

[Sci Rep.](#) 2015; 5: 11431.

Çevrimiçi yayınlama 23 Haz. 2015. doi: [10.1038/srep11431](https://doi.org/10.1038/srep11431)

PMCID: PMC4477231

PMID: [26101102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26101102/)

# İyonize hava, grip virüsü enfeksiyonunu etkiler ve havadan bulaşmayı önler

[Marie Hagbom](#),<sup>1,\*</sup> [Johan Nordgren](#),<sup>1,\*</sup> [Rolf Nybom](#),<sup>2</sup> [Kjell-Olof Hedlund](#),<sup>3</sup> [Hans Wigzell](#),<sup>2</sup> ve [Lennart Svensson](#)<sup>a,1</sup>

[Yazar Bilgileri](#) [Makale Notları](#) [Telif hakkı ve Lisans bilgileri](#) [Feragatname](#) [D](#)

Bu makale PMC'deki diğer makaleler tarafından [alıntılanmıştır](#).

## Özet

Virüsleri havadan tespit etmek, toplamak ve ortadan kaldırmak, salgınları ve bulaşıcı hastalıkların yayılmasını hızla tespit etmek ve önlemek için basit, taşınabilir ve hassas cihazlara acil ihtiyaç vardır<sup>1</sup>. Her yıl, bulaşıcı hastalıklar dünya çapında milyonlarca ölüme neden olur ve en yaygın bulaşıcı patojenlerin çoğu öksürük, hapşırma, kusma vb. neden olduğu damlacıklar veya aerosollerle yayılır.<sup>2,3,4,5</sup> Hava yoluyla yayılım virüsler dahil birçok patojen için önemli bir bulaşma yolu olmasına rağmen, çoğu patojen için aerosol bulaşım mekanizmaları bilgisi sınırlıdır<sup>6</sup>.

Günümüzde havadan virüsleri hızla ve kolayca toplayıp tanımlayabilen, doğrulanmış basit bir teknoloji yoktur. Problem analiz tekniği değildir, çünkü gerçek zamanlı PCR gibi moleküler biyolojik yöntemler çoğu patojenin hassas bir tespit sistemini mümkün kılar<sup>7,8,9</sup>. Zorluk, büyük hacimlerdeki havadan, virüsler dahil, havadaki küçük partikülleri hızla toplamak için etkili bir örnekleme yöntemi geliştirmektir. Ayrıca, çeşitli ortam türlerinde geniş bir düzenleme ve uygulama için örnekleme yönteminin kolay kullanımı sağlanmış olmalıdır. Şu anda, havadan patojen toplamayı amaçlayan en yaygın kullanılan teknikler hava akımı ve sıvı modelleridir<sup>10,11,12,13,14,15</sup>. Bu sistemler karmaşıktır ve verimlilikleri tam olarak değerlendirilmeye tabi tutulmamıştır.

Hastanelerde bulaşıcı hastalıkların yayılması en önemli vakadır<sup>16,17,18</sup>. Birçok durumda, örn. ameliyathanelerde, bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların olduğu kadar ciddi alerjisi olan hastaların ortamlarında patojen ve partikül içermeyen bir ortama ihtiyaç vardır. Bu, yalnızca toplama ve tanımlama için değil, aynı zamanda, havadan virüs ve diğer patojenlerin elimine edilmesi için bir yöntemle sahip olmasını talep edilir kılar<sup>20</sup>. Ozon gazının norovirüsü inaktive ettiği gösterilmiştir ve boş odalarda yüzeyleri dekontamine etmek için kullanılabilir, ancak hastaların bulunduğu odalarda toksisitesi nedeniyle ozon kullanılmamalıdır<sup>21</sup>. Negatif iyonların üretilmesinin daha önce Newcastle hastalığı virüsünün<sup>22,23</sup> ve çeşitli bakteri türlerinin<sup>24,25</sup> bulaşmasını azalttığı hayvan deney düzeneklerinde gösterilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan iyonlaştırıcı cihaz 12 V'ta çalışır ve aerosol parçacıklarıyla çarpışan ve onları yükleyen bir elektrik alanında negatif iyonlaşmalar oluşturur. Bunlar daha sonra

pozitif yüklü bir toplayıcı plaka tarafından yakalanır. Güvenlik nedenlerinden ötürü, kolektör plakası 80µA'dan çok daha düşük bir akıma sahiptir, ancak iyonlaştırıcı, saniyede birkaç milyar elektronun yüksek üretimini sağlayan 200.000 eV'den fazla bir voltajla besler. Bunun ötesinde, bu cihaz tespit edilebilir seviyelerde ozon üretmez ve bu nedenle tüm ortamlarda güvenle kullanılabilir.

