

Nowatorskie metody dekontaminacji urządzeń medycznych skażonych prionami

Guillaume Fichet, Emmanuel Comoy, Christelle Duval, Kathleen Antloga, Capucine Dehen, Aurore Charbonnier, Gerald McDonnell, Paul Brown, Corinne Ida Lasmézas, Jean-Philippe Deslys

Lancet 2004; 364: 521–26

Abstrakt

Wprowadzenie Bezprecedensowa odporność prionów na klasyczne metody dekontaminacyjne oraz możliwość przenoszenia chorób prionowych drogą jatrogenną za pośrednictwem urządzeń medycznych stanowią ogromne wyzwanie dla służb kontroli zakażeń w placówkach służby zdrowia. Ze względu na szeroką dystrybucję tkankową czynnika zakaźnego wywołującego wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba u ludzi, istnieje pilna potrzeba opracowania nowych procedur dekontaminacyjnych możliwych do zastosowania w praktyce.

Metody Dostosowaliśmy do potrzeb badania metodę *in vivo* wykorzystującą pręty ze stali nierdzewnej skażone prionami szczepu 263K wywołującego trzęsawkę (skrapie) i zaadaptowanego do organizmu chomika. Aby zbadać mechanizm działania ocenianych strategii dekontaminacyjnych, stworzyliśmy nowy protokół skażenia powierzchni *in vitro*, kompatybilny ze stosowanymi następnie biochemicznymi sposobami detekcji PrP^{res} (białko prionowego oporne na działanie proteaz) na powierzchniach poddanych działaniu danej procedury. Zastosowane modele posłużyły ocenie skuteczności nowatorskich metod fizycznych i chemicznych wykorzystywanych do inaktywacji prionów.

Wyniki Wykazano, że standardowe metody dekontaminacji chemicznej (NaOH 1N, NaOCl 20 000 ppm) oraz autoklawowanie w wodzie w temperaturze 134°C obniżają infekcyjność o >5.6 log¹⁰ dawek śmiertelnych; autoklawowanie bez zanurzenia okazało się nieco mniej skuteczne (redukcja o 4 – 4.5 log). Trzy łagodniejsze metody dekontaminacyjne, w tym środek dezynfekujący na bazie fenoli, alkaliczny preparat czyszczący oraz połączenie środka enzymatycznego z gazowym nadtlaniem wodoru (VHP) także okazały się skuteczne. VHP stosowane oddzielnie, dzięki czemu zostaje zachowana kompatybilność z urządzeniami elektronicznymi, prowadziło do redukcji infekcyjności o około 4.5 log (co odpowiada skuteczności autoklawowania bez zanurzenia w wodzie).

Dyskusja Proponowane są nowe procedury dekontaminacyjne zapewniające bezpieczeństwo sprzętu medycznego i chirurgicznego oraz powierzchni, które nie mogą być poddawane zalecanym obecnie metodom unieszkodliwiania prionów.

Wprowadzenie

Kiedy w Wielkiej Brytanii w 1996 roku odnotowano pierwsze przypadki wariantu choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD) związane ze spożyciem produktów mięsnych zakażonych BSE (encefalopatia gąbczasta bydła), pojawiły się też obawy, że poprzez zabiegi medyczne lub produkty biologiczne pochodzenia ludzkiego (w tym krew) pacjenci mogą być narażeni na wtórne zakażenie patogenem wywołującym BSE/vCJD. Cechy zakaźności wykazano w przypadku wielu tkanek obwodowych pochodzących od chorych z vCJD. W odróżnieniu od sporadycznej postaci choroby Creutzfeldta-Jakoba (sCJD), biochemiczny marker choroby prionowej (PrP^{res}, białko prionowe odporne na proteazy, patologiczna postać białka prionowego) znajdowano tym razem w narządach układu limfatycznego, w tym w śledzionie, migdałkach, grasicy i

wyrostku robaczkowym (1, 2). Wykazano też, że w przypadku vCJD u naczelnych poza ludźmi, PrP^{res} jest obecne w śluzówce jelita i w nerwach obwodowych (3). Zagrożenie jatrogenne związane z vCJD zyskało niedawno na wiarygodności w związku z doniesieniem o prawdopodobnym przypadku zakażenia poprzez transfuzję krwi (4).

Doprowadziło to do wdrożenia środków zapobiegawczych w odniesieniu do produktów krwiopochodnych, przeszczepów tkankowych oraz sterylizacji narzędzi chirurgicznych. Istnieją wcześniejsze doniesienia o kilku przypadkach jatrogennej transmisji sCJD za pośrednictwem narzędzi neurochirurgicznych lub w związku ze skażeniem elektrod (5, 6). Aby uniknąć podobnych zdarzeń w przyszłości, wprowadzono stosowne uregulowania dotyczące ponownego użycia i

dekontaminacji narzędzi do neurochirurgii (7-9). Uregulowania te opierają się na zaleceniu stosowania narzędzi jednorazowych lub narzędzi poddawanych najbardziej drastycznym procedurom dekontaminacyjnym – np. zanurzenie w 1N roztworze NaOH na 1 godzinę, a następnie autoklawowanie w temperaturze 134° przez 18 minut (specjalny tryb dostarczania pary dla porowatego wsadu) (9). Jeśli to tylko możliwe, podobne metody powinny być stosowane w odniesieniu do wszystkich narzędzi chirurgicznych i urządzeń endoskopowych. Niestety wykonalność takiego rozwiązania jest ograniczona przez korozyjne działanie NaOH i NaOCl oraz niemożność autoklawowania elementów plastikowych, gumowych, przegubowych i elektronicznych (10).

