

# ОТЧЕТ О ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Государственный университет Канзаса

Манхеттен, штат Канзас, США

Руководитель проекта

Аллен М. Джонстон.



# ИТОГОВЫЙ ОТЧЕТ О ВЫПОЛНЕНИИ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

(Руководитель Аллен Джонстон - Главный директор по технологиям компании EcoQuest International)

## Научные исследования Государственного университета штата Канзас

### Гибель микроорганизмов в процессе фотокатализа и воздействия озона в результате применения в воздухоочистителях Fresh Air RCI-технологий

#### Краткий обзор

Исследования выполнены в Институте науки о продуктах питания штата Канзас на кафедре зоотехники и промышленного животноводства при университете штата Канзас в городе Манхеттен под руководством доктора Джеймса Марсдена, опытного специалиста в области мясных продуктов. Штат Канзас является одним из форпостов американских университетов в области зоотехники, а доктор Марсден хорошо известен во всем мире, как ведущий ученый-исследователь в сфере безопасности продуктов питания.

Десять наиболее опасных форм плесени, грибов, бактерий и вирусов были подвержены воздействию принципиально нового фотокаталитического генератора, названного радиально-каталитическим ионизатором (прибор Fresh Air). Эти десять форм микроорганизмов наносились на пластины из нержавеющей стали и помещались внутрь камеры для проведения исследований с находившимся там включенным на 24 часа модулем RCI. Результаты испытаний показали, что в результате такого воздействия погибали от 96 до 100 процентов упомянутых микроорганизмов. Проведенные научные исследования являются достоверным доказательством того, что RCI-технология, применяемая в приборах Fresh Air, позволяет эффективно и быстро дезинфицировать поверхности внутри помещений. При этом используются естественные процессы очищения озоном на безопасных для здоровья человека уровнях.

#### Обсуждение

Поскольку большинство биологических загрязнителей воздушной среды внутри помещений образуются на каких-либо поверхностях, усилия по борьбе с ними, прежде всего, должны быть направлены на их уничтожение именно на этих поверхностях.

В условиях с достаточным уровнем влажности такие микроорганизмы, как плесень, бактерии и вирусы начинают активно размножаться на различных поверхностях. По этой причине, специалисты пищевой промышленности должны нацелить свои усилия на контроль и уничтожение этих патогенных форм в зонах, где пищевые продукты соприкасаются с поверхностями.

Доктор Марсден посвятил свою жизнь увеличению безопасности пищевых продуктов, используя механизмы контроля распространения биологического загрязнения. Самые последние научные изыскания ученого в этой сфере были сосредоточены на использовании высокотехнологичного процесса фотокатализа - технологии, в процессе которой образуются окислители, эффективно борющиеся с патогенными микроорганизмами как в воздухе, так и на поверхностях. Для анализа были отобраны 10 форм микроорганизмов. Были подготовлены по три образца каждого из данных патогенов, которые затем помещались на поверхность из нержавеющей стали. Длительность экспериментов составляла 2 часа, 6 часов, и 24 часа (в течение которых микроорганизмы подвергались воздействию окислителей).

**В проведение научных исследований участвовали следующие формы микроорганизмов:**

**Staphylococcus aureus (бактерия Золотистый стафилококк);  
MRSA (штамм Золотистого стафилококка, устойчивый к метициллину);**

**E-coli (Escherichia coli - Кишечная палочка);  
Bacillus spp. (Сибирская язва);  
Streptococcus spp. (Стрептококки);  
Pseudomonas aureuginos (Синегнойная палочка);  
Listeria monocytogenes (Листерииоз);  
Candida albicans (Кандидоз);  
Avian Influenza H5N8 (Птичий грипп).**

В исследовании эти формы микроорганизмов подвергались воздействию воздуха, циркулирующего через запатентованный компанией EcoQuest фотокаталитический генератор RCI или, как его ещё называют, радиально-каталитическим ионизатором (прибор Fresh Air). В ходе эксперимента учёту подвергалось множество параметров, включая влажность и температуру.

Ультрафиолетовая лампа в фотокаталитическом модуле была расположена в вентиляционном канале поступающего воздуха, чтобы исключить прямое влияние бактерицидного излучения, производимого лампой. Принимая во внимание то, что озон является одним из окислителей, образующихся в результате фотокаталитического процесса, и учитывая аспекты безопасности (высокие дозы озона оказывают негативное влияние на человека), во время проведения исследования велось постоянное наблюдение за уровнем озона. Этот уровень ни разу не превысил показатель 20 частиц на миллиард, что гораздо ниже максимального допустимого уровня, безопасного для человека при длительном воздействии (EPA стандарт Организации по охране окружающей среды США).

Кроме камеры, которая подвергалась воздействию Fresh Air и озонового генератора с коронным разрядом, исследовалась контрольная камера, в которой велся учет микроорганизмов, погибших в силу естественных причин. Поскольку некоторые патогенные микроорганизмы погибают, попадая в условия открытого воздуха, любое серьезное научное исследование должно проводиться с учетом этого обстоятельства. Результаты данного исследования дают представление о погибших жизнеспособных микроорганизмах именно в результате воздействия на них Fresh Air и озонового генератора, и не учитывают те микроорганизмы, которые погибли в силу естественных причин (что определялось на основе данных, полученных в контрольном образце).

Результаты тестирования были воистину удивительными. Спустя 24 часа, в течение которых микроорганизмы находились под воздействием Fresh Air и озонового генератора с коронным разрядом, жизнеспособность этих микробов была ослаблена на величину от 96,4% до 100%. Следует заметить, что в приведенных результатах этого двойного слепого тестирования был учтен тот фактор, что часть микроорганизмов могла погибнуть в силу естественных причин. Еще в большей степени ученых поразило то, насколько быстро погибали болезнетворные микроорганизмы в результате воздействия Fresh Air. В образцах, которые подвергались воздействию в течение всего 2 часов, среднее значение погибших микроорганизмов превысило 80%. В образцах с временем воздействия, равным 6 часам, этот показатель превышал 90%.

