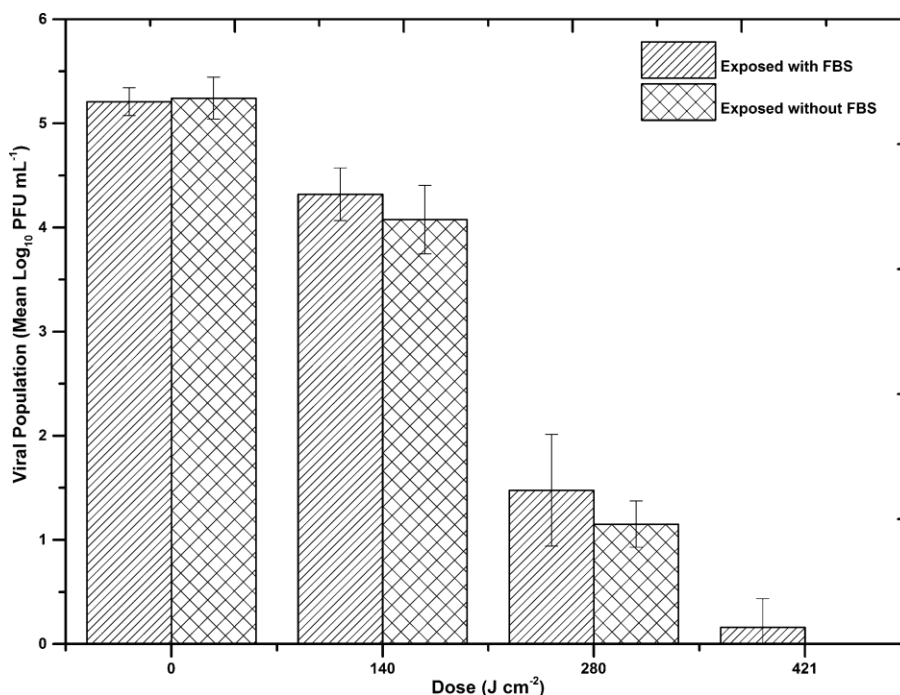
Obr. 2

Inaktivácia mačacieho kalicivírusu v minimálnom médiu (fyziologický roztok pufrovaný fosfátom Dulbecco) po vystavení svetlu 405 nm pri ožiarení 155,8 mW cm⁻². Údaje ukazujú priemerné hodnoty ($n = 6$) \pm SD. Hviezdičky označujú vzorky vystavené svetlu, ktoré sa významne líšili od kontrolných vzoriek ($P \leq 0,05$), pri použití ANOVA pre jeden faktor. V kontrolných populáciách nebol pozorovaný žiadny významný pokles ($P \geq 0,05$)

pri umiestnení vírusu do MM sa dosiahla významná inaktivácia FCV po expozícii 561 J cm⁻² ($P = 0,043$), pričom bola pozorovaná relatívne lineárna inaktivácia pri dávke 2,8 kJ cm⁻², čo je požadovaná dávka pri redukcii 3,9 Log₁₀. Kontrolné vzorky nevykazovali v priebehu experimentu žiadne významné zmeny ($P [0,05]$).

Zistilo sa, že antivírusová účinnosť sa významne líši v prípade, keď je vírus umiestnený v ORM.

Ob. 3 Porovnanie inaktivácií mačacieho kalicivírusu v suspenzii organicky bohatého média [Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu s a bez 10% fetálneho bovinného séra (FBS)], po vystavení svetlu 405 nm pri dávke 155,8 mW cm⁻². Údaje poukazujú na priemernú hodnotu ($n = 3$) \pm SD. Štatistická analýza pomocou párového t testu nepreukázala žiadny významný rozdiel inaktivácie medzi dvoma médiami ($P > 0,05$). V kontrolnej populácii nebol pozorovaný žiadny významný pokles ($P \geq 0,05$)



Vírus umiestnený v 10% FBS-DMEM (obr. 3) bol inaktivovaný už pri významne nižšej dávke (obr. 3), s redukciiou 4,8 log₁₀ dosiahnutou po dávke 421 J cm⁻². Pretože sa predpokladá, že prítomnosť FBS v DMEM znižuje hladinu oxidácie po vystavení normálnemu laboratórnemu osvetleniu (Grzelak et al. 2001), pokus sme opakovali, no teraz sme FCV umiestnili do DMEM bez FBS, aby sme mohli pozorovať akékoľvek rozdiely v kinetike inaktivácie. Aj keď sa pri každej aplikovanej dávke pozorovala mierne vyššia inaktivácia, výsledky (obr. 3) nepreukazujú významné rozdiely v kinetike inaktivácie FCV v prípade prítomnosti alebo neprítomnosti 10% FBS ($P > 0,05$). Kontrolné vzorky nevykazovali žiadny významný pokles ($P > 0,05$).

