

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Zjonizowane powietrze wpływa na infekcyjność wirusa grypy i zapobiega jego przenoszeniu drogą powietrzną

Marie Hagbom^{1*}, Johan Nordgren^{1*}, Rolf Nybom², Kjell-Olof Hedlund³, Hans Wigzell² & Lennart Svensson¹

otrzymano: 27 listopada 2014
przyjęto: 13 maja 2015
Opublikowano: 23 czerwca 2015

Przy pomocy zmodyfikowanego jonizatora opisaliśmy efektywną metodę zapobiegania infekcji wirusa grypy A (szczep Panama 99; przenoszony drogą powietrzną) u zwierząt oraz inaktywację wirusa (>97%). Aktywny jonizator zapobiegł 100% (4/4) infekcji u świnek morskich. Ponadto, urządzenie efektywnie pochłaniało przenoszone drogą powietrzną kalyciwirusy, rotawirusy oraz wirusy grypy przy stopniu [recovery rates] równym 21% po 40 minutach w pomieszczeniu o objętości 19 m³. Jonizator generuje jony ujemne, w ten sposób nadaje ujemny ładunek cząsteczkom znajdującym się w powietrzu / kropelkom aerozolu i przyciąga je elektrostatycznie do dodatnio naładowanej płytki pochłaniającej. Uwięzione wirusy są następnie identyfikowane przy pomocy metody qPCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym. Urządzenie to zapewnia unikalne możliwości szybkiego i prostego usuwania wirusów z powietrza, a także jednoczesnej identyfikacji i zapobiegania przenoszeniu wirusów drogą powietrzną.

Istnieje zapotrzebowanie na proste, przenośne i czułe urządzenie do ewakuacji, eliminacji oraz identyfikacji wirusów z powietrza, w celu szybkiego wykrywania oraz zapobiegania wybuchom infekcji oraz rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych.¹ Każdego roku choroby zakaźne powodują miliony zgonów na całym świecie. Wiele spośród najczęściej występujących patogenów rozprzestrzenia się drogą kropelkową lub przez aerozole (kaszel, kichanie, wymioty itp).²⁻⁵ Wiedza na temat mechanizmów rozprzestrzeniania się drogą kropelkową jest dla większości patogenów ograniczona, mimo że dla wielu z nich (w tym również wirusów) jest to ważna droga rozprzestrzeniania się.⁶

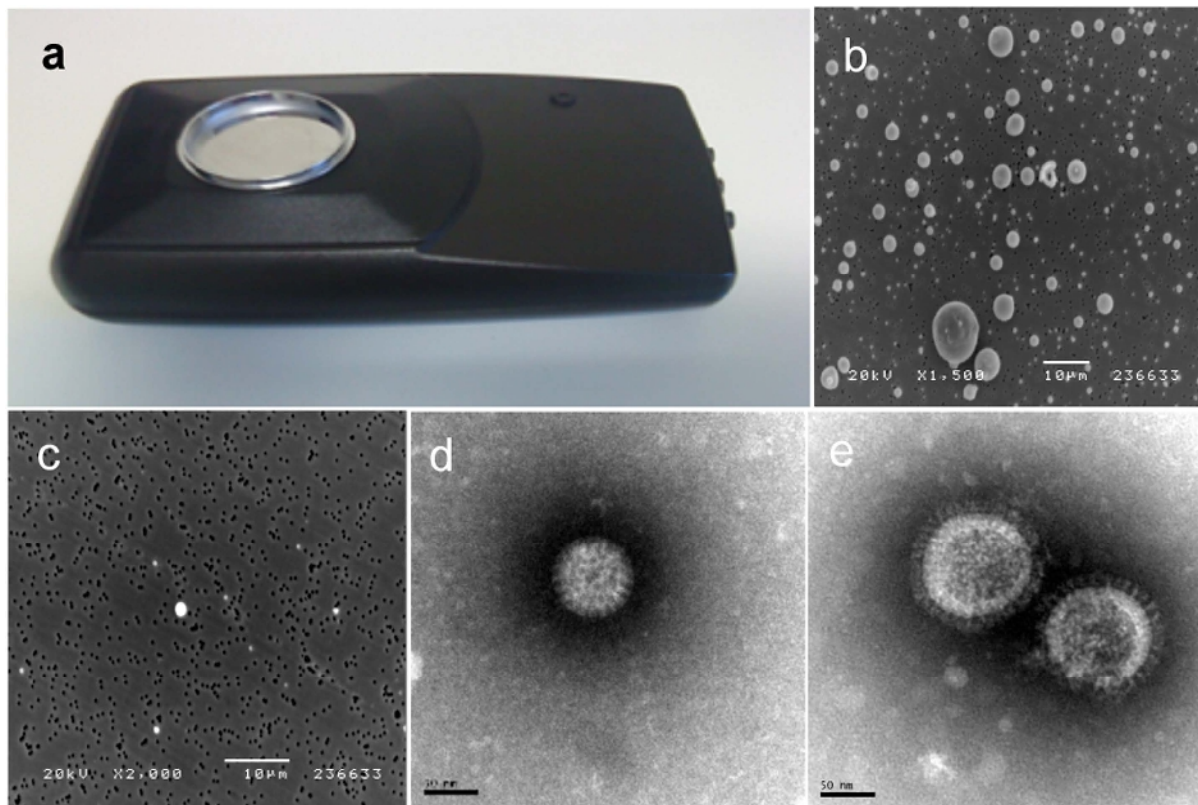
Obecnie nie istnieje żadna prosta i sprawdzona technologia umożliwiająca łatwą ewakuację wirusów z powietrza oraz ich identyfikację. Problemu nie stanowi technologia analizy - metody, takie jak PCR w czasie rzeczywistym zapewniają wysoką czułość wykrywania większości patogenów.⁷⁻⁹ Komplikacje pojawiają się na etapie opracowania efektywnej metody próbkowania małych cząsteczek powietrznych (w tym wirusów) z dużych objętości powietrza. Ponadto, metoda próbkowania powinna być solidna i prosta w obsłudze, dzięki czemu możliwe będzie jej wykorzystywanie w różnego rodzaju otoczeniach. Obecnie, najczęściej stosowane metody ewakuacji patogenów z powietrza są oparte na modelu przepływu powietrza i modelu cieczy.¹⁰⁻¹⁵ Urządzenia te są skomplikowane, a ich efektywność nie została dokładnie oceniona.

Największe znaczenie ma rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych w szpitalach.¹⁶⁻¹⁸ Niekiedy pojawia się zapotrzebowanie na oczyszczenie otoczenia z patogenów i innych cząsteczek - np. na salach operacyjnych oraz w miejscach przebywania pacjentów immunosupresyjnych i pacjentów z poważnymi alergiami. Pojawia się wówczas zapotrzebowanie nie tylko na próbkowanie i identyfikację¹⁹, ale również eliminację wirusów i innych patogenów z powietrza.²⁰ Wykazano, że ozon dezaktywuje norowirusy i może być stosowany do dekontaminacji powierzchni w pustych pomieszczeniach, jednak ze względu na jego toksyczność, nie należy go stosować w otoczeniu, w którym znajdują się pacjenci.²¹ Generowanie anionów dowiodło swojej skuteczności w redukcji przenoszenia wirusa choroby Newcastle^{22,23} oraz kilku rodzajów bakterii^{24,25} w otoczeniach eksperymentalnych.

Jonizator wykorzystany w tym badaniu jest zasilany prądem 12 V i generuje ujemną jonizację w polu elektrycznym, które koliduje i łączy cząsteczki aerozolu.

¹ Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Linköping, 581 85 Linköping, Sweden. ²Department of Microbiology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. ³Department of Diagnostics and Vaccine, Swedish Institute for Communicable disease Control, Stockholm, Sweden.