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАБОТЫ ПРИБОРА FRESH AIR И ГЕНЕРАТОРА ОЗОНА BREEZE AT КОМПАНИИ ECOQUEST В СНИЖЕНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПОВЕРХНОСТЯХ ИЗ НЕРЖАВЕЮЩЕЙ СТАЛИ

М.Т. Ортега, Л.Д. Франклен, П.Р. Хатесол, Д.Л. Марсден  
Кафедра зоотехнии и промышленного животноводства Институт науки о продуктах питания штата Канзас Университет штата Канзас, Манхеттен, KS 66506

## Краткий обзор и выводы

Исследование проведено с целью выяснения эффективности использования матрицы RCI - радиально-каталитической ионизации - в приборе Fresh Air компании EcoQuest для инактивации (лишение жизнеспособности) следующих болезнетворных микроорганизмов: *Escherichia coli* (Кишечная палочка), *Listeria monocytogenes* (Листериоз), *Streptococcus spp.* (Стрептококки), *Pseudomonas aureuginos* (Синегнойная палочка), *Bacillus spp.* (Сибирская язва), *Staphylococcus aureus* (Бактерия Золотистый стафилококк), *Candida albicans* (Кандидоз) и *S.chartarum* на поверхностях из нержавеющей стали.

Исследование состояло из серии опытов с различным временем воздействия RCI на вышеуказанные микроорганизмы, помещенные в камеру для проведения испытаний с контролируемым потоком воздуха.

Кроме того, в аналогичных экспериментальных условиях дополнительно была выполнена оценка работы озонового генератора Breeze AT компании EcoQuest для выяснения эффективности его воздействия (инактивации) на *Candida albicans* (Кандидоз) и *S.chartarum*.

В настоящее время все осознают необходимость использования более совершенных технологий для дезинфекции контактных поверхностей на предприятиях, где ведется переработка и выпуск пищевых продуктов, с целью предотвращения вспышек пищевых инфекций, которые вызываются указанными выше болезнетворными микроорганизмами. Лишь недавно было одобрено использование технологий с генерацией озона для обработки поверхностей, соприкасающихся с продуктами питания. В этом исследовании оценивается эффективность применения газообразного озона и других газов с окислительными свойствами с целью сокращения популяций перечисленных выше микроорганизмов на поверхностях из нержавеющей стали.

Использование обеих технологий было крайне эффективным (результатами гибели микроорганизмов составили, по крайней мере, 90 % после 24-часового воздействия). Эффективность технологии RCI - радиально-каталитической ионизации прибора Fresh Air производства компании EcoQuest была выше, по сравнению с работой озонового генератора Breeze AT производства той же компании.

## Введение

Пищевая промышленность и промышленность безалкогольных напитков, преследуя цель выпуска безопасной и полезной продукции, сталкиваются с рядом трудностей.

Патогенные формы микроорганизмов, вызывающие пищевые инфекции, такие как *E.Coli*0157:H7, *Listeria monocytogenes* и *Salmonella spp* уже в течение нескольких лет являются предметом растущего беспокойства производителей.

Производителей также волнуют вопросы, связанные с контролем микроорганизмов, вызывающих порчу. Такие микробы значительно сокращают сроки хранения пищевых продуктов и приносят компаниям миллионные убытки. К производствам,

которые страдают от этих патогенных форм микроорганизмов, можно отнести предприятия мясной промышленности, производителей морепродуктов, птицы, производства пекарной, консервной, молочной промышленности, а также многие другие производства на рынке продуктов питания.

Министерство сельского хозяйства США оценивает ущерб, понесенный страной от болезней, возникших в результате заражения людей пищевыми инфекциями, вызванных болезнетворными микроорганизмами в продуктах питания, в сумму от 5.5 до 22 миллиардов американских долларов ежегодно. Эта цифра не включает миллиарды долларов, которые теряются в результате порчи пищевых продуктов, которые после этого должны быть либо выброшены, либо проданы со скидкой. Почти в каждой сфере пищевой промышленности существует острая необходимость внедрения усовершенствованных мер по дезинфекции поверхностей и контролю патогенных микроорганизмов.

Озон, являясь газом с дезинфицирующими свойствами, обладает огромной способностью к окислению различных веществ. Он действует в тысячи раз быстрее хлора и очищает воду в 3 - 4 раза эффективней. В процессе окисления какого-либо вещества озон буквально уничтожает его молекулу. Озон способен окислять различные органические формы, такие, как бактерии, плесень, он эффективно стерилизует воздух и удаляет из него различные неприятные запахи и ядовитые газы. Уже в течение многих лет озон успешно применяется в промышленности для различных целей, например, для удаления неприятных запахов, очищения воды и в качестве дезинфицирующего вещества (Морк, 1993). Недавнее решение правительства о санкционировании использования озона для обработки продуктов и рабочих поверхностей на производстве открыло двери, ведущие к заманчивым перспективам для этой технологии. В июне 2001 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США (FDA) одобрило использование озона в качестве дезинфицирующего средства для обработки производственных рабочих поверхностей, где есть контакт с пищевыми продуктами. Кроме того, было получено разрешение на прямую обработку пищевых продуктов озоном.

До того, как это произошло, в пищевой промышленности в качестве дезинфицирующего средства чаще всего использовался хлор. Озон является лучшим выбором для дезинфицирующей обработки поверхностей в сравнении с хлором. Хлор, являясь галогенным химикатом, агрессивно воздействует на поверхности из нержавеющей стали и других металлов, из которых обычно сделано оборудование для переработки и изготовления пищевых продуктов. Кроме того, хлор представляет собой значительную опасность для здоровья рабочих пищевых производств. Вступая в реакцию даже с небольшим количеством чистящего средства на основе аммиака или кислоты, хлор может привести к образованию ядовитого для человека газа.

Хлор является широко используемым в производстве

мясных изделий и полуфабрикатов дезинфицирующим веществом, достаточно эффективным и безопасным, когда выдерживаются рекомендованные пропорции. Однако, он значительно уступает озону по своим дезинфицирующим свойствам. Кроме того, его использование может привести к образованию хлороформа, тетрахлорида углерода, хлористого метила и три-галоидметана.

Озон, в отличие от этого, во время окислительной реакции не образует опасных побочных продуктов. Еще одним преимуществом в использовании озона в качестве дезинфицирующего вещества является то, что продукт после такой обработки может называться "органическим" или натуральным (изготовлен без обработки химикалиями). Чтобы получить право называться таковым, "органическое" дезинфицирующее вещество должно быть зарегистрировано в Агентстве по охране окружающей среды США (EPA). Озон прошел такую регистрацию в данном Агентстве и был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США (FDA) для использования в качестве дезинфицирующего вещества для обработки производственных рабочих поверхностей, где есть контакт с пищевыми продуктами, и прямой обработки пищевых продуктов.