Istnieje więc pilna potrzeba opracowania nowych procedur i nowych środków chemicznych, równocześnie skutecznych i praktycznych w dekontaminacji narzędzi i powierzchni. W większości dotychczasowych badań nad inaktywacją prionów, jako inokulum w standardowych testach infekcyjności wykorzystywano pozostałości badanych materiałów (7, 8), choć w badaniu osocza frakcjonowanego metodą Cohna wykazano silną korelację pomiędzy infekcyjnością a PrP^{res} (11).

Opisywany przez innych autorów system zakładający wykorzystanie stalowych prętów, naśladuje kontakt narzędzia chirurgicznego z żywą tkanką (12, 13). Tę strategię zastosowaliśmy w badaniu metod inaktywacji prionów związanych z powierzchniami. Przetestowaliśmy kilka procedur dekontaminacyjnych i kilka środków chemicznych, a następnie opracowaliśmy trzy nowe protokoły inaktywacji. Można je stosować w odniesieniu do delikatnych urządzeń i powierzchni, a skutecznością dorównują lub przewyższają autoklawowanie w temperaturze 134°C przez 18 minut.

Metody Zwierzęta

W badaniu wykorzystano 6-tygodniowe samice chomika syryjskiego (Charles River, Francja) (14, 15). Wszystkie zwierzęta trzymane w pomieszczeniach laboratoryjnych o 3 stopniu bezpieczeństwa biologicznego, przeznaczonych do eksperymentalnych badań prionowych z udziałem gryzoni (umowa numer A 92-032-02 dotycząca zwierzętarni, umowa numer 920189 dotycząca badań na zwierzętach).

Materiał zakaźny

Adaptowany szczep 263K wywołujący trzęsawkę (skrapie) ustabilizowano, a następnie zakażono nim chomika syryjskiego (14, 15). Z tkanki mózgowej chomików w terminalnym stadium choroby – miano czynnika zakaźnego od 1×10^{10} do 1×10^{11} medialnych dawek śmiertelnych (LD₅₀) na gram – uzyskano homogenat (10% masa/objętość) w roztworze PBS. Homogenat tkanki mózgowej zdrowych chomików wykorzystano w charakterze ujemnej próbki kontrolnej.

Skażenie powierzchni

W badaniu wykorzystano pręty ze stali nierdzewnej. Pręty (stal nierdzewna typu 316; 5,0 mm długości x 0,16 mm średnicy) oczyszczano ultradźwiękowo w 2% roztworze środka Triton X-100 przez 15 minut. Następnie wypłukano w wodzie destylowanej i suszono przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Pręty poddano sztucznemu skażeniu zanurzając je w 10% homogenacie mózgu zdrowego (ujemna próba kontrolna) lub homogenacie mózgu zakażonego (próba dodatnia) i pozostawiając na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie pręty suszono przez 16 godzin w temperaturze pokojowej. Nadmiar niezwiązane go czynnika zakaźnego usuwano płuczając przez 5 minut w PBS. Aby uzyskać miano końcowe i krzywą zależności między dawką a okresem inkubacji, pręty zanurzano w szeregu 10-krotnych rozcieńczeń homogenatu dodatniego w

homogenacie ujemnym. W celu oceny efektu płukania przed wszczepieniem, dodatkowe pręty kontrolne (rozcieńczenia 1×10^3 i 1×10^5) płukano przez 15 minut w PBS po skażeniu i suszeniu. Do badań *in vitro* zamiast prętów stalowych skażono płytki szklane nakładając 20 μ l 10% homogenatu mózgu, a następnie suszono w temperaturze 37°C przez 1 godzinę.

Metody dekontaminacyjne

Wszystkie procedury dekontaminacyjne przeprowadzono na trzech niezależnych partiach po 5 skażonych prętów. Pręty płukano następnie w 1 ml wody destylowanej, suszono i przechowywano w -80°C przed inokulacją. W badaniach *in vitro* wykorzystano płytki szklane poddane dekontaminacji zgodnie z tym samym protokołem.

Wykorzystano następujące metody kontrolne rekomendowane przez WHO (9): zanurzenie w NaOCl (świeżo przygotowany roztwór 20 000 ppm, 1 godzina, 20°C), zanurzenie w NaOH (1N, 1 godzina, 20°C), autoklawowanie w cyklu dla porowatego wsadu (18 minut, 134°C). Testom poddano następujące metody dekontaminacyjne: autoklawowanie prętów zanurzonych w wodzie (18 minut, 134°C), zanurzenie w roztworze enzymatycznym (Klenzyme, STERIS, 0.8% v/v w wodzie, 5 minut, 43°C), zanurzenie w alkalicznym środku czyszczącym (HAMO 100 Prion Inactivating Detergent, STERIS, 1.6% v/v, 15 minut, 43°C), zanurzenie w formułowanym preparacie kwasu nadoctowego (STERIS 20 w rozcieńczeniu użytkowym, 12 minut, 55°C) lub środka dezynfekującym na bazie fenoli (Environ LpH lub LpHse, STERIS, 5% v/v, 30 minut, 20°C). Równocześnie, odpowiednie partie prętów poddano działaniu środka enzymatycznego (jak wyżej), a następnie zanurzono w wodzie i autoklawowano w 121°C przez 20 minut. Ekspozycję na gazowy nadtlenek wodoru (VHP) przeprowadzono w szczelnym pojemniku podłączonym bezpośrednio do Systemu

Biodekontaminacyjnego VHP1000 (16). System ten generuje suchy (nie kondensujący) gazowy nadtlenek wodoru o stężeniu od 1,0 do 1,5 mg/l i utrzymuje go przez 3 godziny w temperaturze około 25°C. Niektóre pręty poddawane ekspozycji na VHP były wcześniej traktowane środkiem enzymatycznym, inne wystawiano na działanie gazu bez uprzedniego kontaktu ze środkiem enzymatycznym.