* Wymienieni autorzy mieli równy wkład w tę pracę. W celach korespondencyjnych oraz w celu uzyskania materiałów proszę kontaktować się z L.S. (email: lennart.t.svensson@liu.se)



Ilustracja 1. Jonizator Airpoint z płytką pochłaniającą (rozmiar 13 x 35 cm) (a). Jonizator został wyprodukowany w oparciu o technologię jonizacji przepływową (Ion-Flow Ionizing Technology) opracowaną w Szwecji (LightAir AB, Solna, Sweden) i został zmodyfikowany poprzez zainstalowanie plastikowej nasadki z dodatkowo naładowaną powierzchnią przewodzącą o średnicy 47 mm, w charakterze płytki pochłaniającej; Rozpylone wcześniej i przechwycone cząsteczki lateksu (>1 do <10 μm) na aktywnym (b) i nieaktywnym (c) jonizatorze (pasek skali = 10 μm); Rotawirus (d); oraz wirus grypy (H1N1; szczep Salomon Island) (e) uwięzione na aktywnym jonizatorze, (Pasek na skali = 50 nm).

Są one następnie przyciągane przez dodatnio naładowaną płytkę pochłaniającą. Z przyczyn bezpieczeństwa płytka pochłaniająca posiada bardzo niskie natężenie (poniżej 80 μA), natomiast jonizator dysponuje napięciem ponad 200,000 eV, co umożliwi wytwarzanie kilku miliardów elektronów na sekundę. Ponadto, urządzenie to nie wytwarza ozonu na wykrywalnym poziomie, dlatego może być bezpiecznie stosowane we wszystkich otoczeniach.

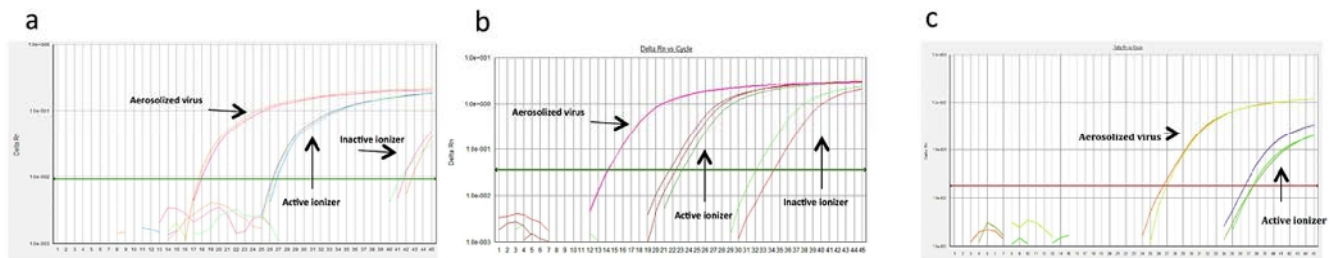
Technika ta jest znana ze swojej skuteczności w efektywnym pozyskiwaniu i eliminacji alergenów z powietrza.²⁶ Rozpylone cząsteczki rotawirusów, kaliciwirusów oraz wirusów grypy wystawione na działanie jonizatora są przyciągane do płytki pochłaniającej, a następnie identyfikowane przez mikroskop elektronowy i metodę qPCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym. Co najważniejsze, przedstawiliśmy, że technologia ta może być stosowana do zapobiegania infekcjom wirusa grypy na drodze kropelkowej.

Wyniki

Wizualizacja i skuteczność próbkowania aerozolu określone przez mikroskopię elektronową. W celu opracowania i walidacji techniki jonizacji do pobierania oraz identyfikacji patogenów wirusowych, wykorzystaliśmy kilka typów wirusów o dużym znaczeniu klinicznym: kaliciwirusy, rotawirusy oraz wirusy grypy (H3N2, szczep Salomon Island), a także cząsteczki lateksu. Kaliciwirus psi (CaCV, szczep 48) został wykorzystany jako surogat²⁷ dla ludzkiego norowirusa, stanowiącego przyczynę tzw. zimowej choroby żołądka, powodującego wybuchy epidemii o dużym znaczeniu klinicznym i ekonomicznym²⁸. Rotawirus Rhesus został wykorzystany jako marker-surogat dla ludzkiego rotawirusa.²⁹

Urządzenie (ilustracja 1a) składa się z małego jonizatora (zasilanie 12 V) z przymocowaną do niego dodatkowo naładowaną płytkę pochłaniającą, która przyciąga ujemnie naładowane cząsteczki (oddziaływanie elektrostatyczne). Aby określić optymalne parametry przyciągania cząsteczek, w pomieszczeniu o objętości 19 m^3 rozpylono cząsteczki lateksu o rozmiarze <1 do >10 μm .

Testy wykazały, że do usunięcia >90% wolnych cząsteczek lateksu w powietrzu potrzeba 40-60 minut (zliczanie cząsteczek w czasie rzeczywistym - PortaCount Plus). Urządzenie do zliczania cząsteczek wykrywa cząsteczki o rozmiarze powyżej 0,02 μm . Wizualizacja ze skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM) na siatkach z aktywnych i nieaktywnych płytek pochłaniających jonizatora wykazała, że przyciąganie cząsteczek lateksu było istotnie większe na płytkach aktywnych w porównaniu do płytek nieaktywnych (ilustracja 1b, c). Następnie, w tym samym warunkach rozpylono dużą ilość rotawirusów i wirusów grypy inaktywowanych formaliną.



Ilustracja 2. PCR w czasie rzeczywistym na uwieczonych rotawirusach (a), kaliciwirusach (b) oraz wirusie grypy (H1N1, szczep Salomon Island) (c). Należy zwrócić uwagę, że w jonizatorze nieaktywnym nie wykryto wirusa grypy.

Ilość znebulizowanego wirusa (geny / reakcja PCR)	Ilość wirusa na płytce Aktywna (geny / reakcja PCR) \pm SE	Ilość wirusa na płytce Nieaktywna (geny / reakcja PCR)	Recovery (%) Aktywna	Recovery (%) Nieaktywna	Stosunek (%) (Aktywna / nieaktywna)
CaCV					
1.88×10^7	$1.13 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$	73	0.63%	0.00039%	1620
1.99×10^6	$7.36 \times 10^3 \pm 2.16 \times 10^3$	~5	0.37%	~0.00024%	~1520
9.93×10^5	$1.66 \times 10^3 \pm 4.63 \times 10^2$	nie wykryto	0.17%	NA	NA
2.20×10^5	8.11×10^{2a}	nie wykryto	0.37%	NA	NA
1.56×10^4	$1.65 \times 10^3 \pm 9.67 \times 10^2$	nie wykryto	10.60%	NA	NA
1.87×10^3	$3.86 \times 10^2 \pm 1.27 \times 10^2$	nie wykryto	21%	NA	NA
RRV					
2.23×10^6	$7.54 \times 10^3 \pm 6.74 \times 10^2$	~2-3	0.34%	~0.00011%	~3000
4.85×10^5	$6.40 \times 10^2 \pm 86$	nie wykryto	0.13%	NA	NA
9.13×10^4	41 ± 21	nie wykryto	0.05%	NA	NA
Wirus grypy					
4.30×10^6	$3.33 \times 10^3 \pm 7.22 \times 10^2$	nie wykryto	0.08%	NA	NA

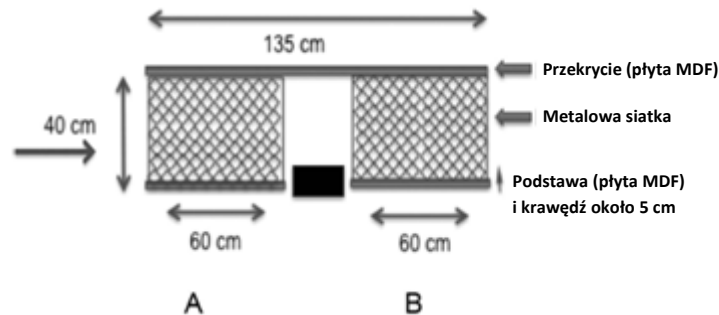
Tabela 1. Skuteczność pozyskiwania CaCV, rotawirusów Rhesus (RRV) oraz wirusa grypy A w formie aerozolu w różnych stężeniach, określona przez PCR w czasie rzeczywistym. a) Badanie to zostało przeprowadzone tylko raz.

Podczas gdy po 40 minutach nieaktywne płytki pochłaniające zawierały niewiele (<5) rotawirusów i wirusów grypy, aktywne płytki pochłaniające zawierały >50 cząsteczek wirusów, co zostało ustalone przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) (ilustracja 1 d, e).