Озон, используемый в последние годы на производствах по переработке и изготовлению пищевых продуктов, нашел применение не только в качестве дезинфицирующего вещества для контактных рабочих поверхностей. В недавней рекомендации, данной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США (FDA), говорится о том, что "Озон является веществом, которое может сократить численность болезнетворных микроорганизмов, включая патогенные штаммы *Escherichia coli* (Кишечная палочка) и *Cryptosporidium* (Криптоспоридия) в соках. Озон также рекомендуется использовать в качестве пищевой добавки, которая не представляет опасности для здоровья человека и может быть использована в качестве противомикробного вещества во время обработки, хранения и переработки определенных продуктов питания в условиях применения, описанных в 21 CFR 173.368 (Свод федеральных правил)".

## **ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Приготовление культур**

**В исследовании были использованы следующие виды культур бактерий и грибов:**

***Bacillus globigii* (ATCC \*)# 31028, 49822, 49760);**

***Staphylococcus aureus* (ATCC # 10832D, 25178, 11987);**

***Candida albicans* (ATCC # 96108, 96114, 96351);**

***Stachybotrys chartarum* (ATCC # 18843, 26303, 9182);**

***Pseudomonas aureuginosa* (ATCC # 12121, 23315, 260);**

***Escherichia coli* (ATCC # 27214, 19110, 67053);**

***Streptococcus pneumoniae* (ATCC # 27945, 29514, 10782);**

***Staphylococcus aureus*, устойчивый к метициллину штамм (ATCC # 33591).**

\*ATCC#... - номер в Американской коллекции типовых культур.

Культуры были получены с учетом рекомендаций ATCC (биоресурсный центр с Американской коллекцией типовых культур).

Штаммы бактерий, дрожжей и плесени индивидуально выращивались на соевом бульоне TSB (tripticase soy broth) и YB (на основе дрожжей) бульоне (Difco Laboratories) до середины фазы среднего экспоненциального роста, после чего следовало промывание и ресуспендирование (повторное получение суспензии) в 0,1% растворе пептонной воды.

### **Подготовка образцов и обработка их озоном**

Данные виды микроорганизмов, использованные для оценки эффективности воздействия озонных генераторов, были представлены в исследованиях в виде микробного коктейля, который засеивался на 8 пластинках из нержавеющей стали размером 6,3 x 1,8 см (суммарная площадь обеих сторон составляла 17,64 см<sup>2</sup>). Четыре пластинки из нержавеющей стали одновременно погружались в микробный посевной материал (инокулум) и проворачивались в нем в течение 15 секунд для обеспечения равномерного распределения микробов по пластинке. После этого, чтобы пластины хорошо обсохли, они подвешивались при помощи стерильного зажима на 1 час к охлаждающей решетке, находящейся в шкафчике с ламинарным потоком воздуха. Первоначальные данные о численности микробной популяции, находящейся на данных пластинках, колебались в пределах от 5 до 8 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup> [CFU/cm<sup>2</sup>]. Затем пластинки с засеянной микробной популяцией помещались в камеру для проведения испытаний с контролируемым воздушным потоком (специальная камера, воссоздающая различные условия окружающей среды - Terra Universal, Анахайм, штат Калифорния [Anaheim, CA]) при температуре 26°C и 46% относительной влажности. Это создавало благоприятные условия для роста и размножения популяций микробов. В этой камере пластины с заселёнными на них болезнетворными микроорганизмами подвергались воздействию матрицы RCI - радиально-каталитической ионизации - производства компании EcoQuest. В данном исследовании изучался эффект такого воздействия на микроорганизмы в течение разных промежутков времени, а именно: начальная стадия (0 часов), спустя 2, 6 и 24 часа. Кроме того, отдельно было изучено воздействие на микроорганизмы озонного генератора Breeze AT компании EcoQuest. Как и в предыдущем исследовании, оценивался эффект воздействия по истечении разных периодов времени: спустя 2, 6 и 24 часа. Во время данных исследований велось постоянное наблюдение за уровнем генерируемого озона (при помощи прибора Model 500, Aeroqual производства Новой Зеландии).

### **Работа с образцами по окончании эксперимента**

По истечении времени исследования, в процессе которого пластины с засеянными на них патогенными микроорганизмами подвергались воздействию озона, эти пластины погружали в 30 мл 0,1% раствора пептонной воды на 30 секунд, где их хорошо проворачивали в разные стороны. После этого данные образцы, засеянные на пластинах разными микробными культурами, были разжижены и помещены на соевый агар tripticase - растительный студень - (TSA, Difco Laboratories). Затем, образцы помещались на 24 часа в термостат, где была выставлена температура 35°C. Затем следовало дальнейшее разжижение образцов в несколько раз. После этого образцы с засеянной на них культурой дрожжей высевались в чашку с картофельным агаром с декстрозой (PDA, Difco Laboratories), а образцы с засеянной на них культурой плесени высевались в чашку с кукурузной мукой. И те, и другие чашки помещались в термостат с выставленной температурой 30°C на 5 дней. После такого выращивания микроорганизмов велся подсчет популяций, выраженный в КОЕ на 1 кв. см. (колониеобразующая единица [англ.эквивалент КОЕ - CFU]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена картина снижения численности микробных популяций, высеянных на 8 пластинах из нержавеющей стали, подвергшихся воздействию RCI-технологии (радиально-каталитической ионизации). Обработка озоном данных микробных популяций (уровень озона составлял 0.02 миллионных доли) в течение 2 часов сократила численность популяций, по крайней мере, на величину 0.7 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>. Результатом более длительного времени воздействия явилось более значительное сокращение численности микробной популяции с максимальным значением сокращения, достигнутым по прошествии 24 часов обработки озоном. Спустя 24 часа воздействия, средние значения сокращения микробных популяций были следующими по каждому из микроорганизмов, участвующих в эксперименте:

**Staphylococcus aureus (1,85 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**Escherichia coli (1, 81 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**Bacillus spp. ( 2,38 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**Staphylococcus aureus metr (2,98 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**Streptococcus spp. (1,64 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**P. aeruginosa (2,0 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**L. monocytogenes (2,75 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**Candida albicans (3,22 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>);**  
**Stachybotrys chartarum (3,32 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>).**

Результаты сокращения численности популяции микробов, подвергшихся воздействию озонного генератора Breeze AT компании EcoQuest, представлены на рис. 2.