Próba biologiczna

Pręty pojedynczo wszczepiono w przedczołowy obszar podkorowy poddanych anestezji chomików. Zwierzęta były następnie regularnie obserwowane pod kątem objawów klinicznych pasażowalnej encefalopatii gąbczastej (TSE) i zabijane w terminalnym stadium choroby. Dawkę LD₅₀ określano metodą Reeda i Muencha (17). Rozpoznanie TSE potwierdzała obecność PrP^{res} w tkance mózgowej, wykrywana w teście ELISA i Western Blot, zgodnie z opisanym wcześniej protokołem (18).

Analiza *in vitro* mechanizmu działania

W ramach analizy *in vitro*, wysuszone inokulum poddano działaniu testowanej metody a następnie, po usunięciu ze szklanych płytek, odtworzono w 120 μ l wody. Próbkę traktowano, lub nie, rosnącymi ilościami proteiny K przez 10 minut w temperaturze 37°C i dodawano bufor Laemmli'ego 2., Następnie 20 μ l każdego ekstraktu poddano próbie na obecność PrP^{res} (19).

W przypadku LpH i LpHse, produkt dodano w stosunku 4:1 do 20% homogenatu mózgu w 5% roztworze glukozy i poddano inkubacji przez 30 minut w 20°C. Ponieważ fenol hamuje działanie proteaz, musieliśmy wyekstrahować PrP^{res} z fazy fenolowej wykorzystując protokół SAF (opisany wcześniej, z pominięciem proteiny K, z wykorzystaniem dostępnego komercyjnego zestawu Bio-Rad) (20). Próbkę poddano następnie działaniu rosnących ilości

proteiny K. Próbkę odpowiadającą 200 µg tkanki mózgowej nakładano na żel poliakrylamidowy SDS-PAGE (12% poliakrylamid), a następnie przeprowadzano elektrotransfer na membranę z PVDF. Wykonano immunoblotting wykorzystując mysie przeciwciała monoklonalne (SAF-60, przeciwko PrP chomika, kodon 142-160), a następnie koniugowane z peroksydazą kozie przeciwciała anty-mysie (Southern Biotechnology Associates, Birmingham AL, USA). Immunoreaktywność uwidoczniła metodą chemiluminescencji (ECL, Amersham, Orsay, Francja) i wykrywano standardową autoradiografią.

Immunohistochemia

Analizy immunochemiczne przeprowadzono zgodnie z wcześniejszymi opisami (3). Każdy mózg z wszczepionym prętym utrwalał przez zanurzenie w płynie Carnoya, następnie przeniesiono do butanolu do chwili zatopienia w parafinie. Pręty usuwano przed cięciem mikrotomem.

	Odsetek transmisji (100%)	Zgony łącznie/populacja łącznie	Okres choroby w dniach
Próba dodatnia (rozcieńczenie)			
1x10 ⁻¹	100%	12/12	90(2)*
1x10 ⁻²	100%	12/12	98(5)*
1x10 ⁻³	100%	12/12	117(6)*
1x10 ⁻⁴	100%	12/12	124(11)*
1x10 ⁻⁵	92%	11/12	201(60)*
1x10 ⁻⁶	22%	2/9	201(39)*
1x10 ⁻⁷	0%	0/12	>365
1x10 ⁻⁸	0%	0/12	>365
1x10 ⁻⁹	0%	0/12	>365
1x10 ⁻³ (PBS)†	92%	11/12	114(5)*
1x10 ⁻⁵ (PBS)†	46%	4/11	166(43)*
Próba ujemna (rozcieńczenie)			
1x10 ⁻¹	0%	0/12	>365
Dane stanowią średnią (SE). * Przed inokulacją pręty płukano w PBS przez 15 minut			
Tabela 1: Infekcyjność prętów poddanych ekspozycji na szereg kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń homogenatu tkanki mózgowej chomików zakażonych szczepem 263K wywołującym scrapie			

Skrawki o grubości 5 µm umieszczano na szkiełkach pokrytych polilizyną. Po potraktowaniu proteinazą K (2µg/ml, 10 minut w 37°C), PrP wykrywano przy pomocy przeciwciała monoklonalnego połączonego z biotyną (SAF-32, przeciwko PrP chomika, kodon 79-92, 1 µg/ml, 2 godziny w temperaturze pokojowej).

www.thelancet.com vol 364; 7 sierpnia 2004

Rola źródła finansowania

Firma STERIS Ltd. zapewniła wsparcie finansowe dla części opisanego badania (analizy *in vivo*). Firma STERIS nie brała udziału w zbieraniu ani analizie danych, a jej zaangażowanie w projekt badania ograniczało się do protokołów dekontaminacji prętów.