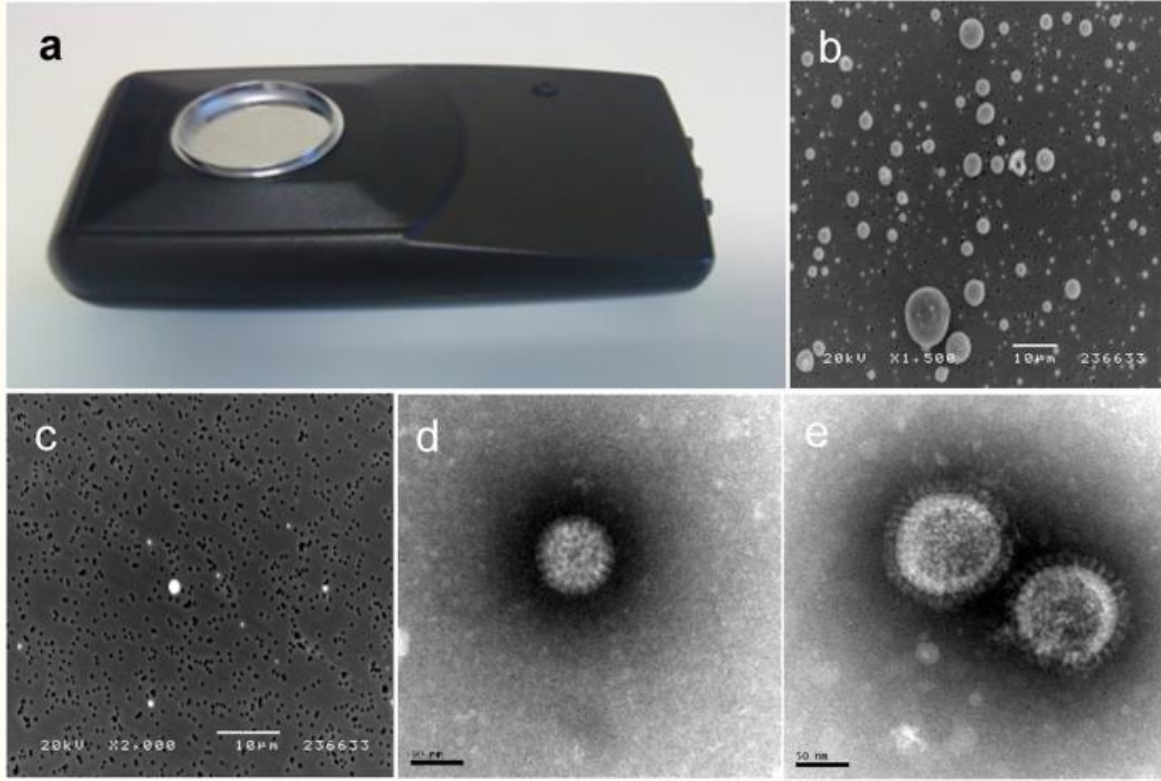
Bu tekniğin, kedi alerjenlerini havadan etkili bir şekilde topladığı ve ortadan kaldırdığı bilinmektedir<sup>26</sup>. İyonizasyon cihazına maruz bırakılan aerosolize rotavirüs, kalısivirüs ve influenza virüsü partikülleri, kollektör plakasına çekildi ve ardından elektron mikroskobu ve ters transkripsiyonlu kantitatif gerçek zamanlı PCR teknikleriyle tanımlandı. En önemlisi, bu teknolojinin havadan bulaşan influenza virüsü enfeksiyonlarını önlemek için kullanılabileceğini gösteriyoruz.

## Sonuçlar

### Elektron mikroskobu ile belirlenen aerosol örneklemesini görselleştirme ve etkinliği

Viral patojenlerin toplanması ve tanımlanmasına yönelik iyonlaştırma tekniğini geliştirmek ve doğrulamak için klinik öneme sahip birkaç virüs kullandık; calicivirüs, rotavirüs ve grip virüsü (H3N2, Salomon Adası türü) ve ayrıca lateks partikülleri. Köpek kalısivirüsü (CaCV, tür 48), büyük klinik ve ekonomik öneme sahip salgınlara<sup>28</sup> neden olan "kış kusması hastalığının" arkasındaki etiyolojik ajan anlamında insan norovirüsünü temsilen<sup>27</sup> kullanıldı. Rhesus rotavirüsü, insan rotavirüsü<sup>29</sup> için bir temsili markör olarak kullanıldı.