Спустя 2 и 6 часов такого воздействия в популяции микробов наблюдалось сокращение численности, равные, по крайней мере, 0,2 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup> и 0,4 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup> соответственно.

После 24 часов такой обработки озоном среднее сокращение численности популяции микробов для *Candida albicans* и *Stachybotrys chartarum* составило 1,48 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup> и 1,32 log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup> соответственно.

Таким образом, можно сделать выводы, что в результа-

те воздействия работы приборов компании EcoQuest Radiant Catalytic Ionization (Active Pure) Cell и Breeze AT Ozone generator, уже спустя 2 часа наблюдалось существенное сокращение численности популяций патогенных микробов, а при более длительном времени воздействия это сокращение достигало максимальных значений.

Технология Radiant Catalytic Ionization (Active Pure) Cell показала более эффективные результаты по сокращению микробных популяций в экспериментах, длящихся 2 и 6 часов, в сравнении с результатами, полученными в аналогичных опытах с Breeze AT Ozone generator.

Данное исследование наглядно продемонстрировало, что газообразный озон обладает значительным потенциалом, чтобы быть использованным в качестве эффективного дезинфицирующего средства на предприятиях по переработке и изготовлению пищевых продуктов. В настоящее время продолжается серия экспериментов. Целью второй фазы данного научного проекта, который планируется завершить к концу этого года, является оценка эффективности системы для устранения воздушного загрязнения. В исследовании планируется использовать такие же виды микроорганизмов и окислительные технологии.

## ССЫЛКИ

**Mork D.D. 1993. Removing sulfide with ozone (Удаление сульфидов при помощи озона). Глава "Загрязнение и очистка воды", стр. 34–37.**

## Публикация

Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США [FDA], 2004. Рекомендации производителям яблочного сока или сидра по использованию озона в целях сокращения патогенной флоры. Публикация доступна заинтересованным лицам на веб-ресурсе: <http://www.cfsan.fda.gov/dms/juicgu13.html>.

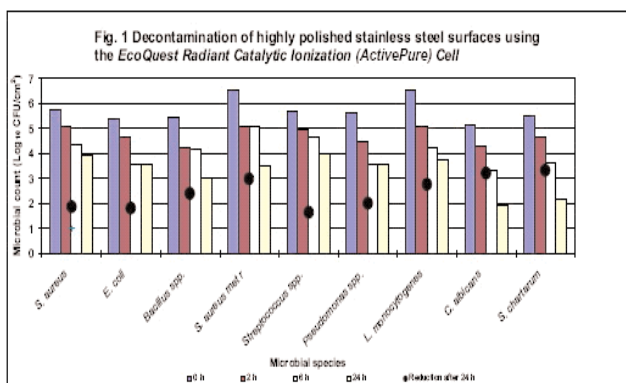


Рис. 1. Результаты работы прибора Active Pure (RCI - технология)

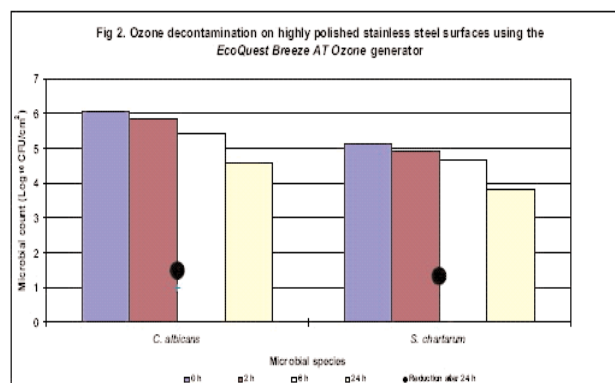
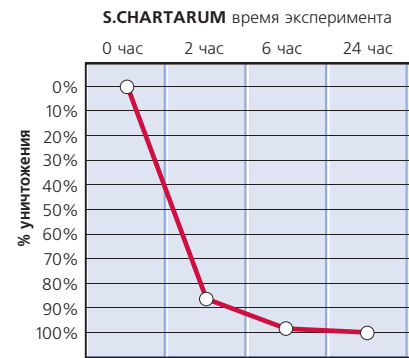
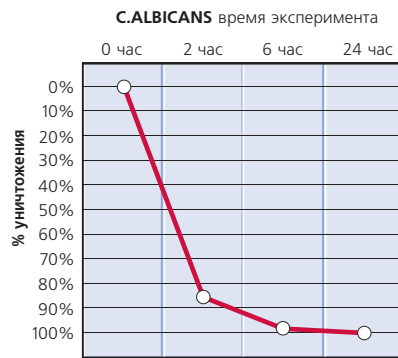
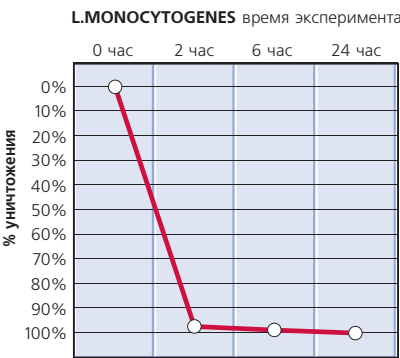
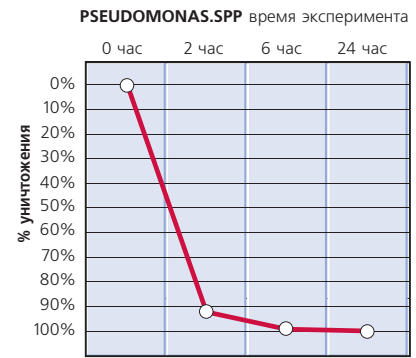
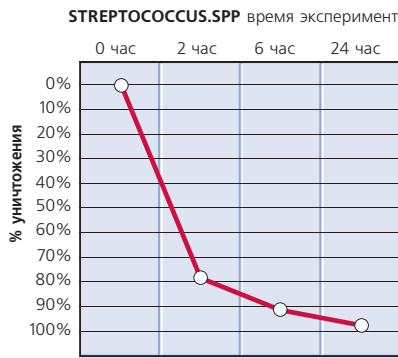
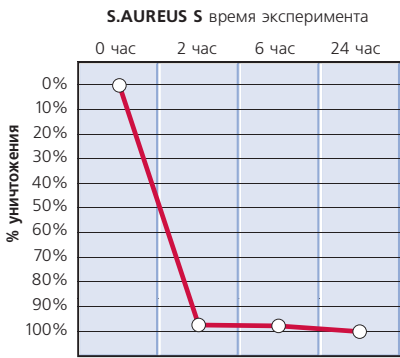
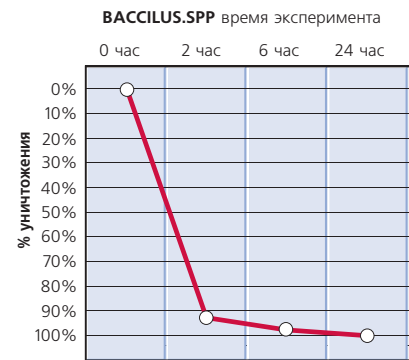
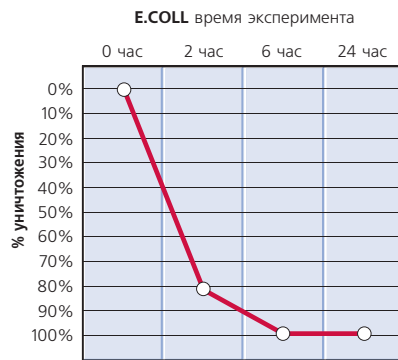
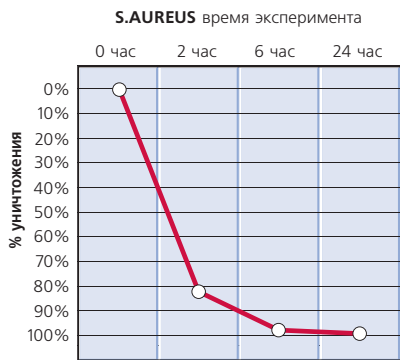
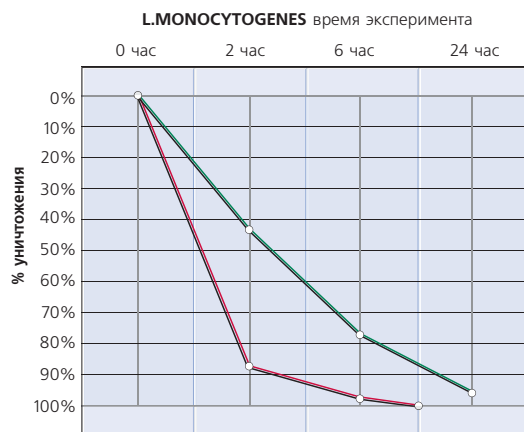