Wyniki

Skażenie prętów kolejnymi rozcieńczeniami homogenatu tkanki mózgowej chomików w terminalnym stadium skrapie (szczep 263K) i wszczępienie ich zwierzętom badanym pozwoliło ustalić zależność pomiędzy mianem infekcyjnym (punkt końcowy na poziomie 1x10^{5.6} LD₅₀), odsetkiem transmisji i okresem inkubacji (tabela 1). Stopniowe zmniejszenie odsetka transmisji i wydłużenie okresu inkubacji wraz ze wzrostem rozcieńczenia materiału zakaźnego pozostaje w zgodzie z uzyskanymi wcześniej wynikami dla bezpośredniej inokulacji homogenatem tkanki mózgowej (15). Implantacja dwóch partii prętów płukanych przez 15 minut w PBS prowadziła do nieznacznego obniżenia odsetka napadów w porównaniu z prętami nie płukanymi, bez równoczesnego przedłużenia okresu inkubacji.

Uzyskane wyniki podsumowano w tabeli 2. Redukcję infekcyjności uzyskano porównując wskaźnik napadów i okresy inkubacji dla transmisji w tabeli 2 z analogicznymi wartościami dla szeregu rozcieńczeń w tabeli 1. Wszystkie metody dekontaminacyjne pozwalające uzyskać redukcję infekcyjności rzędu 5.6 log lub więcej (co odpowiada wartości progowej dla detekcji infekcyjności) uznaje się za metody umożliwiające pełną dekontaminację w granicach czułości naszego modelu.

Obydwie metody chemiczne zalecane przez WHO (NaOH 1N i NaOCl 20 000 ppm)(9) doprowadziły do całkowitej dekontaminacji. Inaktywacja poprzez

autoklawowanie w 134°C przez 18 minut okazała się jednak niedoskonała, o ile pręty nie były w czasie cyklu zanurzone w wodzie. Środek enzymatyczny umożliwił częściową dekontaminację, ale jego skuteczność znacznie wzrosła w kombinacji z autoklawowaniem w temperaturze 121°C. VHP stosowane samodzielnie prowadziło do obniżenia infekcyjności o 4.5 log, ale w połączeniu z preparatem enzymatycznym dawało całkowitą dekontaminację. Środek alkaliczny dawał pełną dezynfekcję w rekomendowanej temperaturze, podobnie fenolowy preparat Environ LpH (dawniej znany jako LpH, jego skuteczność wykazano w badaniach nad zawiesinami (21)).

Badaniu poddano też wpływ wybranego sposobu postępowania dekontaminacyjnego na ilość PrP^{res} i poziom jego oporności na proteazy. Do tego celu wykorzystano metodę western blotting i przeciwciała monoklonalne SAF-60 (podobne wyniki uzyskano dla innych przeciwciał o różnej swoistości, dane nie zawarte w niniejszej pracy). Aby odtworzyć skażenie i dekontaminację powierzchni, poszczególnym metodom dekontaminacyjnym poddano płytki szklane skażone uprzednio kontrolowaną ilością homogenatu tkanki mózgowej. Poddane ekspozycji inokulum (nadal widoczne w postaci przezroczystego biofilmu) zeszkobano i poddano analizie na obecność PrP^{res}. Wyniki były odtwarzalne w kolejnych eksperymentach, nawet jeśli używano innych homogenatów tkanki mózgowej. Co więcej, podobne wyniki uzyskano na powierzchniach stalowych (dane nie zawarte w niniejszej pracy).

Metoda	Odsetek transmisji	Zgony łącznie/populacja łącznie	Okres trwania choroby w dniach	Log redukcji
NaOCl 20000 ppm, 20°C, 1 godz.	0%	0/8	>365	>5.6
NaOH 1N, 20°C, 1 godz.	0%	0/12	>365	>5.6

Autoklawowanie* 134°C, 18 min	60%	6/10 (7/10) _a	197 (86) _§	4-4.5
Autoklawowanie† 134°C, 18 min	0%	0/11	>365	>5.6
Środek enzymatyczny + autoklawowanie‡ 0.8%, 43°C, 5 min/121°C, 20 min	10%	1/10 (4/10) _a	242	~5
Środek enzymatyczny 0.8%, 43°C, 5 min	100%	10/10	143 (12) _§	~3.5
Środek alkaliczny 1.6%, 43°C, 15 min	0%	0/11	>365	>5.6
Kwas nadoctowy 0.25%, 55°C, 12 min	100%	12/12	155 (60) _§	~3.5
Środek fenolowy 5%, 20°C, 30 min	0%	0/11	>365	>5.6
VHP 1.5 mg/l, 25°C, 3 godz.	33%	4/12	170 (33) _§	~4.5
Środek enzymatyczny + VHP 0.8%, 43°C, 5 min/ 1,5 mg/l, 25°C, 3 godz.	0%	0/11	>365	5.6