Zjonizowane powietrze i siły elektrostatyczne powodują przyciąganie rozprzestrzenionych drogą kropelkową wirusów, co zostało określone przy pomocy qPCR w czasie rzeczywistym. Następnie określiliśmy zdolność technologii qPCR w czasie rzeczywistym do ilościowej oceny pochłaniania i koncentracji wirusów przez jonizator. Przeprowadzono trzy niezależne badania z każdym spośród trzech wirusów. W każdym badaniu zastosowano takie samo stężenie wirusów (ilustracja 2a-c). Mimo że proces pochłaniania i identyfikacji składa się z kilku kroków, system wykazywał solidność pod kątem odtwarzalności. Dane z qPCR w czasie rzeczywistym wykazały, że aktywny element pochłaniający koncentruje i pozyskuje wirusy 1500-3000 razy bardziej efektywnie niż element pochłaniający nieaktywny (tabela 1). Kiedy zastosowano inne rozcieńczenia wirusów w rozpylonej mieszance aerozolowej, proporcje zebranych wirusów na aktywnym elemencie pochłaniającym były w zakresie od 0,1 do 0,6% dla CaCV, rotawirusa oraz wirusa grypy. A reproducible finding with regard to CaCV was a significant increase in relative recovery at the lowest concentrations increasing to 10–20% of the total amount of virus aerosolized (Table 1).

	Stosunek infekcyjnych cząsteczek wirusa do genów wirusa na reakcję PCR, na podstawie qPCR w czasie rzeczywistym.					
	Ekspozycja na naładowany element pochłaniający	Ekspozycja na nienaładowany element pochłaniający	Redukcja infekcyjności	Rozpylony wirus	Pozyskany rozpylony wirus	Redukcja infekcyjności
CaCV	0.74×10^{-4}	1.24×10^{-4}	40.1%	2.96×10^{-2}	$<7.83 \times 10^{-4a}$	$>97.4\%a$
RRV	brak danych	brak danych	brak danych	4.86×10^{-1}	$<7.66 \times 10^{-3a}$	$>98.4\%a$

Tabela 2. Redukcja infekcyjności kaliciwirusa psiego (CaCV) i rotawirusa Rhesus (RRV). ^a Pod progiem wykrywania (1- PFU/ml) w badaniu infekcyjności.



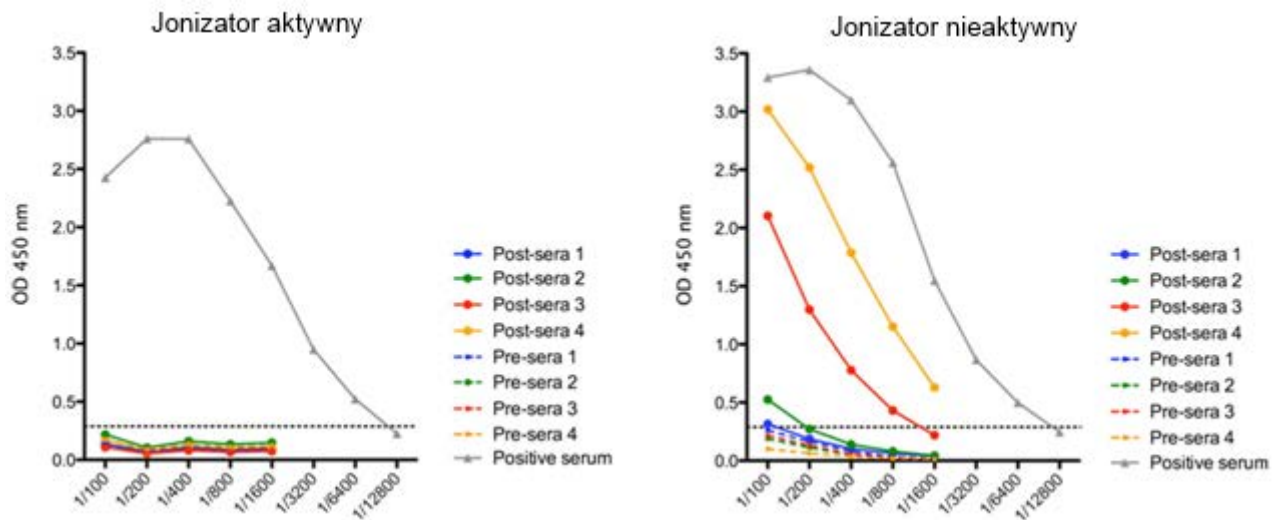
Ilustracja 3. Układ elementów w badaniu przenoszenia wirusa grypy (H3N2, Pan/99) drogą kropelkową pomiędzy świnkami morskimi. Świnki morskie ($n = 4$) zostały wewnątrznosowo zainfekowane dawką 5×10^3 PFU wirusa Pan/99 w objętości 100 μ l (50 ml do każdego nozdrza). Wszystkie 4 zainfekowane zwierzęta zostały umieszczone w klatce eksperymentalnej "A". 30 godzin po zakażeniu 4 niezakażone świnki morskie zostały umieszczone w klatce "B". Przepływ powietrza ze strony lewej do prawej. Powietrze było wymieniane 17 razy dziennie. Wypełniony prostokąt = jonizator.

Zjonizowane powietrze redukuje infekcyjność kaliciwirusów i rotawirusów. Następnie określiliśmy, czy zebrane wirusy utrzymały swoją infekcyjność po wystawieniu na działanie anionów lub po wystawieniu na działanie dodatnio naładowanej płytki pochłaniającej. Rozpylono, a następnie w ciągu 40 minut zebrano do aktywnej płytki pochłaniającej (zawierającej 1 mL pożywki Eagles MEM) 5 ml pożywki Eagles Minimal Essential Media (Eagles MEM) zawierającej 1×10^6 PFU rotawirusa (CaCV). Wirusy CaCV w pożywce hodowlanej zostały również wystawione bezpośrednio na aktywną i nieaktywną płytkę pochłaniającą (bez rozpylania). Infekcyjność wirusów została zasadniczo określona i opisana³⁰. Porównano stosunek pomiędzy liczbą kopii genomu wirusów oraz infekcyjnością u wirusów rozpylonych, wirusów bezpośrednio wystawionych na działanie płytki pochłaniającej aktywnej i nieaktywnej oraz inwentarzem wirusów. Wirus CaCV wystawiony na działanie aktywnej płytki pochłaniającej (bez rozpylania) wykazał niewielką redukcję infekcyjności ($\sim 40\%$) w porównaniu do wirusa, który został uwięziony na nieaktywnej płytce pochłaniającej (tabela 2). Z kolei infekcyjność wirusa rozpylonego została zredukowana aż o $>97\%$, co wskazuje, że to jonizacja aerozolu, a nie wystawienie na działanie dodatnio naładowanej płytki pochłaniającej odpowiada w największym stopniu za redukcję infekcyjności.

Dalsze próby podtrzymały hipotezę, że to jonizacja odpowiada za redukcję infekcyjności wirusów - przeprowadzono nebulizację rotawirusa bez jonizacji i umożliwiono uwięzienie go na nieaktywnej płytce pochłaniającej. Płytki pochłaniające rozmieszczono w odległości 30 cm od nebulizatora. Ustalono, że stosunek kopii genomu do infekcyjności pozostał niezmienny względem inwentarza początkowego wirusów, co sugeruje, że inaktywacja wirusów jest związana z jonizacją powietrza.

Jonizacja powietrza i siły elektrostatyczne zapobiegają infekcjom wirusa grypy (A/Panama) drogą powietrzną u świnek morskich.