Рис. 2. Результаты работы озонного генератора Breeze AT

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ УНИЧТОЖЕНИЯ ОСНОВНЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ И ГРИБКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RCI-ТЕХНОЛОГИИ



**Сравнение эффективности работы RCI-матрицы и озонового генератора для уничтожения бактерий и грибов**



Результаты исследований Канзасского государственного университета, США. Использование воздухоочистителей **EcoQuest** резко сокращает популяции микробиологических организмов, включая (но не ограничиваясь), *Escherichia coli*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *P. Aeruginosa*, *L. Monocytogenes*, *Candida albicans*, *S. Chartarum*. Данные исследования были проведены с использованием RCI-технологий компании **EcoQuest** в условиях, приближенных к нормальным условиям использования воздухоочистителя в помещении.

# ИНАКТИВАЦИЯ ПТИЧЬЕГО ГРИППА МЕТОДОМ АКТИВНОЙ БЕСПРИМЕСНОЙ ОЧИСТКИ (ТЕХНОЛОГИЯ ACTIVE PURE)

## Введение

Вирус гриппа, представитель семейства ортомиксовирусов (Orthomyxoviridae), характеризуется тем, что он является оболочковым вирусом, содержащим одноцепочную молекулу РНК негативной полярности [6]. Этот вирус может вызывать ежегодные эндемические вспышки заболевания или более серьезные широкомасштабные пандемические проявления эпидемии. В большинстве случаев грипп А заражает отдельные особи человека, свиней, лошадей и птиц. Что касается пандемического проявления, то высокопатогенный птичий грипп (H5N1) является в настоящее время наибольшей угрозой вследствие текущего эпидемического состояния в Азии, Европе и Африке и продолжающейся угрозы для пандемического распространения. Формирование гибрида геномной трансформации вируса гриппа может привести к тому, что в процессе заболевания будет возникать большее количество патогенного и инфекционного штамма. В результате этого может начаться лавинообразный процесс передачи вируса от человека к человеку. Вирус гриппа, как правило, распространяется воздушно-капельным путём или посредством контакта с инфекционными выделениями или заражёнными предметами [4].

Для предупреждения дальнейшего распространения гриппа и минимизации вероятности того, что произойдет формирование новых гибридов, чрезвычайно важной является быстрая локализация вспышки заболевания.

Вирус гриппа показал способность к выживанию на непористых поверхностях в течение 48 часов и на материальных поверхностях, таких, как ткань, бумага или биологическая ткань до 12 часов после инфицирования приблизительно на уровне 105 TCID50 (доза инфицирования тканевой культуры 50% / мл) [1]. В дополнение к режимам дезинфекции и санирования поверхности воздушно-капельная инактивация вируса гриппа является также жизненно необходимой в случае таких доминирующих способов передачи вируса, как воздушный и капельный [4]. Загрязнение окружающей среды распыленными аэрозолями, содержащими данный патогенный организм, может служить источником болезни и должно находиться под контролем с применением эффективных методов дезактивации и санации. Минимизация загрязнения окружающей среды с осуществлением мер по высокоэффективной дезинфекции должна быть составляющей в общих усилиях по сдерживанию распространения вспышки заболевания.