Ďalej sa preukázalo, že zložky DMEM sú fotocitlivé (Grzelak et al. 2001), a preto sa expozícia opakovala, tentokrát s pridaním riboflavínu do MM s a bez pridania

tyrozínu tryptofánu, pyridoxínu a kyseliny listovej v rovnakých koncentráciách, aké sa nachádzajú v DMEM (tabuľka 1). Výsledky preukázali, že expozícia FCV umiestneného v MM s riboflavínom viedla k redukcii o 1,3 Log₁₀ po dávke 421 J cm⁻¹. Keď však boli prítomné všetky zložky, došlo k zvýšenej inaktivácii a bola dosiahnutá redukcia 5,1 Log₁₀.

Ako ORM boli vybrané umelé sliny, umelé výkaly a krvná plazma, ktoré sú biologicky významné, keďže NoV je v stolici pravidelne identifikovaný. Expozícia FCV po umiestnení do suspenzie umelých slín priniesla výsledky podobné výsledkom získaným v DMEM s redukciiou infekčnosti 5,1 Log₁₀ dosiahnutou po dávke

Tabuľka 1 Porovnanie inaktívácie mačacieho kalicivírusu suspendovanom v minimálnom médiu doplnenom riboflavínom alebo spolu s tyrozínom, tryptofánom, pyridoxínom a kyselinou listovou po vystavení svetlu 405 nm pri dávke 155.8 mW cm⁻²

Fotocitlivá zložka	Počiatočná populácia, Log ₁₀ PFU mL ⁻¹ (± SD)	Populácia vystavená svetlu, Log ₁₀ PFU mL ⁻¹ (± SD)	Kontrolná populácia, Log ₁₀ PFU mL ⁻¹ (± SD)	Redukcia Log ₁₀ , PFU mL ⁻¹ (<i>P</i> hodnota)
Riboflavín	5.01 ± 0.02	3.77 ± 0.61	5.05 ± 0.06	1.28* (<i>P</i> = 0.00)
Riboflavín	5.15 ± 0.03	0.00 ± 0.00	5.12 ± 0.07	5.12* (<i>P</i> = 0.00)
Tyrozín				
Tryptofán				
pyridoxínom				
Kyselina listová				

Údaje poukazujú na priemernú hodnotu (*n* = 3) ± SD

* Vzorky vystavené svetlu, ktoré sa významne líšili kontrolných vzoriek (*P* ≤ 0.05)

421 J cm⁻² (obr. 4a). (V tomto prípade bola inaktívacia meraná na citlivosť desať PFU ml⁻¹, pretože umelé sliny v neriedených vzorkách nepriaznivo reagovali s FEA bunkami a spôsobili ich vytesnenie z platne). Dávka požadovaná na inaktíváciu pri suspenzii v krvnej plazme bola o niečo vyššia ako dávka požadovaná pri použití v umelých slinách, pričom na dosiahnutie redukcie 4,8 log₁₀ bola potrebná dávka 561 J cm⁻² (obr. 4a). Inaktívacia FCV v umelom výkale vyžadovala väčšie dávky, pričom redukcia 4,5 log₁₀ bola dosiahnutá pri dávke 1,4 kJ cm⁻² (obr. 4b). Kontrolné vzorky v umelých slinách, plazme a umelom výkale nevykazovali žiadne významné zmeny (*P* = 0,618, 0,101, 0,747, v uvedenom poradí).

Optická analýza suspenzie média preukázala prenos svetla 405 nm nasledovne: 90% v DPBS, 40,6% v DMEM, 30,6% v 10% FBS-DMEM, 35,9% v umelých slinách, 0,05% v umelých výkaloch a 2,1% v krvnej plazme (*n* = 4). Emisné fluorescenčné spektrá (obr. 5) MM (DPBS) a ORM (DMEM, 10% FBS- DMEM, umelé sliny, umelé výkaly a krvná plazma) vykazujú emisné vrcholy pre DMEM, 10% FBS-DMEM, umelé výkaly a krvnú plazmu v rozmedzí medzi 510 a 520 nm a pre umelé sliny pri 460 nm.

Diskusia

Aj keď v poslednom čase sa vo väčšej miere používajú myšie norovírusy a kalicivírusy izolované z opíc ako náhrady NoV (Cromeans a kol. 2014; Kniel 2014; Chui a kol. 2015; Esseili a kol. 2015; Zonta a kol. 2016), pre našu štúdiu sme zvolili FCV, pretože má podobné fyziologické a genomické vlastnosti ako NoV a pre prácu s ním sú k dispozícii štandardizované protokoly (Doultree a kol. 1999; Bidawid a kol. 2003; Duizer a kol. 2004a, 2004b; Chander a kol., 2012). Aj niektoré iné štúdie skúmajúce virucidné účinky ultrafialového žiarenia, ozónu, pár peroxidu vodíka a studenej plazmy si zvolili FCV.