Następnie wykorzystaliśmy model ze świnką morską³¹⁻³³ do zbadania, czy zjonizowane powietrze i siły elektrostatyczne mogą zapobiegać grypie (wirus A/Panama (Pan/99)) przenoszonej drogą kropelkową pomiędzy świnkami morskimi. Powietrzny / kropelkowy model przenoszenia³¹ opiera się na dwóch oddzielnych klatkach z jonizatorem umieszczonym pomiędzy nimi (ilustracja 3). Cztery świnki morskie zostały zainfekowane drogą wewnątrznosową dawką 5×10^3 PFU szczepu Pan/9931 i umieszczone w klatce "A" (ilustracja 3). 30 godzin po infekcji (h p.i.) 4 niezakażone świnki morskie zostały umieszczone w klatce "B", w odległości 15 cm od zakażonych zwierząt (ilustracja 3), bez kontaktu fizycznego. Jonizator został umieszczony pomiędzy klatkami "A" i "B". Przeprowadzono dwie identyczne próby, jedna z aktywnym jonizatorem umieszczonym pomiędzy klatkami i jedna z jonizatorem nieaktywnym.



Ilustracja 4. Aktywny jonizator zapobiega infekcjom wirusa grypy (H3N2, Pan/99) przenoszonym drogą kropelkową u świnek morskich. Podczas gdy aktywny jonizator zapobiegł wystąpieniu reakcji immunologicznej na wirusa grypy u 4 z 4 świnek morskich wystawionych na jego działanie, w przypadku stosowania jonizatora nieaktywnego doszło do infekcji u 3 z 4 zwierząt. Wykres pokazuje miana przeciwciał (test ELISA) przed infekcją (przed podaniem surowicy 1,2,3 oraz 4) oraz w dniu 21 po ekspozycji na wirusa grypy (po podaniu surowicy 1,2,3 oraz 4). W skrócie, wirus grypy H1N1; (SBL Influenza Vaccine, Sanofi Pasteur, Lyon, France) został naniesiony na płytki ELISA i był inkubowany z dwukrotnie rozcieńczoną surowicą świnek morskich (pre i post) followed by biotynylated rabbit-anti-guinea pig antibody, HRP conjugated streptavidin and TMB substrate as described in Methods. Za wartość odcięcia (linia kreskowana) (0.284 OD) przyjęto wartość średnią w grupie kontrolnej negatywnej +2SD.

Niezakażone zwierzęta w klatce "B" zostały wystawione na 24 godziny na przepływ powietrza z klatki "A", w której znajdowały się 4 zakażone świnki morskie, a następnie zostały one umieszczone w oddzielnie wentylowanych klatkach na kolejne 21 dni, aby zapewnić, że jedynym przedziałem czasowym, w którym mogło dojść do infekcji były 24 godziny ekspozycji na powietrze z klatki "A" z zakażonymi zwierzętami. qPCR w czasie rzeczywistym na podstawie biopsji z płuc i tchawicy z 54 godziny po zakażeniu (od zwierząt zakażonych wewnątrznosowo) wykazała, że 3 z 4 świnek morskich w obu badaniach zaraziło się wirusem grypy.

Oceniliśmy przenoszenie infekcji od zwierząt w klatce "A" do zwierząt w klatce "B" na podstawie wystąpienia reakcji immunologicznej 21 dni po ekspozycji. Wyniki przedstawione na ilustracji 4 wskazują, że gdy jonizator był nieaktywny, 3 z 4 niezainfekowanych i narażonych zwierząt rozwinęło reakcję immunologiczną specyficzną dla grypy (z przeciwciałami IgG). Kiedy jonizator był natomiast aktywny, żadne z 4 zwierząt w klatce "B" nie rozwinęło odpowiedzi immunologicznej na wirusa grypy (ilustracja 4). Ponadto, RNA wirusa grypy było wykrywane przez PCR w czasie rzeczywistym (choć tylko w niewielkich stężeniach) na płycie pochłaniającej aktywnej jonizatora, a nie było to możliwe w przypadku jonizatora nieaktywnego, co wskazuje, że jonizator rzeczywiście pochłaniał wirusy wydalone przez zakażone zwierzęta w klatce "A".

Dyskusja

Opisaliśmy prosty jonizator zasilany prądem 12V, który może zapobiec rozprzestrzenieniu się infekcji wirusowych pomiędzy zwierzętami drogą powietrzną w otoczeniu kontrolowanym, przy jednoczesnym pochłanianiu i szybkiej identyfikacji wirusów. W połączeniu z qPCR w czasie rzeczywistym, metoda próbkowania umożliwia szybkie wykrywanie i zliczanie pewnych wirusów o dużym znaczeniu klinicznym dla ludzi (np. wirus grypy, rotawirusy, kalciwirusy). Urządzenie składa się z niewielkiego przenośnego jonizatora, do którego przymocowany jest naładowany dodatnio element próbkujący, który przyciąga ujemnie naładowane cząsteczki z powietrza. Opisywany tu nowoczesny jonizator posiada zalety, takie jak prosta obsługa, wysoka trwałość oraz szerokie zastosowanie z różnymi patogenami przenoszonymi drogą powietrzną.

Obserwacja istotnie większej ilości cząsteczek rotawirusów CaCV wykrytych na jonizatorze aktywnym w porównaniu do jonizatora nieaktywnego (ok. 1500-3000 razy więcej), prowadzi do wniosku, że metoda ta może aktywnie i wydajnie pochłaniać cząsteczki wirusów z powietrza. W podobny sposób wizualizacja SEM cząsteczek lateksu ujawniła, że na elemencie aktywnym zbierały się cząsteczki lateksu wszystkich rozmiarów. Należy zwrócić uwagę, że zaobserwowano pochłanianie cząsteczek w bardzo szerokim zakresie rozmiaru (35 nm do 10 μ m), co również sugeruje szerokie spektrum zastosowania tej technologii. Jednakże, zbyt duże cząsteczki mogą spowodować redukcję pochłaniania (recovery), gdyż pozostają one w powietrzu krócej.^{33,34}

Co ciekawe, gdy rozpyliliśmy niewielkie ilości CaCV (1.56 x 10⁴ kopii genu i 1.87 x 10³ kopii genu) zaobserwowaliśmy pochłanianie rzędu odpowiednio 10.6 i 21%. Istotnie wyższa wydajność przy mniejszej dystrybucji wirusów w powietrzu może być związana z mniejszą agregacją wirusów z innymi wirusami lub z ich cząsteczkami (pozostałościami), które dłużej pozostają w powietrzu, przez co element pochłaniający wywiera silniejsze działanie elektrostatyczne.

Ponadto, prawdopodobne jest, że wiele cząsteczek trafi na ściany płytki pochłaniającej lub obszary sąsiadujące z płytką pochłaniającą na jonizatorze. Cząsteczki te nie zostaną zliczone przez PCR w czasie rzeczywistym, przez co siły elektrostatyczne mogą zostać niedoszacowane. W przypadku rozpylenia wirusów w większym stężeniu, zjawisko to może doprowadzić do niedoszacowania [recovery]. Wykorzystując CaCV, rotawirusy i wirusy grypy przeprowadziliśmy 3 niezależne badania dla każdego stężenia rozpylonego wirusa, w celu oceny odporności (rzetelności) oznaczania na wszystkich jego etapach (pochłanianie z aktywnym jonizatorem, ekstrakcja RNA, synteza cDNA i PCR w czasie rzeczywistym). Pomimo obecności kilku kroków od pozyskania do identyfikacji, metoda oznaczania okazała się być bardzo odporna (rzetelna), ponieważ minimalna i maksymalna ilość wirusów z każdego niezależnego pomiaru była zawsze w zakresie 1 log (ilustracja 2).

