



sartorius

**Sakupljanje virusa i faga iz zraka korištenjem metode
želatinoznih membranskih filtera**



Sakupljanje virusa i faga metodom želatinoznih membranskih filtera

Uvod

Na osnovu iskustva dobivenog sakupljanjem bakterija u zraku (Petras 1966, 1967; Rotter i Koller 1974), u testovima koji su se provodili se uspoređivala učinkovitost uređaja za sakupljanje i standardnih sabijača zraka (model AGI-30) sa želatinoznim filterima za uzorkovanje aerosola sa virusima.

Ovi radovi su imali dva zadatka:

- Pronaći standardnu metodu za filtraciju aerosola virusa i obradu filtera koji se koriste za sakupljanje virusa
- Testirati koliko su filteri pogodni za uzorkovanje većih volumena

Materijali i Metode

Pokusi su rađeni sa eksperimentalno napravljenim statičkim aerosolima sa T1 coli fagima (visoka stabilnost kroz širok raspon vlažnosti), T3 coli fagima i A/PR/8/34 (H1 N1) virusima prehlade (influenza viruses). Aerosoli su se radili u pokusnim komorama volumena 50 m³, temperatura i relativna vlaga su se mogle podesiti po potrebi, korištenjem mlaznog atomizatora sa odbojnikom (veličina čestica <5 μm). Aerosoli su filtrirani pomoću 12602 želatinoznih membranskih filtera instaliranih u držač 16711 sakupljača (Collectron, prethodni model MD8 airscan Air Samplera). Kod većih protoka, uređaj se izmjenično koristio sa dvije paralelno spojene vakuum pumpe (trenutno postojeći Sartorius MD8 airscan Air Sampler je prilagođen velikim protocima).

Standardni radni postupci i volumen uzorka određeni su radnim principima primijenjenog kolektora na oba kolektora i AGI-30 impinger (sabijač zraka).

Kvantitativno određivanje sakupljenih čestica faga radilo se pomoću agar overlay metode (plak metode), titriranjem virusa prehlade pomoću inkubiranog jajeta (Mayr et al. 1974, 1977) ili pomoću testa hemadsorpcije nakon uzgoja tumorskih stanica (Adamczyk et al. 1975).

Rezultati

I. Standardna procedura za uzorkovanje virusa filtracijom zraka i obradom filtera (rezultati za aerosole T1 virusa prehlade)

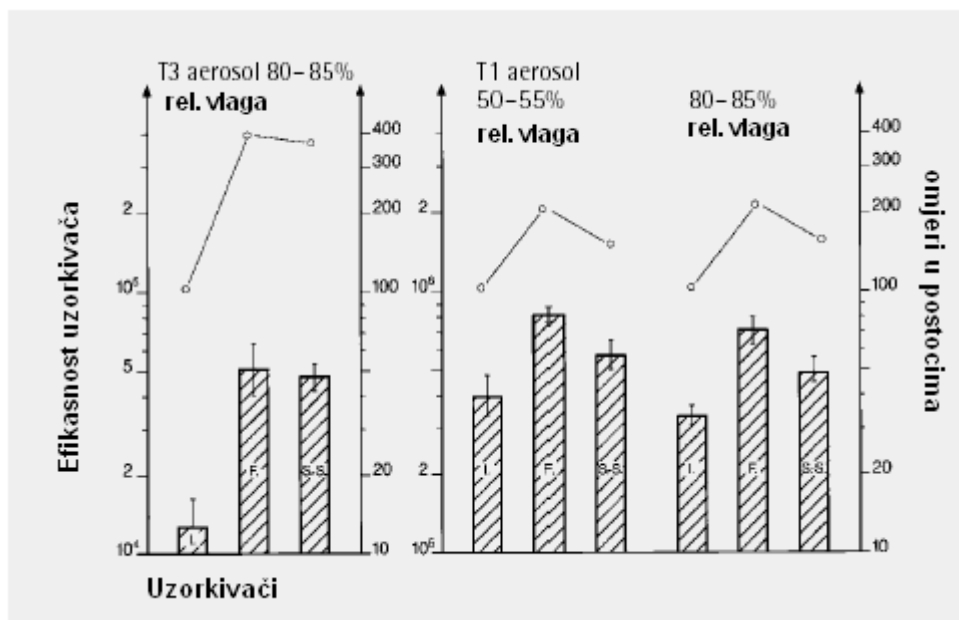
Brzina protoka preko filtera od 0.1–0.4 m/s nije utjecala na učinkovitost filtracije na infektivne jedinice I.U./l zraka. Zbog toga je za protok od 22.5 l/min preporučena brzina protoka od 0.3 m/s, za vrijeme uzorkovanja virusa nepoznate stabilnosti 1–2 minute. Filter koji se koristio u radu, a nije bio zahvaćen relativnom vlagom do 85%, pokazuje visoku stopu zadržavanja od 99.9% ili bolje.