(Nuswalen a kol. 2002; Hudson a kol. 2007; Bentley a kol. 2012; Aboubaktar a kol. 2015; Holm-dahl a kol. 2016).

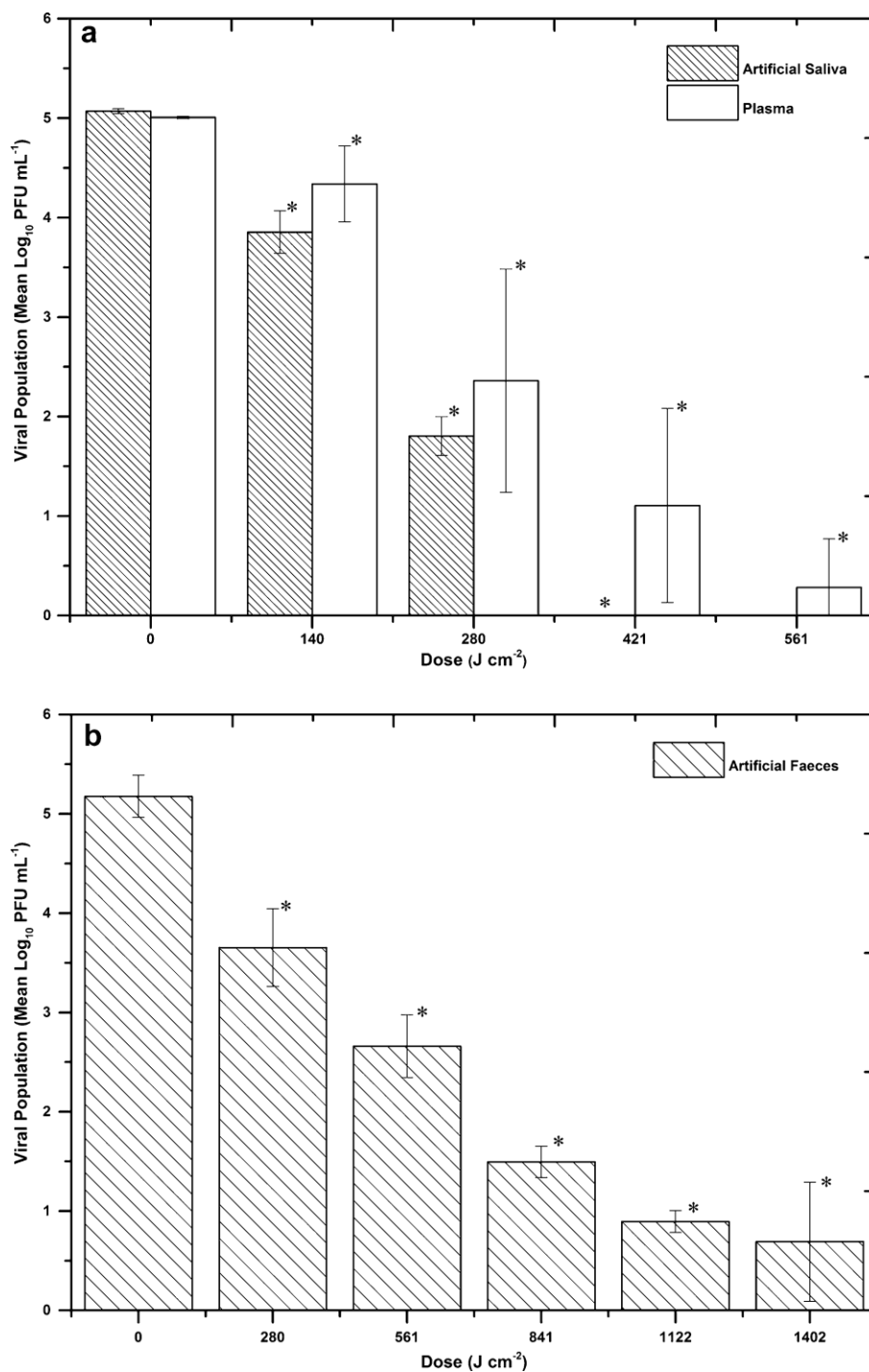
Virucidná účinnosť 405 nm svetla sa stanovila pomocou FCV suspendovaného v MM aj ORM. Expozícia v MM by poskytla lepšiu indikáciu interakcie svetla 405 nm a samotného vírusu než v ORM suspenzii, ktorá pravdepodobne obsahuje fotocitlivé zložky, ktoré sú ľahko ovplyvniteľné okolitým prostredím.