Zagadnienie dezaktywacji wirusów przez siły elektrostatyczne nie zostało dotąd dokładnie zbadane.³⁵ W naszym badaniu rotawirus i CaCV utraciły infekcyjność w stopniu istotnym (>97%) - CaCV z 3.0×10^{-2} do $<7.8 \times 10^{-4}$, a rotawirus 4.9×10^{-1} do $<7.6 \times 10^{-3}$ w zjonizowanym powietrzu, co zostało określone w stosunku infekcyjności do kopii genów. Mechanizm inaktywacji nie został w tym badaniu dokładnie opisany, ale może on obejmować formy reaktywne lub zwiększenie ładunku białek, co może powodować opisaną wcześniej dezaktywację wirusa.^{36,37} Redukcja infekcyjności była tłumaczona reaktywnymi formami tlenu i działaniem ozonu, poprzez reakcje peroksydacji lipidów i białek, które mogą powodować uszkodzenie i niszczenie otoczki lipidowej oraz kapsydu białkowego.³⁶ W szczególności, peroksydacja białek może odgrywać kluczową rolę w inaktywacji wirusów bez otoczki, takich jak adenowirus, poliowirus i inne enterowirusy (rotawirusy i kaliciowirusy). Sądzi się, że wirusy posiadające otoczkę tracą infekcyjność na skutek peroksydacji lipidów. Jednakże, cytotoxiczność ozonu stanowi największą przeszkodę w jego klinicznym zastosowaniu. Wykazano, że zwiększanie stężenia jonów w powietrzu skutecznie chroni kurczaki przed śmiertelną chorobą Newcastle przenoszoną drogą powietrzną.²³ Dokładny mechanizm inaktywacji wirusów przez aniony nie został jak dotąd poznany i wymaga dalszych badań. Jednakże, w badaniu z wykorzystaniem generowania jonów ujemnych i dodatnich, wirus grypy został zdezaktywowany pomimo pomijalnego poziomu ozonu (0,005 ppm lub mniej).³⁷

Nasze urządzenie emitowało ozon w stałym stężeniu, poniżej progu wykrywania (0,002 ppm; według badania VTT (Technical Research Center of Finland, Tampere w Finlandii i Air Resources Board w USA), dlatego nie można tu brać pod uwagę ozonu, jako czynnika wpływającego na dezaktywację wirusów. Generowane mogą być również rodniki reaktywne, takie jak O^2 , które mogą z kolei przyczyniać się do dezaktywacji poprzez uszkodzenie białkowej lub nukleinowej struktury wirusów.³⁷ Ponieważ infekcyjność nie ulegała redukcji po nebulizacji wirusa w powietrzu bez jonizacji i ulegała redukcji tylko w niewielkim stopniu po bezpośrednim zastosowaniu na dodatnio naładowaną płytkę pochłaniającą, zdaje się, że największy udział w redukcji infekcyjności posiada wzrost elektroujemności, co przypuszczalnie zmienia punkt izoelektryczny, a co się z tym wiąże, wywiera zmiany strukturalne w obrębie kapsydu. Ponieważ dwa badane wirusy nie posiadają otoczki lipidowej, modyfikacja lipidowa może zostać wykluczona.

Co ciekawe i bardzo ważne z punktu widzenia klinicznego w tym badaniu, okazało się, że jonizator mógł wykryć i zapobiec infekcji wirusem grypy w otoczeniu kontrolowanym, naśladującym warunki naturalne. W naszym protokole infekcji drogą wewnątrznosową (opisany powyżej^{31,33}) wykorzystaliśmy świnki morskie (Hartley) i 5×10^3 PFU wirusa grypy Pan/99. Ponieważ świnki morskie szczepu Hartley są bardzo podatne na wirusa ludzkiej grypy A szczepu Pan/99 (H3N2), dawka infekcyjna (ID50) 5 PFU31 zdaje się być najbardziej odpowiednia na potrzeby tego badania. Ponadto, Lowen wraz ze współpracownikami wykazał 100% przenoszenie wirusa Pan/99 na świnki morskie drogą kropelkową.^{38,39} Wcześniejsze badania również pokazały, że zastosowana dawka infekcyjna wywołała szczyt rozwoju wirusów w okolicy 3 dnia po infekcji zarówno w drogach nosowych, jak i płucach modelu zwierzęcego³¹ - był to czas, gdy niezaszczepione zwierzęta w naszym badaniu zostały wystawione na powietrze od zwierząt zainfekowanych.

Oceniając rozwój reakcji immunologicznej ustaliliśmy, że 3 z 4 niezakażonych świnek morskich zostało zakażonych po wystawieniu na kontakt ze zwierzętami zaszczepionymi dawką 5×10^3 PFU szczepu Pan/99. Podobne rezultaty uzyskał Mubarek wraz ze współpracownikami³³ - 2 z 3 świnek morskich zostało zakażonych po krótkotrwałym narażeniu drogą kropelkową przy dawce 103 PFU, podczas gdy przy dawce infekcyjnej 106 PFU zakażone zostały 3 zwierzęta. Zbadaliśmy reakcję immunologiczną 21 dnia po infekcji, czyli w czasie, w którym Lowen ze współpracownikami⁴⁰ odkrył, że świnki morskie zakażone wirusem Pan/99 w sposób naturalny wykształciły istotną reakcję immunologiczną.

Wirus grypy przenosi się przez bezpośredni kontakt z osobami zarażonymi, ekspozycję na obiekty zakażone wirusem (nośniki zakażenia) oraz inhalację zakażonych mieszanin gazowych. Wcześniejsze badania z modelem zwierzęcym świnki morskiej wykazały, że to aerozole, a nie nośniki zakażenia stanowią zasadniczą drogę przenoszenia wirusa Pan/99 pomiędzy świnkami morskimi.³³ Wirusy uwolnione z aerozolami z zaszczepionych zwierząt były wykrywane na aktywnej płytce pochłaniającej przez qPCR w czasie rzeczywistym, chociaż z bardzo niskimi wartościami kopii genów. Wykorzystując świnki morskie jako model gospodarza, Lowen i współpracownicy³⁸ wykazali, że przenoszenie wirusów grypy drogą kropelkową jest zależne od wilgotności względnej i temperatury. Badacze ustalili, że niska wilgotność względna (20-30%) i temperatura równa 5°C była najbardziej sprzyjająca, natomiast przy 30°C nie odnotowano przenoszenia. W naszym modelu temperatura wynosiła 20-21°C, a wilgotność względna 35 - 36,2%.

Opisywany jonizator w połączeniu z funkcją oznaczania (qPCR w czasie rzeczywistym) posiada oczywisty potencjał diagnostyczny. Łatwa obsługa, niska cena, brak wytwarzania ozonu, solidność, wysoka wydajność oraz zasilanie niskim napięciem (12 V) umożliwiają wykorzystanie urządzenia na wysoką skalę. Dzięki naszemu urządzeniu, miejsca narażone na rozprzestrzenianie infekcji (samoloty, szpitalne, placówki opieki, środowisko szkolne i inne miejsca publiczne) mogą być monitorowane i kontrolowane poprzez pobieranie i analizę wirusów oraz innych patogenów przenoszonych drogą powietrzną na płytkę pochłaniającą.

Urządzenie posiada również potencjał w zapobieganiu przenoszenia infekcji, chociaż zagadnienie to należy dokładniej zbadać w docelowym otoczeniu jego pracy. Uważamy, że ta innowacyjna technologia posiada duży potencjał do pochłaniania i identyfikacji wirusów z powietrza.

Metody

Projekt badania. Pomieszczenie, w którym odbywały się badania posiadało uziemione metalowe ściany. Objętość pomieszczenia wynosiła 19 m³ (Szer. 250 x Dł. 330 x Wys. 235 cm). W pomieszczeniu umieszczono jeden aktywny i jeden nieaktywny jonizator, zaprojektowane do pochłaniania i analizy cząsteczek z powietrza. Oba urządzenia zostały umieszczone w równej odległości od nebulizatora (215 cm; Aiolos Albatross, Aiolos, Szwecja). Odległość pomiędzy jonizatorami wynosiła 64 cm. Urządzenie do zliczania cząsteczek (PortaCount Plus, TSI Incorporated, USA) było używane przed badaniem i podczas badania. Przed rozpoczęciem badania wykorzystano jonizator aktywny do oczyszczenia pomieszczenia z cząsteczek. Płytkę pochłaniającą została usunięta i wymieniona na nową przed rozpoczęciem badania. Badania były kontynuowane dopóki liczba cząsteczek nie osiągnęła poziomu podstawowego (zwykle w ciągu 40 minut). Przed każdym badaniem z rozpyleniem aerozolu mierzono wilgotność i temperaturę.