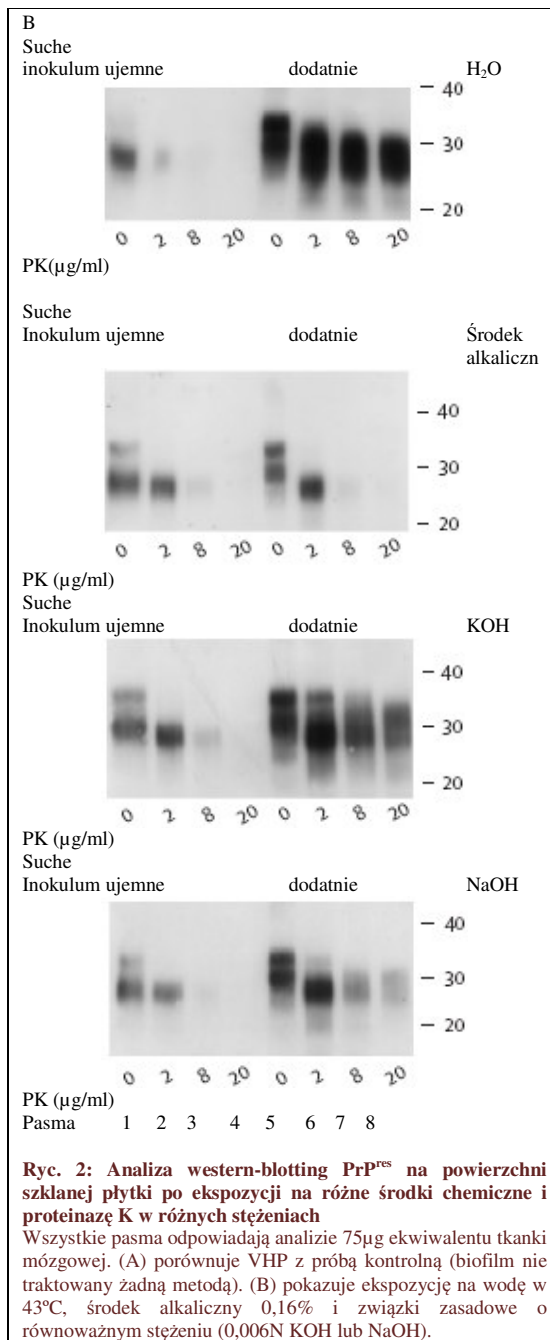
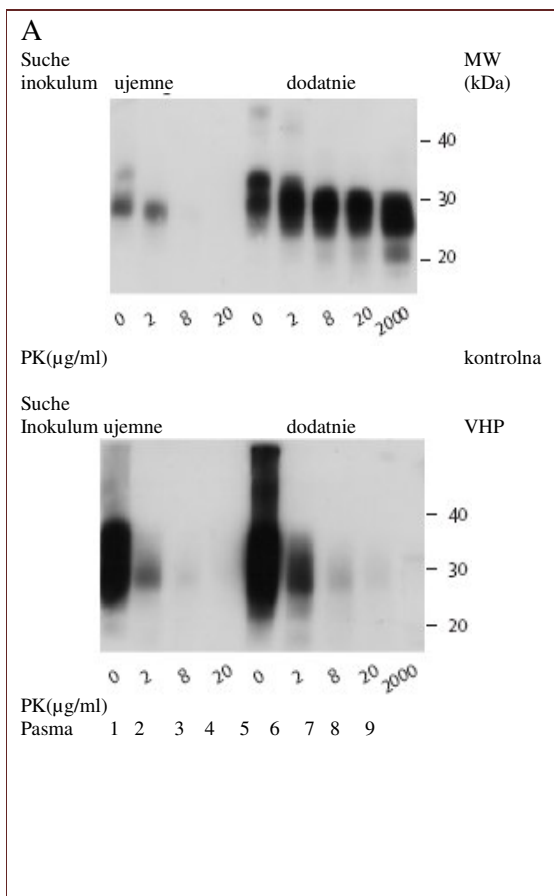
*Pręty w czasie autoklawowania w 134°C umieszczono na podpórkach †Pręty w czasie autoklawowania w 134°C zanurzone w wodzie ‡Po ekspozycji na środek enzymatyczny, pręty zanurzone w wodzie i autoklawowano w 121°C § Dane uśrednione (SE). Po zakończeniu badania u kilku zwierząt bezobjawowych wykryto PrP^{res} i włączono je do grupy z dodatnią transmisją.

Tabela 2. Wpływ różnych metod na skażone pręty

Przy braku procedury dekontaminacyjnej, w badaniu inokulum zdrowego mózgu sygnał PrP pojawiał się do dawki proteiny K rzędu 2 µg/ml. W przypadku zakażonego mózgu, sygnał PrP^{res} utrzymywał się nawet przy dawce proteiny K rzędu 2 mg/ml (ryc. 1A, próba kontrolna). Metoda VHP prowadziła do wzmocnienia sygnału PrP^{res} pod nieobecność traktowania proteinazą K, wykrywane PrP^{res} było jednak w pełni podatne na działanie proteiny K, co wykazano dzięki zanikowi sygnału PrP^{res} już przy najniższej dawce proteiny K wynoszącej 2 µg/ml (ryc. 1A).

Alkaliczny środek czyszczący (złożony z KOH i detergentów) łączył efekt usuwania PrP^{res} z uwrażliwieniem na proteinazę K

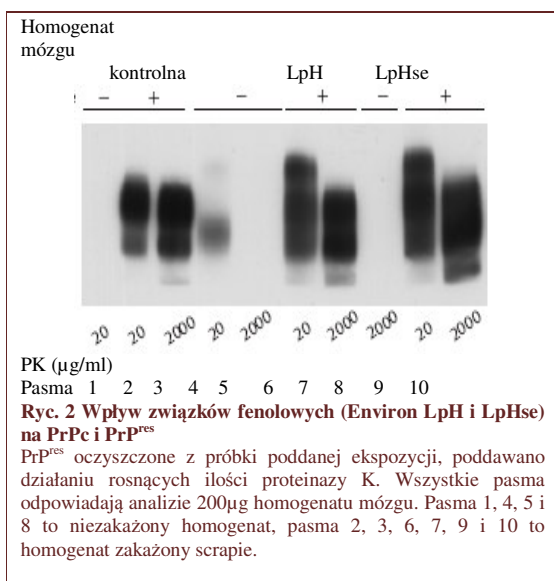
(ryc. 1B, panele H₂O i środka alkalicznego – pasma od 5 do 8). Sygnał PrP^{res} zanikał całkowicie przy dawce proteiny K 20 µg/ml. W porównaniu z nieformułowanymi związkami zasadowymi o tym samym stężeniu (0,006N KOH lub NaOH, co odpowiada stężeniu 0,16% środka alkalicznego wykorzystanego w eksperymencie *in vitro*): sygnał PrP^{res} nie zanikał pod wpływem 20 µg/ml proteiny K po potraktowaniu zasadami, natomiast po środku alkalicznym nie był wykrywany już przy zastosowaniu 8µg/ml proteiny K (ryc. 1 B). Przy zalecanym stężeniu, wykorzystanym w badaniu *in vivo* (1,6%), zaobserwowano brak sygnału (dane nie zawarte w artykule). Efekt ten wykazano dla temperatury 43°C (zalecana temperatura), natomiast w niższych temperaturach (poniżej 25°C, dane nie zawarte w artykule) wykazano brak takiego działania.