Целью данного исследования является проверка достоверности полной дезактивации вирусов гриппа А с применением низкопатогенного птичьего гриппа (H5N8) в качестве суррогатного вируса для высокопатогенного птичьего гриппа (H5N1) в результате воздействия матрицы радиально-каталитической ионизации (Radiant Catalytic Ionization-Cell™), иначе, системы беспримесной активной очистки (Active Pure-Cell™). Система Active Pure-Cell™ является передовым инструментом окисления, который сочетает ультрафиолетовую дезактивацию в присутствии гидроокисных радикалов образом, чтобы имело место совместное действие двух высокоэффективных технологий дезактивации. Эффективность будет определяться для высушенного инокулята на твердых поверхностях, в клеточных культурах разведенного инокулята и распыленного в контрольной камере. Степень эффективности будет контролироваться на основе сокращения или полной по-

тери инвазийной способности системы клеточной культуры для обработанных образцов по сравнению с позитивными необработанными контрольными образцами.

## Материалы и методы

### Вирус и клетки.

Низкопатогенный птичий грипп H5N8, любезно предоставленный Центром по предупреждению и контролю за вспышками заболеваний, Атланта, ГА, вводился в куриные яйца с 10-дневным эмбрионом (Канзасский государственный университет, Департамент изучения домашней птицы, Манхеттен, Канзас) в количестве приблизительно 107 log<sub>10</sub> TCID50 (как определяется в Madin Darby Canine Kidney, MDCK-клетках почечного эпителия). Клетки сохранялись в минимальной питательной среде с соевым раствором Эрла и L-глутамином (Invitrogen Corporation, Карлсбад, КА) и 2.2 г/л бикарбоната натрия (Fisher Scientific, Хэмптон, Нью-Гемпшир), обозначаемой как МПС, с 10-процентным содержанием эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, Hyclone Laboratories, Логан, Юта), дополненный антибиотиками: 2.5 мг/л амфотерицина В, 0.67 г/л стрептомицина, и 0.3 г/л пенициллина G - всё из лаборатории Fisher Scientific). Инвазийная среда была создана путем добавления МПС, дополненной 0.1% ТРСК, обработанного трипсином (Fisher Scientific) и дополненного антибиотиками (2.5 мг/л амфотерицина В, 0.67 г/л стрептомицина и 0.3 г/л пенициллина G).

### Инактивация вируса H5N8

Две пластины (2 x 10 см, толщина 0.8 мм) из нержавеющей стали 302 (McMasterCarr, Атланта, GA) были стерилизованы в автоклаве в течение 15 минут при 121°C. В шкафу с биологической безопасностью класса II, 100 мл зараженных H5N8 яиц были помещены на каждую пластину и при помощи тонкого конца пипетки были распределены по всей поверхности пластины, а затем полностью высушены в течение приблизительно 10-15 мин. После этого пластины с инокулятом были помещены в стерильный транспортировочный контейнер и перенесены в камеру для тестирования. Внутри камеры одна из тестируемых пластин была прикреплена зажимами таким образом, чтобы обе её стороны одновременно подвергались обработке матрицей беспримесной активной очистки (Active Pure-Cell™). Другая пластина использовалась в качестве первоначального контрольного образца. Затем устройство очистки Active Pure-Cell™ было включено, и образцы отбирались с различными интервалами времени (2, 4, 8, 12, 24 часа) путем извлечения тестовых пластин и подготовки их для репродукции (восстановления) вирусов, как описывается ниже.

### Репродукция вируса.

Вирус H5N8 был изъят с поверхности обеих нержавеющей пластин путем помещения их в стерильные конусообразные 50-миллиметровые сосуды (Fisher Scientific), содержащие 5 мл инвазийной среды. Трубки встряхивались в течение 1 минуты. Затем конечное разжиженное титрование было введено в MDCK-клетки путем слияния 5 мл инвазийной среды, содержащей взвешенный вирус, и 220 мл клеточной субстанции. Результат был помещён в первую лунку 96-луночной микротитровой пластины, содержащей раствор MDCK-клеток. Затем была подготовлена серия растворов 1:10 путем добав-

ления 20 мл из первой лунки в следующие 6 лунок, содержащая по 180 мл инвазивной среды. Последняя лунка, содержащая 200 мл инвазивной среды, служила для контроля. Пластины были инкубированы при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов. Цитопатический эффект (ЦПЭ) был определен для каждой лунки, и подсчет вирусов был представлен в виде TCID<sub>50</sub>/мл согласно методу Reed-Muench [3].

Реальное время обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (RT-PCR).

Вирусная РНК была восстановлена с использованием минимального набора QIAamp вирусной РНК (Qiagen, Валленсия, Калифорния). Количественное определение извлеченной РНК вируса гриппа было проведено с применением RT-PCR с использованием флуоресцентного зонда марки TaqMan. Технология RT-PCR и порядок зондирования любезно предоставлены отделением молекулярной генетики гриппа Центра по предупреждению и контролю над вспышками заболеваний, Атланта, Джорджия. Для выявления РНК вируса гриппа был выбран порог превышения флуоресцентного сигнала FAM > 3 с применением термоциклера SmartCycler.

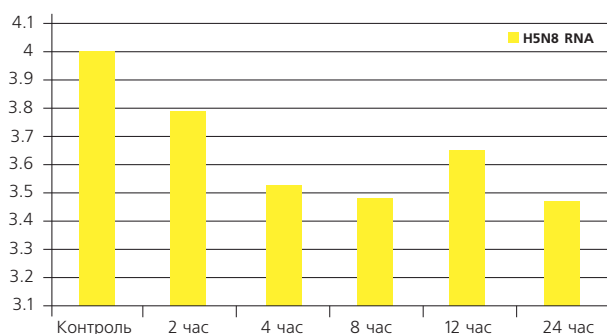
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Среднее значение количества вирусов H5N8, восстановленных с контрольной пластины из нержавеющей стали, во всех экспериментах составляло 5.35 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/мл (рис. 1, первый столбец "Контроль").

В результате обработки при помощи системы активной беспримесной очистки Active Pure-Cell™, средние значения гибели (сокращения) вируса H5N8 составили 1.85, 2.79, 4.16, 5.35 и 5.35 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/мл по прошествии соответственно 2, 4, 8, 12 и 24 часов обработки (рис. 1, последующие столбцы). Данные получены на основе репродукции (восстановления) инфекционного вируса после эксперимента.

Среднее значение РНК вируса H5N8, восстановленного с контрольной пластины из нержавеющей стали составляло во всех экспериментах 4.00 log<sub>10</sub> на основе оценки обратной транскрипции полимеразной цепной реакции, присутствующей для вирусов гриппа А (рис. 2, первый столбец "Контроль").