Technologia i urządzenie Jonizator wykorzystywany w tym badaniu został opracowany w oparciu o technologię przepływu jonów firmy LightAir AB (Solna, Sweden; www.lightair.com) i został zmodyfikowany do celów tego badania przez Wydział Mikrobiologii Karolinska Institute (Stockholm, Sweden). Urządzenie (rozmiar 13 x 35 cm) zostało zmodyfikowane poprzez instalację plastikowej nasadki o powierzchni przewodzącej o średnicy 47 mm (GP plastindustri, Gislaved, Sweden) w charakterze płytki pochłaniającej (ilustracja 1). Z przyczyn bezpieczeństwa płytka pochłaniająca posiadała bardzo niskie natężenie (poniżej 80µA), natomiast jonizator dysponował napięciem ponad 200,000 eV. Jonizator generuje elektrony, które ujemnie ładują powierzchnie cząsteczek w powietrzu i w ten sposób przyciąga je do dodatnio naładowanej płytki pochłaniającej. Urządzenie generuje w przybliżeniu 35 000 miliardów elektronów na sekundę (www.lightair.com) i stałe stężenie ozonu poniżej progu wykrywania (0,002 ppm; według badania VTT - Technical Research Center of Finland, Tampere w Finlandii). Urządzenie zostało zbadane pod kątem emisji ozonu i certyfikowane również przez ARB (Air Resources Board) w USA. Po zakończeniu okresu próbkowania, jonizator został wyłączony, a płytka pochłaniająca została przykryta pokrywką i do czasu analizy przechowywana w temperaturze -20 °C. Wirusy uwięzione na płytkach pochłaniających zostały zanalizowane przez qPCR w czasie rzeczywistym (rotawirus, CaCV, wirus grypy) i porównano wyniki uzyskane z jonizatora aktywnego i nieaktywnego. Do wizualizacji pozyskanych wirusów i cząsteczek kauczuku wykorzystano transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) i skaningowy mikroskop elektronowy (SEM).

Badanie aerozolu z cząsteczkami wirusów i lateksu. W wodzie (ostateczna objętość 5 ml) rozcieńczono różne ilości rotawirusa Rhesus (genotyp G3P[3]), wirusa grypy (szcep H1N1, Salomon Island, dezaktywowany) oraz CaCV szczepu 48 (gen Vesivirus). W badaniach aerozolu z mikroskopem SEM i analizą infekcyjności, wirus został rozcieńczony w pożywce Eagles MEM. Zawiesiny wirusów w różnych stężeniach zostały rozproszdzone w formie aerozolu w pomieszczeniu przy pomocy nebulizatora. Każde badanie zostało wykonane trzykrotnie, a pochłanianie wirusów i cząsteczek lateksu w formie aerozolu zostało wykonane w ciągu 40 minut.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM). Do badania aerozolu z rotawirusem i wirusem grypy na płytce pochłaniającej umieszczono miedziane siatki pokryte carbonem / formvarem (rozmiar 400). Siatki zostały namoczone w pożywce Eagles MEM zawierającej surowicę albuminową wołową (BSA; 1%), a następnie skontrastowane ujemnie (kwas fosforowolframowy 2%) i poddane analizie (TEM). 10 pól siatki zostało zanalizowanych pod kątem próbki i obliczono ilość cząsteczek wirusów na jednostkę obszaru.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM). Zebrane próbki zostały nałożone na powierzchnię filtra poliwęglanowego (0,6 µm; Nucleopore, Inc), który został zamontowany do elementu nie przepuszczającego powietrza (GP Plastindustri AB, Gislaved, Szwecja). Filtr został wysuszony w temperaturze pokojowej, pokryty powłoką złota zjonizowanego (grubość 40 Å) i poddany analizie SEM (Philips High Resolution SEM 515). Metoda ta była wcześniej wykorzystywana i opisywana w badaniu cytomegalowirusa i płynu mózgowo-rdzeniowego.⁴¹⁻⁴³

Ekstrakcja RNA wirusa z płytek pochłaniających. Cząsteczki wirusów uwięzione na płytkach pochłaniających zostały poddane lizie z 1 ml buforu lizującego do wirusów (AVL, QIAamp viral RNA mini kit) dodanym bezpośrednio na płytkę pochłaniającą i bezpośrednio po tym przystąpiono do ekstrakcji RNA wirusów przy pomocy produktu QIAamp Viral RNA Mini Kit (Nr kat. 52906 Qiagen, Hilden, Niemcy), stosując się do zaleceń producenta. Każda próbka została wymyta wodą wolną od RNaz (60 µL) zawierającą 0,04% azydku sodu (AVE buffer; Qiagen, Hilden, Niemcy).

Odwrotna transkrypcja wyekstrahowanego RNA wirusa. 28 µL wyekstrahowanego RNA wirusa zostało zmieszane z 50 pmol startera heksamerowego (Random Hexamer Primer) Pd(N)6 (GE-Healthcare, Uppsala, Szwecja), a następnie szybko schłodzone na lodzie (2 minuty). W dalszej kolejności dodatno jedną kroplę odwrotnej transkryptazy PCR Illustra Ready-To-Go (RT-PCR; GE-Healthcare, Uppsala, Szwecja) i wodę wolną od RNaz - ostateczna objętość wynosiła 50 µL. W przypadku rotawirusa wykonano denaturację wstępną (97°C przez 5 min), aby denaturować dsRNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) była wykonywana przez 40 minut w temperaturze 42°C, w celu wytworzenia cDNA wykorzystanego w dalszej kolejności do PCR w czasie rzeczywistym.

qPCR w czasie rzeczywistym dla rotawirusa. Rotawirus Rhesus został wykryty i zliczony korzystając z oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym LUX, jak opisano powyżej.⁷ PCR w czasie rzeczywistym wykorzystuje oznakowane primery z różnymi fluoroforami dla każdej podgrupy VP6 and external plasmid standards for semi-quantification.⁴⁴

qPCR w czasie rzeczywistym dla CaCV. CaCV został wykryty i zliczony przy pomocy oznaczenia SYBR green na pryzmacie ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) z primerami; (ostateczne stężenie 200 nM) CaCV-3 (5'-ACCAACGGAGGATTGCCATC-3' (nukleotydy 393 do 410 zgodnie z GenBank, akcesja nr AF053720) oraz CaCV-4 (5'-TAGCCGATCCCAAGAAGACA-3' (nukleotydy 452 do 474), specyficzne dla szczepu CaCV.⁴⁸ Reakcja została przeprowadzona z 2 μ L cDNA w 10 μ L 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) i wody; ostateczna objętość wynosiła 20 μ L. Wykorzystano następujący program: 95°C przez 10 min; 45 cykli 95°C przez 15 sekund i 60°C przez 1 min. Natychmiast po zakończeniu PCR wykonana została analiza krzywej topnienia, poprzez podgrzanie do 95°C przez 15 sekund, a następnie ochłodzenie do 60°C na 1 min i dalsze podgrzanie do 95°C przy 0.8 °C min⁻¹ z ciągłym rejestrowaniem fluorescencyjnym. Temperatury topnienia zostały określone dla wszystkich próbek przy pomocy oprogramowania Sequence Detection Software w wersji 1.3.1 (Applied Biosystems), a następnie zwizualizowane poprzez nałożenie ujemnych pochodnych do temperatury.

Próbkowanie do badania infekcyjności z rotawirusem i CaCV. W celu ustalenia, czy technologia jonizacji posiada wpływ na infekcyjność wirusa, CaCV i rotawirus Rhesus zostały rozpylone i zebrane przez płytkę pochłaniającą aktywnego jonizatora, pokrytą 1 ml pożywki Eagles MEM. Rotawirus (1 x 10⁶ PFU) i CaCV (1 x 10⁶ PFU) zostały rozpylone, każdy z nich w całkowitej objętości 5 mL; następnie były one pochłaniane przez 40 min, po czym nastąpiło określenie infekcyjności i liczby kopii genomu.

Aby określić, czy zjonizowane powietrze samo w sobie miało wpływ na infekcyjność wirusa, rotawirus Rhesus został rozpylony i pochłonięty przez płytkę pochłaniającą, pokrytą 1 ml pożywki Eagles MEM, bez jonizacji, umieszczoną w odległości 30 cm od nebulizatora.