FCV sme inaktivovali v suspenzii v MM, aj keď požadovaná dávka bola veľká: 2,8 kJ cm⁻² pri ktorej sa dosiahlo zníženie o 3,9 Log₁₀ (obr. 2). V prípade baktérií a húb v MM je pre inaktíváciu a teda redukcii o 5 Log₁₀ potrebná dávka v rozmedzí 18–576 J cm⁻² (Maclean a kol. 2009; Murdoch a kol. 2012, 2013). Zvýšená citlivosť baktérií a húb v porovnaní s vírusmi sa pripisuje prítomnosti endogénnych fotocitlivých porfyrínov v týchto bunkách (Hamblin a Hasan 2004; Maclean a kol. 2008; Murdoch a kol. 2013). Očakávala sa nízka citlivosť FCV v MM kvôli neprítomnosti porfyrínov vo vírusovej štruktúre, spolu so skutočnosťou, že MM neobsahuje žiadne fotocitlivé látky, ktoré absorbujú svetlo pri 405 nm (obr. 5), čo naznačuje, že inaktívacia vírusu bude spôsobená odlišným mechanizmom. Alternatívny mechanizmus deaktivácie, keď je FCV v suspenzii s MM, môže byť spojený s emisným spektrom LED siahajúcim mierne do oblasti UVA (obr. 1), čo znamená, že vírus je vystavený veľmi nízkej úrovni UVA fotónov (* 390 nm), čo by mohlo spôsobiť oxidačné poškodenie proteínov (Girard a kol. 2011), napríklad vírusovej kapsidy, a tým prispieť k pozorovanej inaktívácii. Ďalšou možnosťou je, že malé množstvo svetla vo vlnovej dĺžke 420–430 nm emitovaného zo zdroja môže prispievať k inaktívácii vírusu. Antivírusové účinky svetla o vlnovej dĺžke 420 - 430 nm boli preukázané na víruse myšej leukémie, pričom sa predpokladá, že dlhá expozícia spôsobuje poškodenie procesu reverznej transkripcie vírusu svetlom (Richardson a Porter 2005).

Obr. 4 Inaktivácia mačacieho kalicivírusu suspendovaného v:

a) umelých slinách alebo plazme

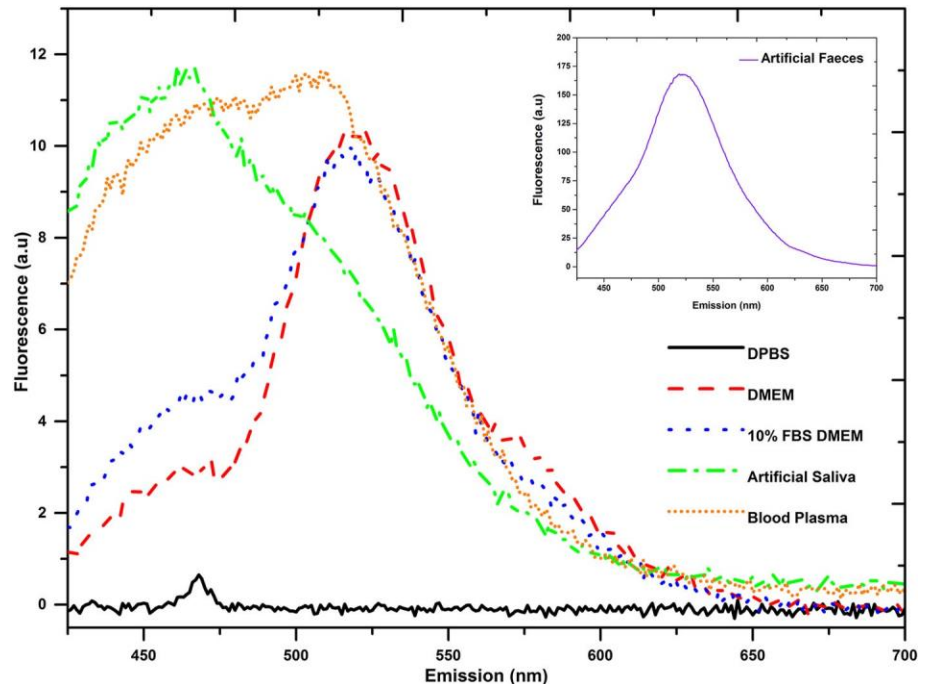
b) umelých výkaloch po vystavení zvyšujúcim sa dávkam svetla o vlnovej dĺžke 405 nm pri dávke 155,8 mW cm⁻². Údaje poukazujú na priemernú hodnotu ($n = 3$) ± SD. Hviezdičky označujú vzorky vystavené svetlu, ktoré sa významne líšili od kontrolných vzoriek ($P \leq 0,05$), pri použití ANOVA pre jeden faktor. V kontrolnej populácii nebol pozorovaný žiadny významný pokles ($P \geq 0,05$)



Aj keď sa vírus líši svojou štruktúrou od FCV, tieto objavy naznačujú, že dlhodobé vystavenie svetlu o vlnovej dĺžke v rozmedzí od 390 nm do 420 nm, vrátane 405 nm, môže ovplyvniť schopnosť vírusov infikovať a replikovať sa v hostiteľských bunkách a teda sa podieľať na inaktivácii FCV.