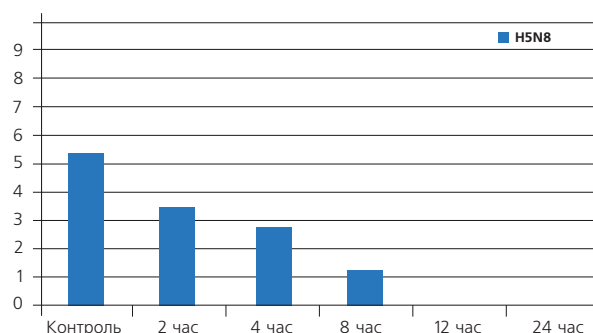
В результате обработки с применением технологии Active Pure-Cell™, средний логарифм гибели (сокращения) вируса H5N8 на основе значения восстановленной РНК варьировался от 0.23 до 0.54 log<sub>10</sub> по всему времени экспонирования



**Рис. 2. Результат репродукции РНК H5N8 после обработки методом активной беспримесной очистки (Active Pure-Cell™) на основе оценки обратной транскрипции полимеразной цепной реакции**

вания, т. е. после 2, 4, 8, 12 и 24 часов обработки (рис. 2).

Как следует из сравнения графиков, механизм воздействия на потерю инвазивной способности вирусов оказался более многообещающим в результате разрушения липидной оболочки или структурных протеинов (рис. 1), нежели при



**Рис. 1. Результаты репродукции вируса H5N8 после обработки методом активной беспримесной очистки (Active Pure-Cell™) в разрушении вирусной нуклеиновой кислоты (рис. 2).**

## ОБСУЖДЕНИЕ

Желая лучше понять процесс инактивации вируса гриппа с применением технологии Active Pure-Cell™, оценка эффективности выполнялась с применением низкопатогенного изолята птичьего гриппа H5N8, инокулированного на поверхности пластин из нержавеющей стали. Эффективность инактивации определялась в соответствии с действующими рекомендациями Управления по охране окружающей среды касательно определения вирусной дезинфекции [2], которые регламентируют методику репродукции обработанного вируса в виде конечного разбавленного раствора, включая восстановительную пробу TCID<sub>50</sub> инфекционного вируса. В дополнение к восстановлению вируса при помощи специфической пробы количества обратной транскрипции полимеразной цепной реакции для вирусов гриппа А в экспериментах мы хотели определить, происходит ли какое-либо разрушение РНК вируса.

На основе действующих рекомендаций Управления по охране окружающей среды, чтобы достигнуть сокращения > 4.0 log<sub>10</sub> в начальной вирусном титре [2], была проведена обработка по технологии активной беспримесной очистки Active Pure-Cell™ в течение 8 часов или более, приведшая к успешной инактивации изолята H5N8 (рис. 1) относительно уровня начального заражения в 5.35 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/мл. Дополнительное тестирование может потребоваться для определения того, не может ли меньшее время экспонирования приводить к полной инактивации при уровнях заражения меньше, чем 5.35 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/мл, что могло бы быть более типичным показателем при реальной вспышке заболевания [1, 5].

Результаты количественной обратной транскрипции полимеразной цепной реакции показывают, что разрушение вирусной РНК (рис. 2) не являлось главным механизмом в вирусной инактивации, поскольку уровни восстановленной РНК после каждого времени обработки не отличались существенно образом один от другого, P > 0.05. Другие возможные компоненты поражения вируса включают липидную оболочку и структурные протеины, которые были повреждены более эффективно при помощи обработки по технологии Active Pure-Cell™. Окислительный механизм данной обработки, вероятно, разрушил относительно чувствительную оболочку и смог привести к изменению свойств поверхностных структурных протеинов вируса гриппа, необходимых для успешного присоединения, и входного механизма, важного для инвазионной способности.

Результаты, полученные в данном исследовании, показывают, что обработка при помощи системы Active Pure-Cell™ в течение 8 часов приводит к необходимому уровню инактивации изолята птичьего гриппа H5N8, который использовал-

ся в качестве безопасного суррогата высокопатогенного изолята H5N1. Механизм действия данной технологии, вероятно, обусловлен химией окисления, которая приводит как к разрушению липидной оболочки, так и к эффекту изменения свойств структурных вирусных протеинов, необходимых для вирусной репродукции.

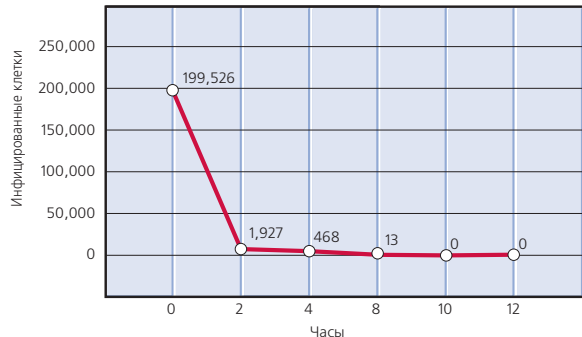
## ССЫЛКИ

1. Б. Бин, Б. М. Мур, Б. Стернер, Л. Р. Пересон, Д. Н. Джердинг и Г. Ж. Балфоур. 1982. Выживание вирусов гриппа на поверхностях окружающей среды. Журнал инфекционных заболеваний, 146: 47-51.
2. Управление по охране окружающей среды. 2005. Научно-технический раздел научной политики противомикробной дезинфекции. [Он-лайн.]
3. Л. Ж. Рид и Г. Мунч. 1932. Простой метод для оценки 50% конечных точек. Американский журнал гигиены 27: 493-497.
4. Р. Тейлер. 2006. Обзор передачи вируса гриппа А воздушно-капельным путем. Развивающиеся инфекционные заболевания, 12.
5. ВОЗ. 2006. Нефармацевтические методы борьбы с пандемическим гриппом, Международные меры. Развивающиеся инфекционные заболевания, 12: 81-87.
6. П. Ф. Райт и Р. Ж. Вебстер. 2001. Ортомиксовирусы, Четвертое издание, Том 1. Lippincott Williams & Wilkins, Филадельфия.