Cihaz (Şekil 1a), iyonlaştırıcıya eklenmiş pozitif yüklü bir toplayıcı plakaya sahip, küçük bir taşınabilir 12 Volt'la beslenen iyonlaştırıcıdan oluşur ve elektrostatik çekim yoluyla havadan negatif parçacıkları çeker. Optimum toplama süresi parametrelerini belirlemek için, boyutları <1 ila >10 µm arasında değişen lateks partikülleri, 19 m<sup>3</sup>lük bir odaya nebulize edildi. Test, gerçek zamanlı partikül sayımı (PortaCount Plus) ile belirlendiği üzere havadaki serbest lateks partiküllerinin > % 90'ını ortadan kaldırmak için 40-60 dakika gerektiğini ortaya çıkardı. Partikül sayacı, 0,02 µM'den büyük partikülleri tespit edebilir. Aktif ve inaktif iyonlaştırıcı toplayıcı plaka ızgaraları elektron mikroskobu (SEM) taranarak elde edilen görselleştirme, lateks partiküllerinin birikiminin aktif iyonlaştırıcı toplayıcı plakalarda aktif olmayanlara kıyasla önemli ölçüde arttığını gösterdi (Şekil 1b, c). Daha sonra, yüksek sayıda rotavirüs ve formalinle inaktive edilmiş influenza virüsü, aynı koşullar altında aerosol haline getirildi. 40 dakika sonra inaktif toplayıcı plakalar birkaç (<5) rotavirüs ve influenza virüsü içerirken, aktif toplayıcı, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile belirlendiği üzere >50 virüs partikülü içeriyordu (Şekil 1d, e).

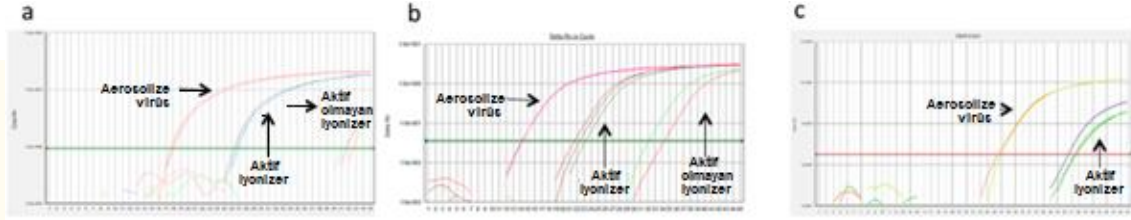


Şekil 1

Toplayıcı plakalı hava noktali iyonlaştırıcı (boyut 13 × 35 cm) (a). İyonlaştırıcı cihaz, LightAir AB, Solna, İŖveç, İyon Akışlı İyonlaştırma Teknolojisine dayanarak geliştirildi ve kolektör plakası pozitif yüklü, 47 mm çapında iletken bir yüzeye sahip bir plastik kap takılarak modifiye edildi; Aktif (b) ve inaktif (c) iyonlaştırıcı üzerinde aerosol haline getirilmiş ve yakalanmış lateks partikülleri (> 1 ila <10 µm), (bar = 10 µM); Rotavirüs (d); ve grip virüsü (H1N1; Salomon Adası türü) (e) yakalandı.

### İyonize hava ve elektrostatik çekim, RT-qPCR tarafından belirlenen aerosol formunda püskürtülmüş virüsleri toplar

Daha sonra iyonlaştırıcı tekniğinin virüsleri toplama ve konsantre etme kapasitesini ölçümleme için RT-qPCR teknolojisinin kapasitesini belirledik. Her deneyde aynı virüs konsantrasyonları kullanılarak üç virüsün her biri ile üç bağımsız deney gerçekleştirildi (Şekil 2a – c). Toplamadan saptamaya kadar birçok aşamayı kapsamına rağmen, sistem yeniden üretilebilirlik açısından sağlamdı. RT-qPCR verileri, aktif toplayıcının, aktif olmayan toplayıcıya kıyasla virüsü 1500–3000 kat daha verimli bir şekilde konsantre ettiğini ve topladığını göstermektedir (Tablo 1). Aerosol üretimi için farklı virüs seyreltileri kullanıldığında, aktif toplayıcıda toplanan aerosolize virüs oranı CaCV, rotavirüs ve influenza virüslerinde % 0.1-0.6 normal aralığındaydı. CaCV ile ilgili tekrarlanabilir bir bulgu, en düşük konsantrasyonlarda göreceli geri kazanımda, aerosol haline getirilen toplam virüs miktarının % 10-20'sine yükselen önemli bir artıştır (Tablo 1).