Aby określić, czy siły elektrostatyczne płytki pochłaniającej wpłynęły na infekcyjność wirusa, rotawirus (2 x 10⁵ PFU) i CaCV (2 x 10⁵ PFU) w 1 ml pożywki Eagles MEM zostały na 40 minut nałożone na aktywną i nieaktywną płytkę pochłaniającą. Następnie płytki były przechowywane w temperaturze -20°C do momentu określenia infekcyjności wirusów i liczby kopii genomu.

Określenie infekcyjności rotawirusa i CaCV. Inwentarz i próbki rotawirusów zostały rozcieńczone w stosunku 1:10 w pożywce Eagles MEM, a następnie zostały one dwukrotnie rozcieńczone. Ocena infekcyjności wirusa była przeprowadzana, jak opisano wcześniej, na ciągłych komórkach nerkowych koczodana zielonego (MA104), na płytkach z 96 studzienkami.³⁰ Infekcyjność wirusa CaCV została oceniona podobnie jak w przypadku rotawirusa, z tą różnicą, że próbki zostały dodane do psich komórek nerkowych Madin-Darby'ego (MDCK) na płytkach z 48 studzienkami; infekcyjność została oceniona zgodnie z wcześniejszym opisem⁴⁵; infekcyjność potwierdzono qPCR w czasie rzeczywistym. Aby ocenić redukcję infekcyjności, porównano stosunek liczby kopii genomu wirusowego do infekcyjności u wirusów rozpylonych, wirusów wystawionych na działanie aktywnych i nieaktywnych płytek pochłaniających oraz w inwentarzu wirusów.

Zwierzęta. Świniki morskie (szczep Hartley, samice, 300-350 g) były hodowane w laboratorium Astrid Fagraeus Laboratory (Karolinska Institute), zgodnie z przyjętymi wytycznymi Konwencji Ministerstwa Rolnictwa i Rady Europy odnośnie kręgowców wykorzystywanych do celów laboratoryjnych. Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Etyki Zwierzęcej w Sztokholmie (Numer zezwolenia: N177/11).

Przenoszenie wirusa grypy drogą powietrzną. Do weryfikacji, czy jonizacja może zapobiec przenoszeniu infekcji wirusa grypy wykorzystaliśmy model zwierzęcy świnki morskiej, gdyż okazał się on być skutecznym modelem w badaniach przenoszenia wirusa grypy drogą kropelkową.^{31,33} Wykorzystano wirusa ludzkiej grypy A szczepu Pan/99 (dostarczony przez Peter'a Palese, New York, USA), ponieważ szczep ten u świnek morskich efektywnie replikuje w górnych drogach oddechowych i przenosi się drogą kropelkową, natomiast nie przez nośniki zakażenia. Świniki morskie (samice, 300-350 g, szczep Hartley) były hodowane w laboratorium Astrid Fagraeus Laboratory, Solna, Stockholm (Pozwolenie etyczne N177/11). Czwooro zwierząt zostało znieczulonych zastrzykiem dootrzewnowym z ketaminą (Ketalar el Ketaminol) 50 mg/kg i ksylazyną (Rompun) 5 mg/kg oraz zakażonych wewnątrznosowo dawką 5x10³ PFU Pan/99 w 100 μ L (50 μ L do każdego nozdrza). Wszystkie 4 zakażone zwierzęta zostały umieszczone w klatce eksperymentalnej (ilustracja 3, klatka "A"). W 30 godzinie po infekcji 4 niezakażone świnki morskie zostały umieszczone obok klatki z zakażonymi zwierzętami (ilustracja 3, klatka "B"), w odległości 15 cm. Powietrze przepływało swobodnie pomiędzy klatkami, ale nie było bezpośredniego kontaktu pomiędzy zwierzętami zaszczepionymi i narażonymi.

4 niezakażone świnki morskie zostały wystawione na 24 godziny, a następnie umieszczone w oddzielnych, indywidualnie wentylowanych klatkach. W ten sposób zapewniono brak przenoszenia drogą kropelkową pomiędzy zwierzętami. Przeprowadzono dwa identyczne badania, jedno z jonizatorem aktywnym, a drugie z jonizatorem nieaktywnym. Zwierzęta zakażone wewnątrznosowo zostały usunięte po upływie czasu ekspozycji, następnie wykonano biopsję płuc i tchawicy (54 godzina po infekcji). Próbki zostały zbadane pod kątem wirusa grypy (qPCR w czasie rzeczywistym). 21 dni po ekspozycji pobrano surowicę od niezakażonych i narażonych wcześniej świnek morskich. Występowanie przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi grypy A zostało ocenione przez test ELISA.

Surowica pobrana przed ekspozycją na zakażone świnki morskie (PRE-serum) i 21 dni po ekspozycji (POST-serum) zostały zanalizowane (u każdego zwierzęcia).

Wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi grypy A testem ELISA. Płytki z 96 studzienkami (Nunc, 96 F MAXISORP, Roskilde, Denmark) zostały pokryte wirusem grypy A H1N1 inaktywowanym formaliną (SBL Influenza Vaccine, Sanoil Pasteur, Lyon, France) rozcieńczonym w [coating buffer] (0.05 M węglanu sodu, pH 9.5–9.7) [do stężenia] 5 µg/mL, a następnie były inkubowane przez noc w temperaturze +4°C. Studzienki były myte x3 (0,9% NaCl i 0,05% Tween-20) i blokowane 3% roztworem BSA w buforze PBS przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Próbkę serum zostały rozcieńczone (1:100), a następnie ponownie dwukrotnie rozcieńczone w buforze (PBS zawierający 0,5% BSA i 0,05% Tween-20) i inkubowane przez 90 minut w temperaturze 37°C. Płytki zostały następnie wymyte x5 i inkubowane przez 60 minut w temperaturze 37°C z biotynylowanym przeciwciałem goat-anti guinea pig (Vector, BA-7000) oraz peroksydazą chrzanową (HRP) sprzężoną ze streptawidyną (DAKO, Denmark, P0397), obie substancje w rozcieńczeniu 1:3000. Płytki zostały wymyte x5 i do każdej studzienki dodano 100 µL substratu TMB (Tetramethylbenzidine) (Sigma Aldrich, T-0440-16) reakcja odbywała się przez 10 minut i została zatrzymana przez oddanie 100 µL 2 M H₂SO₄. Absorbancja została zmierzona przy 450 nm w czytniku ELISA (VersaMax, Molecular Devices). Za wartości odcięcia przyjęto wartości średnie w grupie kontrolnej negatywnej OD i 2 x SD.

Ekstrakcja RNA wirusa grypy z tkanki świnki morskiej. RNA została wyekstrahowana z tkanki tchawiczej i płucnej zakażonej świnki morskiej. W skrócie, zhomogenizowano 100–250 mg tkanki przy pomocy homogenizatora tkanki; ekstrakcja RNA odbyła się z zestawem RNeasy Midi Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcjami producenta.

qPCR w czasie rzeczywistym dla wirusa grypy. W celu wykrycia i zliczenia wirusa grypy A na płytkach pochłaniających i w próbkach tkanki świnek morskich, wykorzystaliśmy test One-Step Taq Man real-time RT-PCR46 z primerami F1-mxA (150 nM) (5'-AAGACCAATYCTGTACCTCTGA-3'), F3-mxA (150 nM) (5'-CAAGACCAATCTGTACCTCT GAC-3') i R1-mxA (900 nM) (5'-TCCTCGCTCACTGGGCA-3') oraz sondy P1-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTGTGTTACGCTCACC-MGB-3') i P2-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTTGATTACGCTCACC-MGB-3'), z zestawem Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit (Qiagen).

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym odbyła się w urządzeniu Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen) z następującym protokołem cykli: 50°C przez 10 minut, następnie 45 cykli 95°C przez 5 sekund i 57°C przez 15 sekund.