Ryc. 2: Analiza western-blotting PrP^{res} na powierzchni szklanej płytki po ekspozycji na różne środki chemiczne i proteinazę K w różnych stężeniach
 Wszystkie pasma odpowiadają analizie 75µg ekwiwalentu tkanki mózgowej. (A) porównuje VHP z próbą kontrolną (biofilm nie traktowany żadną metodą). (B) pokazuje ekspozycję na wodę w 43°C, środek alkaliczny 0,16% i związki zasadowe o równoważnym stężeniu (0,006N KOH lub NaOH).

Pod wpływem związków fenolowych zawartych w preparacie Environ LpH warstwa tkanki mózgowej nałożona na płytkę szklaną uległa rozkładowi do lepkiej gumy, nienadającej się do dalszych badań. Procedurę dekontaminacyjną do analizy *in vitro* musieliśmy więc przeprowadzić na homogenacie mózgu. Zarówno Environ LpH (preparat badany) jak i LpHse (inny preparat fenolowy) zwiększały oporność

PrPc na proteinazę K w dawce 20µg/ml (pasma 4 i 1 na rycinie 2; część danych poza artykułem). Przy tej samej dawce 20µg/ml proteiny K, Environ LpH i LpHse prowadziły do powstania agregatów PrP^{res} (ryc. 2, pasma 6 i 9 vs. 2, uwaga na pasmo o większej masie cząsteczkowej). Przy wyższej dawce proteiny K (2000 µg/ml) nie zaobserwowano różnicy pomiędzy poszczególnymi metodami traktowania, a próbą kontrolną (ryc. 2, pasma 7 i 10 vs. 3).



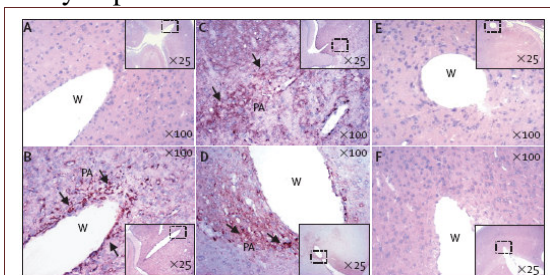
Analizy immunohistochemiczne mózgow chomików z wszczepionymi prętami i rozwojem choroby ujawniły obecność złogów PrP^{res} w terminalnym stadium choroby w tych samych obszarach, w których występowały one u chomików inokulowanych homogenatem (ryc. 3, B i C). Co więcej, obszary bezpośrednio sąsiadujące z prętami cechowało wyraźne wybarwienie PrP^{res} (ryc. 3, B). Układ złogów PrP^{res} w mózgow chomików, które zachorowały po wszczepieniu prętów dekontaminowanych metodami dającymi tylko częściową redukcję skażenia (tylko środek enzymatyczny – ryc. 3, D), przypominał układ PrP^{res} w mózgow chomików grupy kontrolnej, którym wszczepiono pręty bez dekontaminacji (ryc. 3, B). Chomiki, którym wszczepiono pręty poddane dekontaminacji, a

pozbawione objawów neurologicznych zabito 400 dni po inokulacji, aby zweryfikować nieobecność złogów PrP^{res}. Brak złogów PrP^{res} potwierdzono u chomików, którym wszczepiono pręty poddane działaniu referencyjnego NaOH lub połączenia środka enzymatycznego i VHP (ryc. 3, E i F), podobnie jak u chomików stanowiących ujemną grupę kontrolną (ryc. 3, A).

Dyskusja

Korzystając z metod referencyjnych zalecanych przez WHO (9) potwierdziliśmy skuteczność stosowania NaOH 1N i NaOCl 20 000 ppm w dekontaminacji prętów skażonych czynnikiem zakaźnym wywołującym skrapie u chomików, co wcześniej wykazano dla zawiesiny tkankowej (7, 8). Potwierdziliśmy też, że w przypadku autoklawowania w 134°C przez 18 minut warunkiem całkowitej inaktywacji jest zanurzenie prętów w wodzie. Niepełne unieszkodliwienie prionów w następstwie autoklawowania prętów ustawionych na podpórkach, bez zanurzenia, świadczy o efekcie utrwalającym pojawiającym się przy autoklawowaniu wyschniętego materiału (23). Ekspozycja na formułowany preparat kwasu nadoctowego w temperaturze 55°C, metoda zalecana zamiast aldehydu glutarowego w dekontaminacji endoskopów, pozwoliła osiągnąć redukcję infekcyjności rzędu 3,5 log, co nie odbiega od wyników osiąganych przez innych badaczy (24, 25). Podobny zakres redukcji umożliwiło zastosowanie środka enzymatycznego. Równoczesne wykorzystanie środka enzymatycznego z VHP lub konwencjonalnym autoklawowaniem w temperaturze 121°C zapewniło natomiast prawie całkowitą dekontaminację. Wykazano też skuteczność środków alkalicznych i fenolowego środka dezynfekującego Environ LpH. Ustalenia te pozwalają wyciągnąć następujące wnioski: po pierwsze – VHP to gazowa, nie-korozyjna metoda dezynfekcji i