Aby sa zistilo, či ORM malo nejaký vplyv na citlivosť vírusu, boli najprv pripravené suspenzie FCV v DMEM s 10% FBS a bez neho, keďže sa predpokladá, že FBS pomáha chrániť pred ROS (Grzelak et al. 2001). Výsledky (obr. 3) demonštrovali takmer úplné zníženie infekčnosti populácie (10^5 PFU ml⁻¹) po dávke 421 J cm⁻². Ako je zrejme z obr. 3, k mierne väčšej inaktivácii došlo, keď bol FCV použitý v suspenzii s DMEM bez prítomnosti FBS.

Obr. 5 Fluorescenčné spektrum minimálneho média [fyziologický roztok pufrovaný fosfátom Dulbecco (DPBS)] a organicky bohatého média [Dulbeccovo modifikované Eagle médium (DMEM), 10% fetálne bovinné sérum pridané do DMEM (10% FBS-DMEM), umelé sliny, umelé výkaly a krvná plazma] a svetlo vlnovej dĺžky 405 nm



Avšak, medzi kinetikou inaktívácie nebol pozorovaný žiadny významný rozdiel. Pretože inaktivačná dávka 421 J cm^{-2} je o 85% nižšia ako dávka požadovaná pre podobnú úroveň inaktívácie v MM, je pravdepodobné, že zložky ORM ovplyvňujú inaktíváciu FCV. Štúdia skúmajúca citlivosť bakteriofága C31 (Tomb et al. 2014) preukázala podobné výsledky ako sú výsledky tejto štúdie: pri vystavení pôsobeniu jednoduchého soľného roztoku bola pozorovaná malá inaktívacia; citlivosť sa však významne zvýšila, keď sa suspendovala v médiu bohatom na živiny, s redukciou $5,4 \text{ Log}_{10}$ v C31 dosiahnutou po expozícii 510 J cm^{-2} . Predpokladalo sa, že to je spôsobené komplexným zložením média bohatého na živiny - bielkoviny a aminokyseliny, čo naznačuje, že niektoré zložky môžu byť fotocitlivé a pri vystavení svetlu 405 nm v prítomnosti kyslíka môžu produkovať ROS a poškodiť bakteriofág (Tomb et al. 2014). Rovnaký fenomén pravdepodobne stojí za zvýšenou inaktíváciou FCV, keď je vírus suspendovaný v DMEM a 10% FBS-DMEM, pretože tieto obsahujú komplexnú zmes aminokyselín, vitamínov a cukrov, ktoré majú schopnosť absorbovať svetlo 405 nm (5) a pôsobia ako fotosenzibilizátory.

Fotosenzibilizácia zložiek DMEM sa tiež preukázala pri vystavení svetlu, pričom sa preukázalo, že riboflavín produkuje ROS, ktorý je ďalej zosilnený tryptofanom, tyrozínom, pyridoxínom a kyselinou listovou (Grzelak et al. 2001). Je dôležité podotknúť, že modré svetlo sa považuje pri fotorozklade riboflavínu a generovaní ROS za najefektívnejšie (Cheng a kol., 2015)

Aby sme toto tvrdenie preskúmali, pridali sme riboflavín do MM samostatne a následne spolu s tyrozínom, tryptofanom, pyridoxínom a kyselinou listovou v rovnakých koncentráciách ako v DMEM (tabuľka 1). Výsledky tvrdenie podporili: redukcia $1,3 \text{ Log}_{10}$ za prítomnosti riboflavínu. Ak však boli prítomné všetky vitamíny a aminokyseliny (riboflavín, tyrozín, tryptofán, pyridoxín a kyselina listová), bola dosiahnutá zvýšená inaktívacia FCV a úplná inaktívacia populácie 10^5 PFU ml^{-1} .

Je dôležité zvážiť, ako by bola ovplyvnená inaktívacia vyvolaná svetlom, ak by bol vírus v suspenzii so zložkami, ktoré sa v jeho prítomnosti vyskytujú častejšie, napr. telesné tekutiny alebo sekréty. Keďže sme schopní pripraviť umelé sliny a umelé výkaly, použili sme tieto spolu s ľudskou krvnou plazmou ako modelové ľudské sekréty, ktoré sú schopné prenášať veľké množstvo vírusov (Aitken a Jeffries 2001).