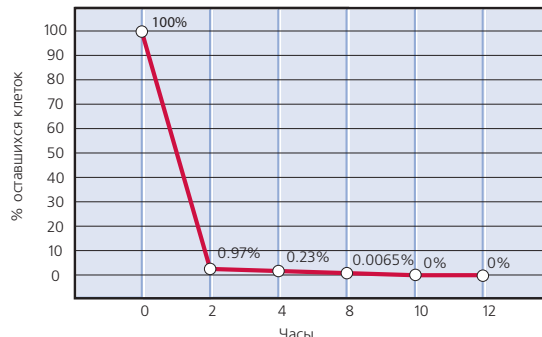
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ АКТИВНОЙ БЕСПРИМЕСНОЙ ОЧИСТКИ (ACTIVE PURE)

Государственный университет Канзаса, Манхеттен, штат Канзас США

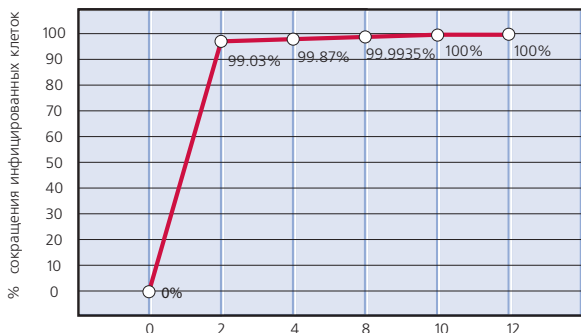
Инактивация птичьего гриппа А (H5N8) при помощи технологий активной беспримесной очистки Active Pure  
Количество инфицированных клеток  
в зависимости от времени



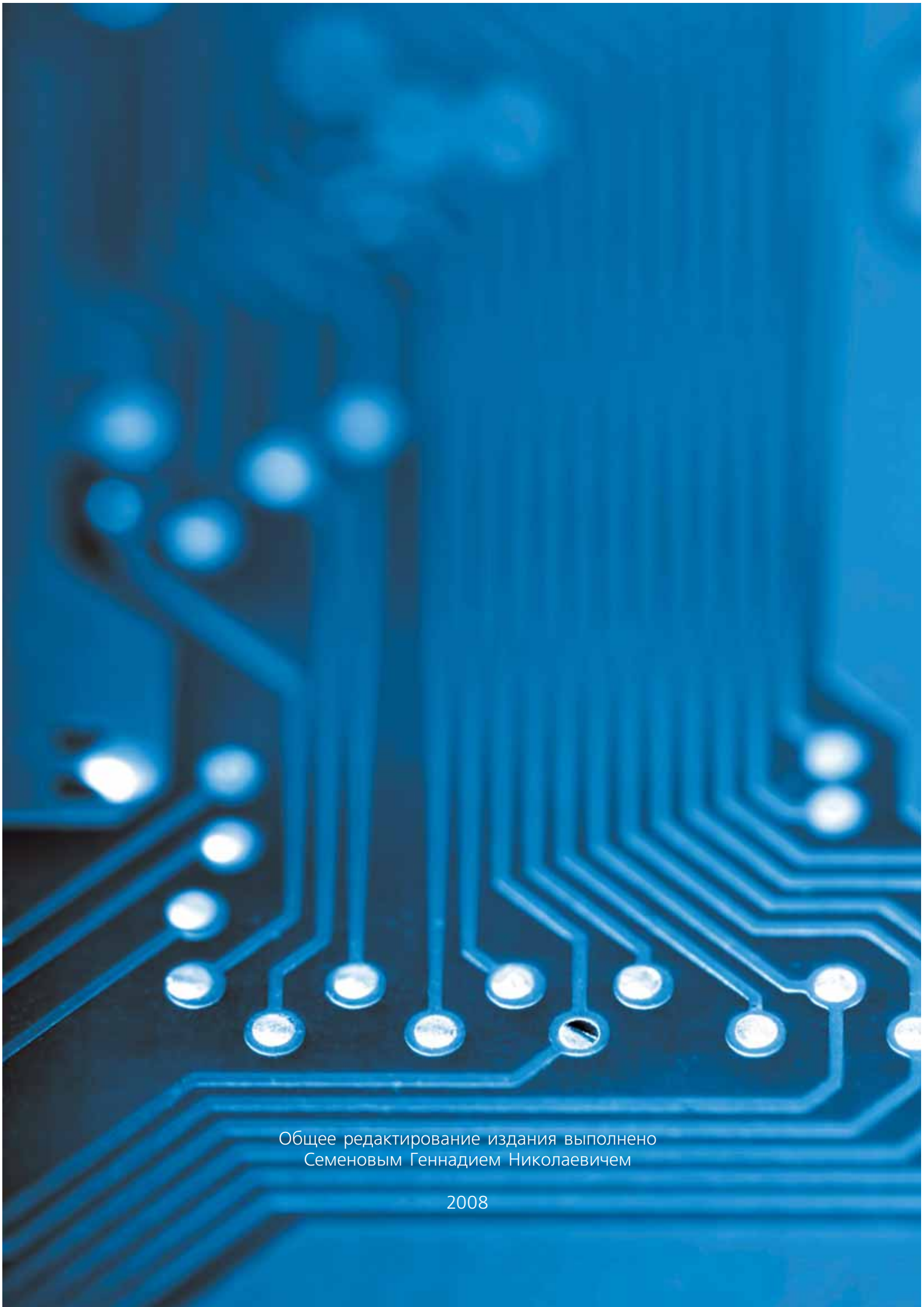
Инактивация птичьего гриппа А (H5N8) при помощи технологий активной беспримесной очистки Active Pure  
% оставшихся инфицированных клеток  
в зависимости от времени



Инактивация птичьего гриппа А (H5N8) при помощи технологий активной беспримесной очистки Active Pure  
% уменьшенных инфицированных клеток  
в зависимости от времени



Научные исследования показали эффективность применения технологии активной беспримесной очистки Active Pure, разработанной компанией EcoQuest, для сокращения популяции микробов на поверхностях. Результаты могут варьироваться в зависимости от условий окружающей среды. В отношении микробов, переносимых по воздуху, выводы на основании этих результатов не делались. Данные результаты не оценивались Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США. Данная технология не является медицинским методом, предназначенным для диагностирования, исследования, лечения или предупреждения какого-либо заболевания.



Общее редактирование издания выполнено  
Семеновым Геннадием Николаевичем

2008