ŞEKİL 2

Yakalanmış rotavirüs (a), kalisivirüs (b) ve grip virüsü (H1N1; Salomon Adası türü) (c) üzerinde gerçek zamanlı PCR. Aktif olmayan iyonlaştırıcıda herhangi bir influenza virüsü tespit edilmediğini unutmayınız.

Tablo 1

**RT-q PCR ile belirlenen çeşitli konsantrasyonlarda aerosol haline getirilmiş CaCV, rhesus rotavirüs (RRV) ve İnfluenza A virüsünü toplama etkinliği.**

Aerosolize virüs sayısı (genler/PCR reaksiyon)	Toplayıcıda virüs sayısı – Açık (genler/PCR reaksiyon) ±SE	Toplayıcıda virüs sayısı – Kapalı (genler/PCR reaksiyon)	Geri kazanım (%) Açık	Geri kazanım (%) Kapalı	Rasyo (Açık/Kapalı)
<b>CaCV</b>					
1.88 x 10 <sup>7</sup>	1.18x10 <sup>5</sup> ± 8.40x10 <sup>4</sup>	73	0.63 %	0.00039 %	1620
1.99 x 10 <sup>6</sup>	7.36x10 <sup>3</sup> ± 2.16x10 <sup>3</sup>	~5	0.37 %	0.00024 %	~1520
9.93 x 10 <sup>5</sup>	1.66x10 <sup>3</sup> ± 4.63x10 <sup>2</sup>	tespit edilemedi	0.17 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi
2.20 x 10 <sup>5</sup>	8.11x10 <sup>2a</sup>	tespit edilemedi	0.37 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi
1.56 x 10 <sup>4</sup>	1.65x10 <sup>3</sup> ± 9.67x10 <sup>2</sup>	tespit edilemedi	10.60 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi
1.87 x 10 <sup>3</sup>	3.86x10 <sup>2</sup> ± 1.27x10 <sup>2</sup>	tespit edilemedi	21 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi
<b>RRV</b>					
2.23 x 10 <sup>6</sup>	7.54x10 <sup>3</sup> ± 6.74x10 <sup>2</sup>	~2-3	0.34 %	~0.00011 %	~3000
4.85 x 10 <sup>5</sup>	6.40x10 <sup>2</sup> ± 86	tespit edilemedi	0.13 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi
9.13 x 10 <sup>4</sup>	41 ± 21	tespit edilemedi	0.05 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi
<b>İnfluenza virüs</b>					
4.30 x 10 <sup>6</sup>	3.33x10 <sup>3</sup> ± 7.22x10 <sup>2</sup>	tespit edilemedi	0.08 %	bilgi edilemedi	bilgi edilemedi

### İyonlaştırıcı hava, kalisivirüsü ve rotavirüs enfeksiyonunu azaltır

Daha sonra, toplanan virüslerin negatif iyonlara maruz kaldıktan sonra ve / veya pozitif yüklü toplayıcı plakaya yöneltildikten sonra bulaşıcılıklarını koruyup korumadığını belirledik. Sırasıyla 1 × 10<sup>6</sup> peroksidaz oluşturan CaCV rotavirüs birimleri içeren beş mL hücre kültürü vasatı (Eagles Minimal Essential Media (Eagles MEM)) aerosol haline getirildi ve 40 dakika boyunca 1 mL Eagles MEM içeren aktif bir toplayıcı plakada toplandı. Hücre kültürü vasatındaki CaCV ayrıca aerosol haline getirilmeden doğrudan aktif ve inaktif bir toplayıcı plakaya yönlendirildi. Viral enfektivite, esasen tarif edildiği gibi belirlendi<sup>30</sup> ve viral genom kopya sayıları ile enfektivite arasındaki oran, aerosol haline getirilmiş virüs, aktif ve inaktif toplayıcı plakalara yöneltilen virüs ve viral stoklar arasında karşılaştırıldı. Aktif bir toplayıcı plakaya aerosolize edilmeden yöneltilen CaCV, inaktif bir toplayıcı plakada tutulan virüse kıyasla enfektivitede hafif bir azalma (~% 40) gösterdi (Tablo 2). Bunun tersine, aerosol haline getirilmiş virüslerin enfektivitesi, >% 97 oranında büyük ölçüde azaldı, bu da aerosolün iyonizasyonunun, bulaşıcılık azalmasının büyük çoğunluğundan sorumlu olduğunu ve yüklü toplayıcı plakaya yönlendirilmeden kaynaklanmadığını gösterdi.