Výsledky (obr. 4) demonštrovali, že podobne ako inaktívacia v ORM (DMEM a 10% FBS-DMEM), citlivosť vírusu sa významne zvýšila v momente, keď bol vírus suspendovaný v týchto biologických tekutinách. Z troch použitých modelových tekutín bola citlivosť najvyššia, keď sa vírus suspendoval v umelých slinách, pričom sa po dávke 421 J cm^{-2} dosiahla redukcia infekčnosti $5,1 \text{ log}_{10}$ - to isté, čo sa pozorovalo pri použití ORM. Náhylnosť sa mierne znížila, keď sa vírus suspendoval v krvnej plazme (redukcia $4,8 \text{ log}_{10}$ pri 561 J cm^{-2}), následne v umelých výkaloch, pričom bolo potrebné takmer stonásobit dávku potrebnú na dosiahnutie požadovanej redukcie $4,5 \text{ log}_{10}$. Znížená úroveň prenosu svetla 405 nm krvnou plazmou a umelými výkalmi prispieva k pomalšej inaktívácii - priemerná hodnota pre krvnú plazmu

je 2,12% a umelé výkaly 0,05% v porovnaní s 30 - 40% vo všetkých ostatných použitých ORM. Celkovo boli hodnoty citlivosti FCV na svetlo vlnovej dĺžky 405 nm pri suspenzii vírusu v umelých výkaloch, umelých slinách, krvnej plazme a iných organicky bohatých médiách významne zvýšené v porovnaní s citlivosťou v minimálnych médiách, pričom sa vyžadovala o 50–85% nižšia dávka. V prípade ORM je inaktivácia pravdepodobne spôsobená bielkovinami obsiahnutými v médiu, napríklad mucínom v umelých slinách, bielkovinami v plazme a inaktivovanými kvasinkami v umelých výkaloch, ktoré môžu byť všetky fotocitlivé (fluorescenčné spektrum - vrcholy okolo 460 a 510–520 nm, vid'. obr. 5). Tieto výsledky naznačujú, že je možné zvýšiť citlivosť NoV na svetlo 405 nm, ak bude vírus suspendovaný v ORM, alebo v sekrétoch hostiteľa, v ktorých sa bežne uvoľňuje - výkaly, krv a zvratky. Aj keď sa konzistencia a priehľadnosť / nepriehľadnosť tekutín môžu líšiť od toho, čo uvádzame v tejto štúdii, je pravdepodobné, že tieto tekutiny budú bohaté na molekuly, ktoré by mohli byť potenciálne citlivé na svetlo vlnovej dĺžky 405 nm, a tým napomôcť pri inaktivácii NoV.

Výsledky tejto štúdie poskytujú jasný dôkaz, ktorý demonštruje, že koncepcia antimikrobiálnej účinnosti svetla vlnovej dĺžky 405 nm sa dá použiť aj na medicínsky dôležité vírusy, pričom sa citlivosť týchto vírusov významne zvýši, ak sú častice vírusu obsiahnuté v biologicky relevantnom médiu. Mali by sa podniknúť ďalšie kroky na stanovenie účinkov svetla 405 nm na iné vírusy podobné NoV, ako napríklad myši norovírus a kalicivírusy izolované z opíc, ktoré môžu byť odolnejšie voči dekontaminácii. Takéto skúmanie zabezpečí, že antivírusová účinnosť svetla 405 nm nebude nadhodnotená / podhodnotená a umožní presnejšiu kvantifikáciu dávky potrebnej na deaktiváciu NoV. Keďže sa v rámci tohto výskumu použil na stanovenie kinetiky inaktivácie vírusu malý zdroj LED s vysokým výstupom ožiarenia, sú potrebné ďalšie výskumy, ktoré by sa sústredili na rôznu intenzitu ožiarenia (dlhodobé a krátkodobé vystavenie) a ktoré by tiež preskúmali účinnosť 405 nm svetla proti vírusom nachádzajúcim sa vo vzduchu alebo na povrchoch (Maclean a kol. 2010, 2013a; Bache a kol. 2012). Ďalšie štúdie by mohli pomôcť preskúmať použitie svetla 405 nm pri dekontaminácii vzduchu a povrchov v zdravotníckych zariadeniach, ako aj v iných vnútorných priestoroch, kde je významný výskyt vírusových patogénov.

Pod'akovanie All the authors wish to thank MH Grant and C Henderson, Department of Biomedical Engineering, University of Strathclyde, for access to and technical expertise with the fluorescence spectrophotometer. The authors would also like to thank the Scottish National Blood Transfusion Service (SNBTS) for provision of blood plasma. The authors also thank The Robertson Trust for their support.