Najčešća metoda koja se koristi za određivanje broja bakterija u zraku, pomoću direktnog nasađivanja želatinoznog filtera na hranjivu podlogu, je neizvediva za određivanje broja virusa. U kasnijim slučajevima uočeno je da je praktičnije otopiti filter u odgovarajućem otapalu, a onda tu mješavinu dobro promiješati na tresilici kako bi se razdvojili eventualni agregati mikroorganizama / virusa.

Slijedeći opisani postupak je pokazao veoma veliku efikasnost. Kako biste otopili filter, stavite ga u Erlenmeyerovu bocu širokog grla, volumena 200ml, gdje ste prethodno pomiješali 20 ml ^m/15 fosfatnog pufera sa pH 7.2 i oko 40 staklenih kuglica promjera 2.5 mm. Bocu stavite na tresilicu podešenu na odgovarajuću brzinu, te ostavite da se miješa na sobnoj temperaturi 5 minuta. Volumen puferske otopine može se smanjiti na 2.5 ml, kako bi se dobila otopina sa većom koncentracijom infektivnih čestica. U ovom postupku filter se potpuno otopi.

II. Komparativno uzorkovanje T1 i T3 aerosola korištenjem želatinoznih filtera, sabijača zraka i impingera, prema standardnim procedurama

Za oba aerosola faga, učinkovitost sve tri metode sakupljanja podliježu pravilu $V_F > V_{I-C} > V_I$ (Slika 1), što odgovara filteru. Razlike proizlaze iz raspona njihovih efikasnosti. Za T3 aerosol, $V_F > V_{I-C} > V_I$ je bio 4,02 : 3,76 : 1, a razlika između filtera i sabijača zraka je bila neznatna. Omjer za T1 aerosol bio je 2,04 : 1,44 : 1 (kod 50% relativne vlažnosti zraka); razlika je bila značajna, 1% vrijednosti. Poredak efikasnosti sakupljanja je potvrđen za koncentracije aerosola u rasponu od 10^8 – 10^5 čestica faga/m³ zraka, a to je i donja granica detekcije za aerosole faga za sve tri metode sakupljanja, korištenjem standardne procedure.