Tablo 2

**Köpek Kalisivirüs (CaCV) ve Rhesus Rotavirüs'ün (RRV) enfektivitesinin azaltılması.**

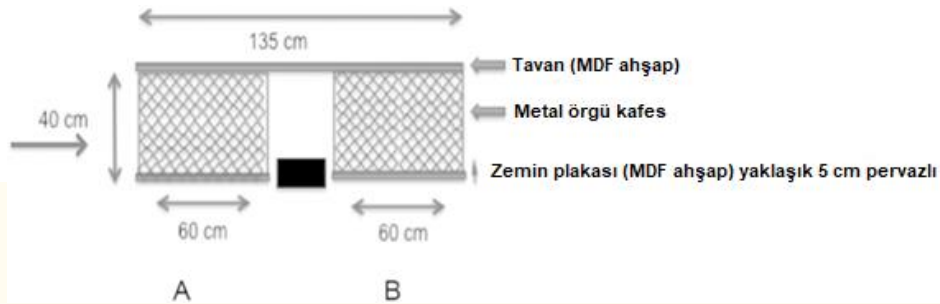
RT-qPCR ile ölçülen PCR reaksiyonu başına bulaşıcı virüs partiküllerinin virüs genlerine oranı						
	Yüklü toplayıcıya yönlendirilen	Yüksüz toplayıcıya yönlendirilen	Enfektivitedeki azalm	Aerosolize virüs	Yakalanan Aerosolize virüs	Enfektivitedeki azalm
CaCV	$0.74 \times 10^{-4}$	$1.24 \times 10^{-4}$	40.1%	$2.96 \times 10^{-2}$	$<7.83 \times 10^{-4a}$	$>97.4\%a$
RRV	tespit edilemedi	tespit edilemedi	tespit edilemedi	$4.86 \times 10^{-1}$	$<7.66 \times 10^{-3a}$	$>98.4\%a$

<sup>a</sup> Enfektivite testinde tespit limiti altında (10 peroksidaz oluşturan birim / mL).

Virüslerin bulaşıcılığını yitirdiği mekanizmanın iyonizasyon olduğuna dair diğer bir destek, rotavirüsün iyonize edilmeden nebülize edildiği ve inaktif bir toplayıcı plakaya yakalanmasına izin verilen deneylerden gelmektedir. Toplayıcılar, nebülizörden 30 cm uzağa yerleştirildi. Sonuç, genom kopyasına karşı enfektivite oranının viral stokundekine kıyasla değişmediği varsısına yöneltti, bu da virüsün inaktivasyonunun iyonize hava ile ilişkili olduğunu düşündürdü.

### İyonize hava ve elektrostatik çekim, kobaylar arasında havadan bulaşan influenza A / Panama virüsü enfeksiyonunu önler

Daha sonra, hava iyonlaştırmanın ve elektrostatik çekimin, kobaylar arasında havadaki aerosol ve damlacık yoluyla bulaşan influenza A / Panama (Pan / 99) virüsü enfeksiyonunu önleyip önleyemeyeceğini incelemek için grip aşılınmış kobay modelinden <sup>31,32,33</sup> faydalandık. Havadan / damlacık bulaşım modeli, esasen açıklandığı gibi, kafesler arasına yerleştirilen iyonlaştırıcı ile iki ayrı kafes kullanılarak oluşturulmuştur<sup>31</sup> (Şekil 3). Dört kobay,  $5 \times 10^3$  pfu Pan / 9931 ile tarif edildiği gibi burun içi yolla enfekte edildi ve "A" kafesine yerleştirildi (Şekil 3). Enfeksiyondan 30 saat sonra (h p.i.) 4 enfekte olmamış kobay, Şekil 3'te gösterildiği gibi enfekte hayvanların bulunduğu kafesten 15 cm uzağa, fiziksel temas olmaksızın "B" kafesine yerleştirildi. İyonlaştırıcı, "A" ve "B" kafesleri arasına yerleştirildi. Biri kafeslerin arasına yerleştirilen aktif iyonlaştırıcı ve bir inaktif iyonlaştırıcı içeren iki özdeş deney gerçekleştirildi.