sterylizacji, którą można wykorzystywać w przypadku delikatnych, skomplikowanych narzędzi lub niedostępnych powierzchni. Sugerujemy stosowanie alkalicznych środków czyszczących na mokre instrumenty, a następnie (po osuszeniu) dekontaminację VHP. Po drugie: połączenie enzymatycznego środka czyszczącego z konwencjonalnym autoklawowaniem w 121°C jest w szczególności interesujące dla placówek, które nie mają możliwości prowadzenia cyklu w 134°C. Alkaliczne środki czyszczące, ze względu na zawartość związków zasadowych o średnim stężeniu, są mniej korozyjne niż zalecane obecnie procedury dekontaminacji chemicznej i mogą być wykorzystywane w stosunku do delikatnych narzędzi. Environ LpH może znaleźć zastosowanie w dekontaminacji dużych powierzchni.



Ryc. 3. Wybarwienie PrP w mózгах chomików po wszczepieniu skażonych prętów
W = pręt, PA = skupisko PrP^{res}. Na zdjęciach - powiększenia obszarów zaznaczonych przerywaną ramką. Brak immunoreaktywności w mózgu niezakażonego zwierzęcia (A). Obecność wybarwionego PrP^{res} w mózgu zwierzęcia z wszczepionym prętem eksponowanym na 1x10⁻⁴ rozcieńczenie homogenatu mózgu (B). Zwierzę poddane domózgowej inokulacji 50 µl homogenatu mózgu (C). Zwierzę ze wszczepionym prętem poddanym działaniu środka enzymatycznego (D). Brak immunoreaktywności w mózgu zwierząt ze wszczepionymi prętami poddanymi działaniu środka enzymatycznego i VHP (E) lub 1N NaOH (F). Obecność PrP^{res} uwidoczniło przy pomocy biotynylowanego SAF-32.

Analiza biochemiczna PrP^{res} wskazała na występowanie trzech różnych mechanizmów działania charakteryzujących poszczególne metody poddawane testom.

Alkaliczne środki czyszczące zmniejszają ilość PrP^{res} i zwiększają podatność na proteinazę K. Obserwacje te pozostają w zgodzie z wynikami badań wykorzystujących homogenaty tkanki

mózgowej (26). Wyższa skuteczność preparatów alkalicznych niż równoważnych pod względem stężenia roztworów czysto zasadowych (NaOH i KOH) jest prawdopodobnie skutkiem połączenia właściwości denaturacyjnych (związki alkaliczne) z możliwością usuwania skażenia (detergenty zawarte w preparacie). Umiarkowane ogrzewanie (43°C) wpływało dodatnio na skuteczność preparatów alkalicznych (dane nie zawarte w artykule).

W przypadku VHP zaobserwowano inny efekt: paradoksalny wzrost ilości PrP^{res} pod nieobecność proteinazy K i zanik PrP^{res} po zastosowaniu najniższego nawet stężenia proteinazy K (tak jak dla niezakażonej grupy kontrolnej). Nadtlenek wodoru w formie gazowej zdaje się wpływać na strukturę białka w taki sposób, że niedostępne normalnie epitopy cząsteczek zostają poddane ekspozycji i stają się immunoreaktywne. Prowadzi to z jednej strony do zwiększonej immunoreaktywności, z drugiej do większej podatności na działanie proteinazy K. W innych badaniach wykazano, że VHP rozkłada białka na mniejsze peptydy (Antloga K., McDonnell G, dane niepublikowane).

Trzeci rodzaj oddziaływania zauważono w przypadku preparatu Environ LpH. Produkt ten nasila agregację, zarówno PrPc jak i PrP^{res}, prowadząc do nieznacznie podwyższonej oporności PrPc na proteinazę K oraz pojawienia się pasma o wysokiej masie cząsteczkowej dla PrP^{res}, którego nie wyeliminowano, ani nie uznano za podatne na proteinazę K. Co więcej, zarówno Environ LpH jak i LpHse mają podobny wpływ na PrP, choć jeden z nich niweluje infekcyjność, a drugi nie (27). Takie wyniki pozwalają przypuszczać, że albo skuteczność dekontaminacyjna zależy od czynnika innego niż PrP, albo wpływ na PrP^{res} nie podlega detekcji z wykorzystaniem analizy immunologicznej zastosowanej w badaniu. Tak czy inaczej, nasze dane wskazują, że ocena skuteczności dekontaminacyjnej nie

powinna opierać się wyłącznie na analizie typu western-blot.