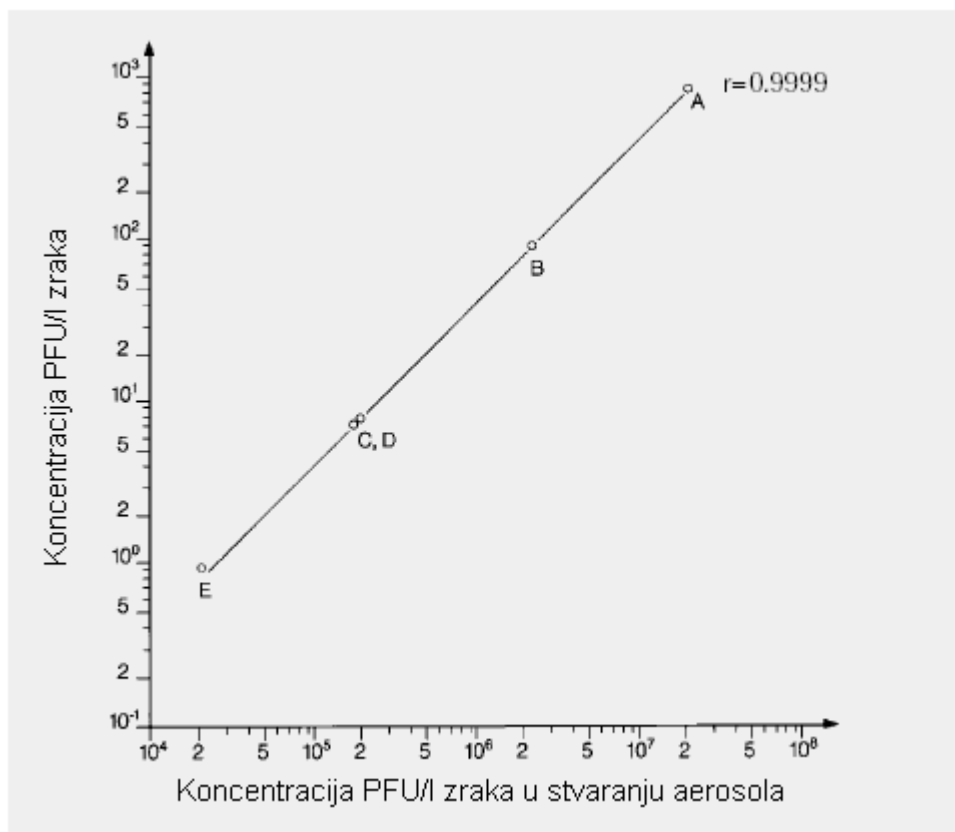


Usporedba efikasnosti sakupljanja između AGI-30 impingera (I), želatinoznog filtera (F), i sabijača zraka (I-C) za T1 i T3 aerosole.

III. Uzorkivanje velikih volumena aerosola virusa želatinoznim membranskim filterima

Uzorkivanje velikih volumena, kao preduvjet za određivanje malih koncentracija viralnih čestica (virion), može teoretski biti dostignuto na slijedeći način:

- povećanje protoka kroz specifično vrijeme
- produžavanje perioda uzorkovanja



Veza između koncentracije čestica faga/ml tekućine za proizvodnju aerosola i broja I.U./l zraka, koja proizlazi iz sakupljanja želatinoznim filterom. T1 aerosoli kod 50–55% relativne vlage i 20 °C.

A–E pokazuju uvjete sakupljanja:

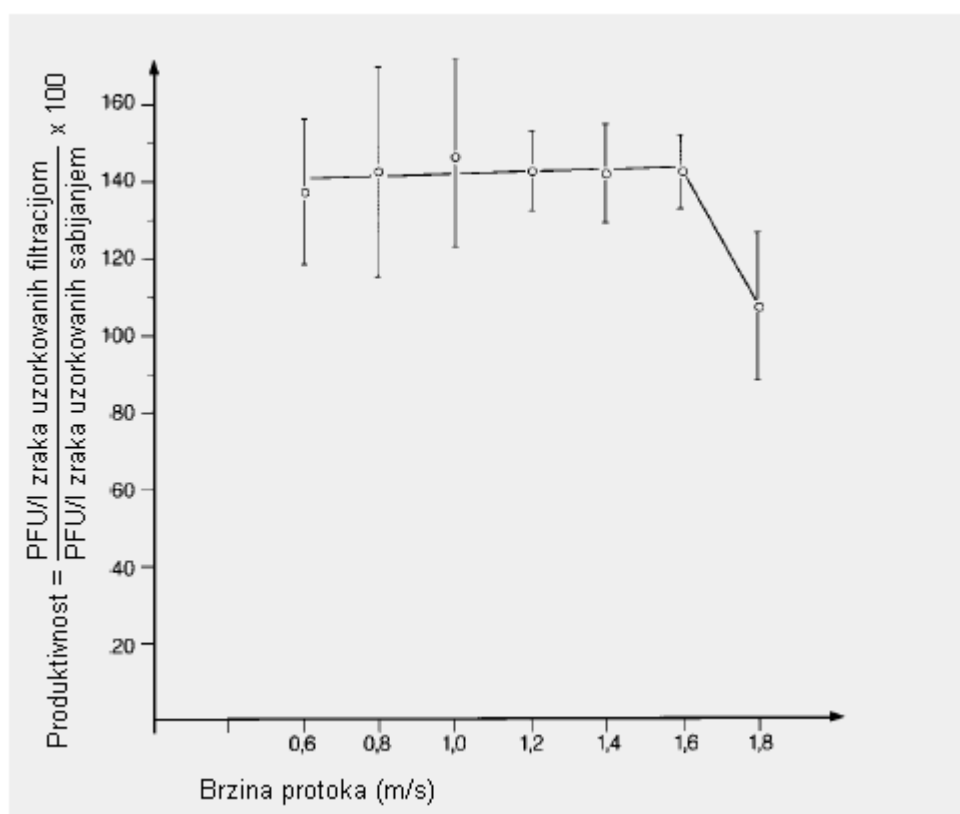
- A Standardni postupak
(vidi opće informacije)
- B Vrijeme uzorkovanja: 5 min,
volumen otopine: 20 ml
- C Vrijeme uzorkovanja: 15 min,
volumen otopine: 20 ml
- D Vrijeme uzorkovanja: 5 min,
volumen otopine: 5 ml
- E Vrijeme uzorkovanja: 15 min,
volumen otopine: 5 ml

1. Prođuđavanje perioda uzorkovanja (rezultati za aerosole T1 i virusa A prehlade):

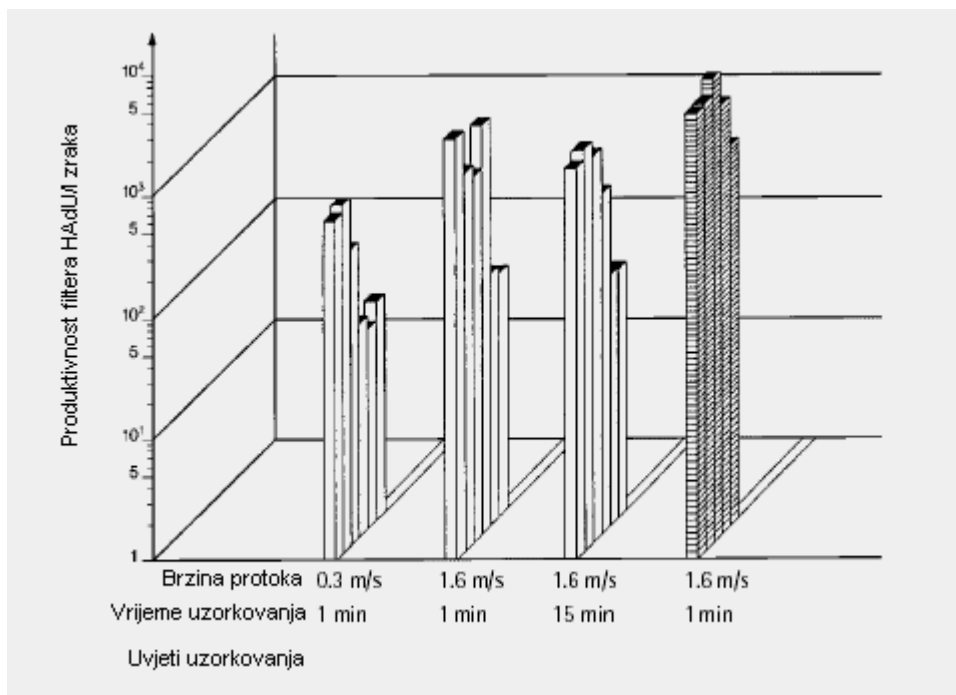
Uzorkovanje zraka kroz 15 minuta kod brzine protoka 0.3 m/s kroz filter (odgovara 337.5 l uzorkovanog zraka) nije utjecalo na inaktivaciju sakupljenih viriona. Ovo pokusno uzorkovanje, zajedno sa smanjenjem volumena puferske otopine za dobivanje veće koncentracije čestica viriona/ faga, potvrdilo je matematičku teoriju po kojoj donja granica detekcije može biti prebačena u raspon 10^2 I.U./m³ zraka (Slika 2).