Financovanie: R.M.T. was supported by the Scottish Infection Research Network and Chief Scientist Office through a Doctoral Fellowship Award [CSO Reference: SIRN/DTF/13/02]. Part of this work was also supported by US FDA funding to C.D.A., with experimental work conducted at ROLEST through a collaborative research contract [Reference: HHSF223201410188A and 140787, respectively].

Sprístupnenie: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Bibliografia

- Aboubaktar, H. A., Williams, P., Gangal, U., Youssef, M. M., El-Sohaimy, S. A. A., Bruggeman, P. J., et al. (2015). Virucidal effect of cold atmospheric gaseous plasma on feline calicivirus, a surrogate for human norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 3612–3622.
- Aitken, C., & Jeffries, D. J. (2001). Nosocomial spread of viral disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(3), 528–546.
- Bache, S. E., Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Gettinby, G., Coia, J. E., et al. (2012). Clinical studies of the high-intensity narrow-spectrum light environmental decontamination system (HINS-light EDS), for continuous disinfection in the burn unit inpatient and outpatient settings. *Burns*, *38*, 69–76.
- Bentley, K., Dove, B. K., Parks, S. R., Walker, J. T., & Bennett, A. M. (2012). Hydrogen peroxide vapour decontamination of surfaces artificially contaminated with norovirus surrogate feline calicivirus. *Journal of Hospital Infection*, *80*(2), 116–121.
- Bidawid, S., Malik, N., Adegbinrin, O., Sattar, S. A., & Farber, J. M. (2003). A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. *Journal of Virology Methods*, *107*(2), 163–167.
- Chander, Y., Johnson, T., Goyal, S. M., & Russell, R. J. (2012). Antiviral activity of Ecasol against feline calicivirus, a surrogate of human norovirus. *Journal of Infection and Public Health*, *5*(6), 420–424.
- Cheng, C. W., Chen, L. Y., Chou, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, *148*, 262–267.
- Chui, S., Skura, B., Petric, M., McIntyre, L., Gamage, B., & Issac-Renton, J. (2015). Efficacy of common disinfectant/cleaning agents in inactivating murine norovirus and feline calicivirus as surrogate viruses for human norovirus. *American Journal of Infection and Public Health*, *5*(6), 420–424.
- Colón, J., Forbis-Stokes, A. A., & Deshusses, M. A. (2015). Anaerobic digestion of undiluted simulant human excreta for sanitation and energy recovery in less-developed countries. *Energy for Sustainable Development*, *29*, 57–64.
- Cromeans, T., Park, G. W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., et al. (2014). Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(18), 5743–5751.
- Danial, J., Cepeda, J. A., Cameron, F., Cloy, K., Wishart, D., & Templeton, K. E. (2011). Epidemiology and costs associated with norovirus outbreaks in NHS Lothian, Scotland 2007–2009. *Journal of Hospital Infection*, *79*(4), 354–358.
- Doultree, J. C., Druce, J. D., Birch, C. J., Bowden, D. S., & Marshall, J. A. (1999). Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, *41*(1), 51–57.

- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., & Koopmans, M. (2004a). Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(8), 4538–4543.
- Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P., & Estes, M. K. (2004b). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, *85*, 79–87.
- Edgar, M., Dawes, C., & O'Mullane, D. (2004). *Saliva and oral health* (3rd ed.). London: British Dental Journal.
- Enwemeka, C. S., Williams, D., Hollosi, S., Yens, D., & Enwemeka, S. K. (2008). Visible 405 nm SLD light photo-destroys methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, *40*(10), 734–737.
- Escudero, B. I., Rawsthorne, H., Gensel, C., & Jaykus, J. A. (2012). Persistence and transferability of noroviruses on and between common surfaces and foods. *Journal of Food Protection*, *75*(5), 927–935.
- Esseili, M. A., Saif, L. J., Farkas, T., & Wang, Q. (2015). Feline calicivirus, murine norovirus, porcine sapovirus and Tulane virus survival on postharvest lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(15), 5085–5092.
- Gelderblom, H. R. (1996). Structure and classification of viruses, chapter 41. In S. Baron (Ed.), *Medical microbiology* (4th ed.). Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Girard, P. M., Francesconi, S., Pozzebon, M., Graindorge, D., Rochette, P., Drouin, R., et al. (2011). UVA-induced damage to DNA and proteins: Direct versus indirect photochemical processes. *Journal of Physics: Conference Series*, *261*(1), 012002. doi:10.1088/1742-6596/261/1/012002.
- Grzelak, A., Rychlik, B., & Bartosz, G. (2001). Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(12), 1418–1425.
- Guffey, J. S., & Wilborn, J. (2006). In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. *Photomedicine and Laser Surgery*, *24*(6), 684–688.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastañaduy, P. A., Vinjé, J., et al. (2013). Norovirus disease in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(8), 1198–1205.
- Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*, *3*(5), 436–450.
- Holmdahl, T., Walder, M., Uzcátegui, N., Odenholt, I., Lanbeck, P., Medstrand, P., et al. (2016). Hydrogen peroxide vapor decontamination in a patient room using feline calicivirus and murine norovirus as surrogate markers for human norovirus. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *37*(5), 561–566.
- Hudson, J. B., Sharma, M., & Petric, M. (2007). Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *Journal of Hospital Infection*, *66*(1), 40–45.
- Jarrett, O., Laird, H. M., & Hay, D. (1973). Determinants of the host range of feline leukemia viruses. *Journal of General Virology*, *20*(2), 169–175.
- Kniel, K. E. (2014). The makings of a good human norovirus surrogate. *Current Opinion in Virology*, *4*, 85–90.
- Maclean, M., Booth, M. G., Anderson, J. G., MacGregor, S. J., Woolsey, G. A., Coia, J. E., et al. (2013a). Continuous decontamination of an intensive care isolation room during patient occupancy using 405 nm light technology. *Journal of Infection Prevention*, *14*(5), 176–181.
- Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., & Woolsey, G. A. (2008). The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, *92*(3), 180–184.
- Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., & Woolsey, G. (2009). Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(7), 1932–1937.
- Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Woolsey, G. A., Coia, J. E., Hamilton, K., et al. (2010). Environmental decontamination of a hospital isolation room using high-intensity narrow spectrum light. *Journal of Hospital Infection*, *76*(3), 247–251.
- Maclean, M., McKenzie, K., Anderson, J. G., Gettinby, G., & MacGregor, S. J. (2014). 405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control. *Journal of Hospital Infection*, *88*(1), 1–11.
- Maclean, M., McKenzie, K., Moorhead, S., Tomb, R. M., Coia, J. E., MacGregor, S. J., et al. (2015). Decontamination of the hospital environment: New technologies for infection control. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, *7*(1), 39–51.
- Maclean, M., Murdoch, L. E., MacGregor, S. J., & Anderson, J. A. (2013b). Sporicidal effects of high-intensity 405 nm visible light on endospore-forming bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, *89*(1), 120–126.
- Margomenou, L., Birkmyre, L., Piggott, J. R., & Paterson, A. (2000). Optimisation and validation of the “Strathclyde simulated mouth” for beverage flavour research. *Journal of the Institute of Brewing*, *106*(2), 101–106.
- Murdoch, L. E., Maclean, M., Endarko, E., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2012). Bactericidal effects of 405 nm light exposure demonstrated by inactivation of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Mycobacterium* species in liquid suspensions and on exposed surfaces. *Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/137805.
- Murdoch, L. E., McKenzie, K., Maclean, M., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2013). Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger*. *Fungal Biology*, *117*(7–8), 519–527.
- Nuanalsuwan, S., Mariam, T., Himathongkham, S., & Cliver, D. O. (2002). Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. *Photochemistry and Photobiology*, *76*(4), 406–410.
- Ormerod, E., & Jarrett, O. (1978). A classification of feline calicivirus isolates based on plaque morphology. *Journal of General Virology*, *39*(3), 537–540.
- Otter, J. A., Yezli, S., Perl, T. M., Barbut, F., & French, G. L. (2013). The role of ‘no-touch’ automated room disinfection systems in infection prevention and control. *Journal of Hospital Infection*, *83*(1), 1–13.
- Richards, G. P. (2012). Critical review of norovirus surrogates in food safety research: Rationale for considering volunteer studies. *Food and Environmental Virology*, *4*(1), 6–13.
- Richardson, T. B., & Porter, C. D. (2005). Inactivation of murine leukaemia virus by exposure to visible light. *Virology*, *341*(2), 321–329.
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(1), 134–164.
- Tomb, R. M., Maclean, M., Herron, P. R., Hoskisson, P. A., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2014). Inactivation of Streptomyces phage λ C31 by 405 nm light: Requirement for exogenous photosensitizers? *Bacteriophage*, *4*, e32129. doi:10.4161/bact.32129.
- Wu, H. M., Fornek, M., Schwab, K. J., Chapin, A. R., Gibson, K., Schwab, E., et al. (2005). A norovirus outbreak at a long-term-care facility: The role of environmental surface contamination. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *26*(10), 802–810.
- Zonta, W., Mauroy, A., Farnir, F., & Thiry, E. (2016). Comparative virucidal efficacy of seven disinfectants against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, surrogates of human Norovirus. *Food and Environmental Virology*, *8*(1), 1–12.