Piśmiennictwo

- Lipsitch, M. et al. Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1966–1970, (2003).
- Tellier, R. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *J R Soc Interface* 6 Suppl 6, S783–S790, (2009).
- Stilianakis, N. I. & Drossinos, Y. Dynamics of infectious disease transmission by inhalable respiratory droplets. *J R Soc Interface* 7, 1355–1366, (2010).
- Teunis, P. F., Brienen, N. & Kretzschmar, M. E. High infectivity and pathogenicity of influenza A virus via aerosol and droplet transmission. *Epidemics* 2, 215–222, (2010).
- Fowler, R. A., Scales, D. C. & Ilan, R. Evidence of airborne transmission of SARS. *N Engl J Med* 351, 609–611; author reply 609–611, (2004).
- Fiegel, J., Clarke, R. & Edwards, D. A. Airborne infectious disease and the suppression of pulmonary bioaerosols. *Drug Discov Today* 11, 51–57, (2006).
- Nordgren, J., Bucardo, F., Svensson, L. & Lindgren, P. E. Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus. *J Clin Microbiol* 48, 1859–1865, (2010).
- Nordgren, J., Bucardo, F., Dienus, O., Svensson, L. & Lindgren, P. E. Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46, 164–170, (2008).
- Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30, 1292–1305, (2002).
- Booth, T. F. et al. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *J Infect Dis* 191, 1472–1477, (2005).
- Hermann, J. R. et al. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Appl Environ Microbiol* 72, 4811–4818, (2006).
- Pyankov, O. V. et al. Using a bioaerosol personal sampler in combination with real-time PCR analysis for rapid detection of airborne viruses. *Environ Microbiol* 9, 992–1000, (2007).
- Verreault, D., Moineau, S. & Duchaine, C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 413–444, (2008).
- Turgeon, N., Toulouse, M. J., Martel, B., Moineau, S. & Duchaine, C. Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies. *Appl Environ Microbiol* 80, 4242–4250, (2014).
- Verani, M., Bigazzi, R. & Carducci, A. Viral contamination of aerosol and surfaces through toilet use in health care and other settings. *American journal of infection control* 42, 758–762, (2014).
- Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C. & Gardam, M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* 7, 257–265, (2007).
- Sato, T. [Infection control in hospitals]. *Masui* 59, 56–63, (2010).
- Hans, C. Infection control practices for avian influenza in healthcare facilities. *J Indian Med Assoc* 104, 388, 390, 392 passim, (2006).
- Hatagishi, E. et al. Establishment and clinical applications of a portable system for capturing influenza viruses released through coughing. *PloS one* 9, e103560, (2014).
- Bergeron, V. et al. Supplemental treatment of air in airborne infection isolation rooms using high-throughput in-room air decontamination units. *American journal of infection control* 39, 314–320, (2011).
- Hudson, J. B., Sharma, M. & Petric, M. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *The Journal of hospital infection* 66, 40–45, (2007).
- Mitchell, B. W. & King, D. J. Effect of negative air ionization on airborne transmission of Newcastle disease virus. *Avian diseases* 38, 725–732, (1994).
- Estola, T., Makela, P. & Hovi, T. The effect of air ionization on the air-borne transmission of experimental Newcastle disease virus infections in chickens. *The Journal of hygiene* 83, 59–67, (1979).

24. Escombe, A. R. et al. Upper-room ultraviolet light and negative air ionization to prevent tuberculosis transmission. *PLoS medicine* 6, e43, (2009).
25. Gast, R. K., Mitchell, B. W. & Holt, P. S. Application of negative air ionization for reducing experimental airborne transmission of *Salmonella enteritidis* to chicks. *Poultry science* 78, 57–61, (1999).
26. Parvaneh, S. et al. A new method for collecting airborne allergens. *Allergy* 55, 1148–1154, (2000).
27. Mochizuki, M. et al. A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet Rec* 132, 221–222, (1993).
28. Lee, B. Y. et al. Economic value of norovirus outbreak control measures in healthcare settings. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 640–646, (2011).
29. Vesikari, T., Rautanen, T., Varis, T., Beards, G. M. & Kapikian, A. Z. Rhesus Rotavirus candidate vaccine. Clinical trial in children vaccinated between 2 and 5 months of age. *Am J Dis Child* 144, 285–289, (1990).
30. Istrate, C. et al. Bone marrow dendritic cells internalize live RF-81 bovine rotavirus and rotavirus-like particles (RF 2/6-GFP-VLP and RF 8*2/6/7-VLP) but are only activated by live bovine rotavirus. *Scand J Immunol* 65, 494–502, (2007).
31. Lowen, A. C., Mubareka, S., Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9988–9992, (2006).
32. Pica, N., Chou, Y. Y., Bouvier, N. M. & Palese, P. Transmission of influenza B viruses in the guinea pig. *J Virol* 86, 4279–4287, (2012).
33. Mubareka, S. et al. Transmission of influenza virus via aerosols and fomites in the guinea pig model. *J Infect Dis* 199, 858–865, (2009).
34. Gralton, J., Tovey, E., McLaws, M. L. & Rawlinson, W. D. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: a review. *J Infect* 62, 1–13, (2011).
35. Kettleston, E. M. et al. Airborne virus capture and inactivation by an electrostatic particle collector. *Environ Sci Technol* 43, 5940–5946, (2009).
36. Murray, B. K. et al. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of virological methods* 153, 74–77, (2008).
37. Nishikawa, K. & Nojima, H. Airborn virus inactivation technology using cluster ions generated by discharge plasma. *Sharp Tech J* 86, 10–15, (2003).
38. Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 3, 1470–1476, (2007).
39. Lowen, A. C., Steel, J., Mubareka, S. & Palese, P. High temperature (30 degrees C) blocks aerosol but not contact transmission of influenza virus. *J Virol* 82, 5650–5652, (2008).
40. Lowen, A. C. et al. Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model. *J Virol* 83, 2803–2818, (2009).
41. Andersson, J. et al. Rapid detection of cytomegalovirus using immune scanning electron microscopy. *Journal of virological methods* 16, 253–262, (1987).
42. Wetterberg, L. et al. Micrometer-sized particles in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 329, 91–95, (2002).
43. Johansson, V. et al. Microscopic particles in two fractions of fresh cerebrospinal fluid in twins with schizophrenia or bipolar disorder and in healthy controls. *PLoS one* 7, e45994, (2012).
44. Nordgren, J., Kindberg, E., Lindgren, P. E., Matussek, A. & Svensson, L. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. *Emerging infectious diseases* 16, 81–87, (2010).
45. San Gabriel, M. C. et al. Identification of canine calicivirus capsid protein and its immunoreactivity in western blotting. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 59, 97–101, (1997).
46. Nilsson, A. C. et al. Longitudinal clearance of seasonal influenza A viral RNA measured by real-time polymerase chain reaction in patients identified at a hospital emergency department. *Scandinavian journal of infectious diseases* 42, 679–686, (2010).

Podziękowania

Dziękujemy dr. Peterowi Palese za zapewnienie wirusa grypy szczepu Pan/99 oraz surowicy odpornościowej na potrzeby tego badania. Praca ta była wspierana przez Swedish Research Council (Szwedzka rada naukowo-badawcza) (LS) 320301.

Wkład autorów

L.S., H.W., R.N., M.H. i J.N. zaprojektowali badania, R.N. opracował jonizator przygotował pomieszczenie eksperymentalne i wykonał mikroskopię skaningową, L.S., M.H., J.N. i R.N. przeprowadzili eksperymenty, K.O.H. wykonał transmisyjną mikroskopię elektronową, M.H. i J.N. wykonali analizę laboratoryjną, L.S. i H.W. zinterpretowali dane, L.S., H.W., M.H. i J.N. napisali rękopis.

Dodatkowe informacje

Konflikt interesów finansowych: Autorzy zadeklarowali brak konfliktu interesów finansowych.

Jak cytować ten artykuł: Hagbom, M. et al. Ionizing air affects influenza virus infectivity and prevents airborne-transmission. *Sci. Rep.* 5, 11431; doi: 10.1038/srep11431 (2015).



Ta praca posiada licencję Creative Commons Attribution 4.0 International License. Ilustracje i inne materiały od osób trzecich zawarte w tym artykule są objęte licencją Creative Commons, chyba że zaznaczono inaczej w [credit line]; jeżeli dany materiał nie jest objęty licencją Creative Commons, ewentualni użytkownicy muszą uzyskać zgodę właściciela licencji na odtworzenie tego materiału. Aby wyświetlić kopię tej licencji odwiedź stronę <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>