2. Uzorkovanje aerosola virusa korištenjem povišenog protoka:

Testovi mehaničkog stresa koji su izvedeni na želatinoznim filterima kod povećane brzine kod otvora (do 1.8 m/s, što je jednako 135 l/min) i pod ekstremnim uvjetima rada (30°C maks., 90% relativne vlage), potakli su nas da testiramo stabilnost virusnih aerosola pod ovakvim teškim uvjetima uzorkovanja. Iznenađujuće, brzine kod otvora su se mogle povećati do 1.6 m/s bez velikog utjecaja na efikasnost filtera. Za T1 aerosol, produktivnost filtera u odnosu na standardni AGI-30 impinger, korišten kao referenca, je bila 140% (Slika 3). Kod 1.8 m/s, produktivnost je pala na 107% impingera. Izračunavanjem Reynoldsovog broja za zračne struje moguće je pronaći i pratiti uzrok pada produktivnosti do fizikalnog uplitanja procedure uzorkovanja, uzrokovanog turbulencijom zraka. T1 coli fagi i virusi prehlade A (Slika 4) pokazali su visok nivo stabilnosti čak i tijekom 15-minutnog perioda uzorkovanja.



Produktivnost
želatinoznog filtera
nakon uzorkovanja T1
aerosola na 20°C i
55% relativne vlage
kao funkcija brzine
protoka kroz filter.



Uspješnost želatinoznog filtera u sakupljanju aerosola virusa prehlade kao funkcija brzine protoka i vremena uzorkovanja (6 pokusa).

Štoviše, sa T1 coli fagima, potvrđeno je da je uspješnost sakupljanja konstantna pod strogim uvjetima uzorkovanja zraka, čak i kod 90% relativne vlage. Važno je napomenuti da sposobnost filtera da zadrži T1 aerosole ostaje na prosječnom nivou od 99.82% čak i kod ekstremnih stresova. Testirani maksimalni stres filtera dostignut je kod brzine protoka kod otvora od 1.6 m/s tijekom perioda uzorkivanja od 15 min na 30°C i 80–85% relativne vlage. Za T1 aerosole, rata zadržavanja filtera je u prosjeku 99.76%.

Čvrstoća, stabilnost, i rukovanje filterima su se mijenjali pod ovim drugačijim uvjetima.

Rub filtera je bio vlažan od kapi kondenzirane vlage. Filter je promijenio čvrstoću, postao je poput gume, no nije se lijepio za držač filtera i lako se odvajao sa njega.

SEM mikrofografije pokazale su da su mrežolike strukture membrane tako nabubrile da se promjer filtera povećao do dva-tri puta pod ovim posebnim uvjetima. No, osnovna struktura filtera je ostala stabilna.

Procjena

S obzirom na uspješnu upotrebu želatinoznih filtera u sakupljanju bakterija iz zraka, testirana je i njihova uspješnost u sakupljanju virusnih aerosola.

Želatinozni filter omogućava sigurnu metodu sakupljanja za čitav niz bioloških aerosola (bakterije, plijesni i virusi).

Prednosti upotrebe filtera kod sakupljanja u detekciji virusa:

- Jednaka efikasnost sakupljanja kod različitog protoka/min.
- Visoka sposobnost zadržavanja filtera i pod ekstremnim uvjetima rada (ekstremna temperatura i relativna vlažnost zraka).