Przeprowadzone przez nas badanie przeciera nowe szlaki w dziedzinie testowania innowacyjnych procedur dekontaminacyjnych z uwzględnieniem metody eksperymentalnej, naśladującej praktyki dekontaminacyjne w chirurgii i medycynie ogólnej. W przyszłości metoda ta może znaleźć zastosowanie w badaniach nad innymi szczepami prionowymi: sCJD lub vCJD. Uzyskane przez nas dane wskazują na istnienie różnorodnych mechanizmów molekularnych pozwalających uzyskać efekt dekontaminacji. Wskazują też na potrzebę dalszych badań nad innymi preparatami. Dokładniejsze zrozumienie tych mechanizmów mogłoby doprowadzić do opracowania metod biochemicznych pozwalających na bardziej wydajną ocenę procedur dekontaminacyjnych i innych procesów inaktywacji czynników zakaźnych. Bardziej doraźną korzyścią z badania jest opis trzech procedur umożliwiających dekontaminację delikatnych narzędzi chirurgicznych, z których jedna znajduje zastosowanie w przypadku urządzeń medycznych zawierających elementy elektroniczne lub komponenty wideo (np. endoskopy, laparoskopy).

CEA/DSV/DRM/GIDTIP, Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France
(G Fichet DipBiol, E Comoy PhD, C Duval, C Dehen, A Charbonnier, C Lasmézas PhD, J-P Deslys PhD);
Anjou Recherche/Veolia water, 1 place de Turenne, 94417 Saint-Maurice Cedex, France
(G Fichet); **Steris, Viables, Basingstoke, UK**
(G McDonnell PhD, K Antloga MD); **EFS-Nord de France, 59800 Lille, France**
(C Duval); and **Bethesda, Maryland, USA** (P Brown PhD).

Współpraca:

JP Deslys, E Comoy i G McDonnell byli odpowiedzialni za projekt badania i zarządzanie projektem. G Fichet: analizy biologiczne, C Duval: www.thelancet.com vol 364; 7 sierpnia 2004

badania in-vivo. K Antloga: przygotowanie i pomoc w opracowaniu i wszczęciu prętów. C Dehen: badania in-vitro. A Charbonnier: analizy immunohistochemiczne. CI Lasmézas, G Fichet, E Comoy, G McDonnell, P Brown i JP Deslys: rękopis.

Oświadczenie o konflikcie interesów:

K Antloga i G McDonnell są pracownikami producenta, który dostarczył środki chemiczne (Steris). Wszyscy autorzy mieli pełen dostęp do wszystkich danych i byli odpowiedzialni za decyzję o przedłożeniu do publikacji.

Podziękowania:

Dziękujemy Jacques'owi Grassi i jego współpracownikom (CEA-SPI), którzy zapewнили przeciwciała anti-PrP. Dziękujemy też Peterowi Burke za krytyczną analizę rękopisu.

Bibliografia:

- 1 Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001; **358**: 171–80.
- 2 Head MW, Ritchie D, Smith N, et al. Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study. *Am J Pathol* 2004; **164**: 143–53.
- 3 Herzog C, Sales N, Etcheberry N, et al. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* 2004; **363**: 422–28.
- 4 Llewellyn CA, Hewitt PE, Knight RS, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; **363**: 417–21.
- 5 Gibbs CJ Jr, Asher DM, Koblitz A, Amyx HL, Sulima MP, Gajdusek DC. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; **57**: 757–58.
- 6 Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, et al. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 1994; **35**: 513–29.
- 7 Brown P, Rohwer RG, Gajdusek DC. Sodium hydroxide decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease virus. *N Engl J Med* 1984; **310**: 727.
- 8 Taylor DM, Fraser H, McConnell I, et al. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* 1994; **139**: 313–26.
- 9 WHO Infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies. World Health Organization Report 23–26 March 1999, WHO/CDS/CSR/APH/2000.3, 1999.
- 10 McDonnell G, Burke P. The challenge of prion decontamination. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 1152–54.
- 11 Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, et al. Monitoring plasma processing steps with a sensitive Western blot assay for the detection of the prion protein. *J Virol Methods* 2000; **84**: 77–89.
- 12 Zobeley E, Flechsig E, Cozzio A, Enari M, Weissmann C. Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med* 1999; **5**: 240–43.
- 13 Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med* 2001; **7**: 679–84.
- 14 Kimberlin RH, Walker C. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol* 1977; **34**: 295–304.
- 15 Adjou KT, Demaimay R, Deslys JP, et al. MS-8209, a water-soluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrPres accumulation in Syrian hamster scrapie. *J Gen Virol* 1999; **80**: 1079–85.
- 16 Krause J, McDonnell G, Riedesel H. Biodecontamination of animal

rooms and heat-sensitive equipment with vaporized hydrogen peroxide. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001; **40**: 18–21.

17 Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938; **27**: 493–97.

18 Barret A, Tagliavini F, Forloni G, et al. Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 2003; **77**: 8462–69.

19 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–85.

20 Deslys JP, Comoy E, Hawkins S, et al. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 2001; **409**: 476–78.

21 Ernst DR, Race RE. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* 1993; **41**: 193–201.

22 Brown P, Rohwer RG, Green EM, Gajdusek DC. Effect of chemicals, heat, and histopathologic processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus. *J Infect Dis* 1982; **145**: 683–87.

23 Taylor DM, Fernie K, McConnell I, Steele PJ. Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies. *Vet Microbiol* 1998; **64**: 33–38.

24 Taylor DM. Resistance of the ME7 scrapie agent to peracetic acid. *Vet Microbiol* 1991; **27**: 19–24.

25 Antloga K, Meszaros J, Malchesky PS, McDonnell GE. Prion disease and medical devices. *Asaio J* 2000; **46**: 69–72.

26 Kasermann F, Kempf C. Sodium hydroxide renders the prion protein PrP^{Sc} sensitive to proteinase K. *J Gen Virol* 2003; **84**: 3173–76.

27 Race RE, Raymond GJ. Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy (prion) agents by environ LpH. *J Virol* 2004; **78**: 2164–65.