- Želatinozni filter se ponaša kao zaštitna ovojnica virusa, čuvajući viruse od inaktivacije
- Metoda želatinoznih virusa ne ovisi o koncentraciji virusa.
- Metoda ne zahtjeva puno posla ni materijala, ni prije ni tijekom ni nakon samog postupka i evaluacije.
- Sakupljeni virusi se mogu kultivirati paralelno na različitim vrstama stanica.

Literatura:

Adamczyk, B.; Adamczyk, C.; Millhahn, J.: Schnellnachweis von Influenzavirus A auf Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumorzellen mit der Hämasorptionsmethode (Quick detection of the influenza A virus on mice ascites tumor cells using the hemadsorption method). Dtsch. Gesundheitswes., Berlin **30** (1975), pp. 2439–2443.

Adams, M.H.: Methods of study of bacterial viruses, Meth. Med. Res., Chicago **3** (1950) Sect. I., pp. 1–73.

Koller, W.; Rotter, M.: Weitere Untersuchungen über die Eignung von Filtern zur Sammlung von Luftkeimen (Further studies on the suitability of filters for collecting airborne microbes), Zbl. Bakt. I. Orig. B, Stuttgart **159** (1974), pp. 546–559.

Mayr, A.; Bachmann, P.A.; Bibrack, B. et. al.: Virologische Arbeitsmethoden (Virological working methods), Bd. I u. Bd. II Jena 1974, 1977.

Petras, E.: Zur Isolierung von Luftkeimen mittels feinporiger Filter (Isolating airborne microbes using a fine-pored filter), Arch. Mikrobiol., Berlin **55** (1966/67), pp. 93–109.

Rotter, M.; Koller, W.: Sammlung von Luftkeimen mit Gelatine-Filtern (Collecting airborne particles using gelatin filters), Zbl. Bakt. I. Orig. B. Stuttgart **157** (1973), pp. 257–270.

Autorova adresa:

Dr. Helmut Jaschhof,

PhD in Natural Sciences

Gerhard-Katsch-Str. 14

17489 Greifswald

Germany

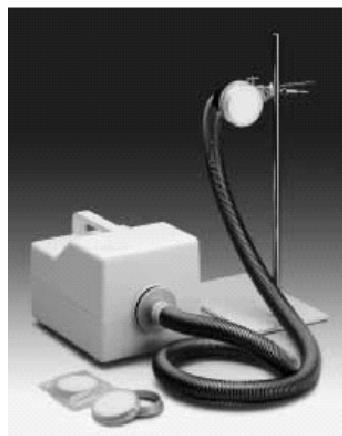
Opće informacije o sakupljanju virusa i faga korištenjem metode želatinoznih membranskih filtera

Koraci postupka

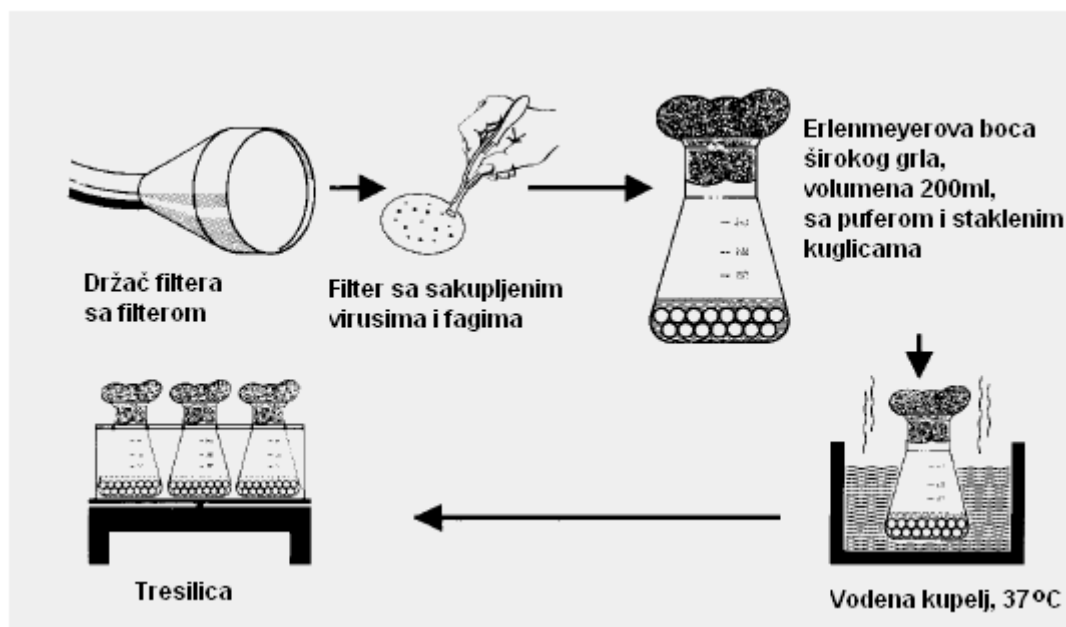
I. Sakupljanje virusa i faga:

MD8 airscan Air Sampler sa želatinoznim filterima promjera*
80 mm

* Podatak je dobiven pomoću predecessor modela 16711 sa
50 mm želatinoznim filterom



II. Obrada želatinoznih membranskih filtera njihovim otapanjem i rastresanjem u otopini:



III. Detekcija virusa i faga:

IV. Stabilizacija virusnog aerosola čuvanjem korištenog filtera do obrade:

Standardni postupak		Komentari Dodatni koraci za standardni postupak
Protok kroz 12602 želatinozni membranski filter	22.5 l/min (50 mm Ø) 69.3 l/min (80 mm Ø) (odnosi se na izlaznu brzinu od 0.3 m/sec.)	Za izabrane virusne aerosole, povećajte protok do barem 120 l/min za 50 mm Ø ili 369 l/min za 80 mm Ø (odnosi se na ulaznu brzinu na filteru od 1.6 m/s)
Vrijeme uzorkovanja	1–2 min	Za izabrane virusne aerosole i sa većim protokom/min, prolongirajte na barem 15 min
Propusnost filtera	$10^{-1} - 10^{-2}$ %	Ovo se također odnosi na povećani protok/ min
Raspon vlažnosti	do 90%	Testirano samo sa 50 mm Ø filterom
Raspon temperature	do 30°C	Testirano samo sa 50 mm Ø filterom
Posuda za tresenje	200 ml Erlenmeyer boca širokog grla sa 40–10 staklenih kuglica promjera 2.5 mm	80 mm Ø filteri stavljaju se u bocu samo nakon što se razbiju na više dijelova
Medij za otapanje filtera	^m /15 fosfatni pufer, pH 7.2	Za viruse koji su osjetljivi na kiseline, bolje je koristiti pH 7.6 jer želatinozni filter blago snižava pH.
Volumen medija	20–5 ml	Testirano za 50 mm Ø filter do 2.5 ml
Temperatura otapanja	37°C u vodenoj kupelji	
Vrijeme otapanja	5 min kad se ostavi da stoji	
Vrijeme trešnje	5 min	Za izabrane viruse, vrijeme trešnje može se produžiti do 60 min bez inaktivacije.
Dokazana metoda korištenjem kultura stanica: filtracija faga bazirana na metodi prelijevanja agarom (plaque metoda); virus gripe inokulacijom inkubiranih jaja, FL kulture stanica i kulture tumorskih stanica i određivanje virusa pomoću HAT, CPE i HadT prema uobičajenim tehnikama (Mayr et al. 1974, 1977)		
Virus gripe Filtrirano u vlažnom stanju, u 5 ml otopine za čuvanje sa pH 7.6 na +4°C (200 ml Erlenmeyer boca)	Poluvrijeme inaktivacije: 41.5 sati (30% stopa preživljavanja nakon 72 sata)	Samo 1.2% stopa preživljavanja nakon što su prirodno vlažnim filterima čuvani 72 sata na +4°C