Şekil 3

**Kobaylar arasında influenza virüsü (H3N2, Pan / 99) aerosol geçiş deneylerinin düzenek tasarımı. Kobaylar (n = 4) 100 uL'de (her burun deliğinde 50 uL)  $5 \times 10^3$  pfu Pan / 99 virüsü ile intranasal olarak enfekte edildi.**

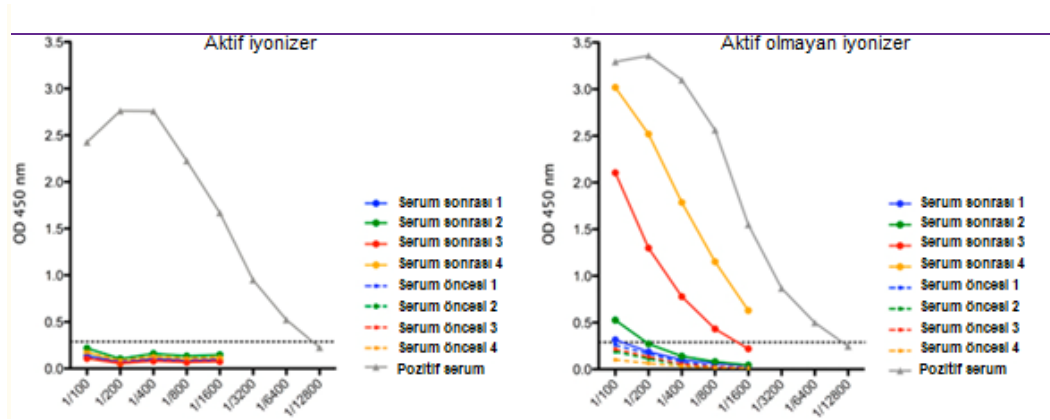
Enfekte olmuş dört hayvanın tümü deneysel bir "A" kafesine yerleştirildi. 30 saatte p.i. dört saf enfekte olmamış kobay "B" kafesine yerleştirildi. Soldan sağa hava akışı. Hava değişimi 17kez/gün. Dolu dikdörtgen = iyonlaştırıcı.

"B" kafesindeki enfekte olmamış hayvanlar, 4 enfekte kobay barındıran "A" kafesinden gelen hava akımına 24 saat boyunca maruz bırakıldı ve daha sonra enfekte olma için tek zaman noktasının, "A" kafesindeki enfekte hayvanlardan gelen havaya maruz kaldıkları 24 saat olmasını sağlamak için sonraki 21 gün boyunca tek tek havalandırılan kafeslere yerleştirildi. Nazal olarak deneysel enfekte olmuş hayvanlardan 54 saatte incelenen akciğer ve trakea



biyopsilerinin RT-qPCR'si, her iki deneyde 4 kobaydan 3'ünün grip için pozitif olduğunu ortaya çıkarmıştır.

"A" kafesindeki hayvanlardan, "B" kafesindeki enfekte olmamış hayvanlara enfeksiyon bulaşmasını takiben 21 gün sonra bir bağışıklık tepkisi gelişmesini değerlendirdik. Şekil 4'te gösterilen sonuçlar, iyonlaştırıcı aktif olmadığına, enfekte olmamış ancak maruz kalan 4 hayvandan 3'ünün bir serum IgG influenzaya spesifik bağışıklık tepkileri geliştirdiğini göstermektedir. Bunun tersine, "B" kafesindeki 4 hayvandan hiçbiri iyonlaştırıcı aktifken influenza virüsüne karşı bir bağışıklık tepkisi geliştirmedir (Şekil 4). Dahası, influenza virüsü RNA'sı, düşük konsantrasyonda da olsa, aktif iyonlaştırıcının toplayıcı plakasında RT-qPCR ile tespit edilebilir ancak inaktif iyonlaştırıcı durumunda mümkün değildir, bu da iyonizasyon cihazının gerçekten de kafes "A" 'daki enfekte olmuş hayvanlardan salgılanan virüsü önlediğini göstermektedir.



Şekil 4

**Aktif iyonlaştırıcı, kobaylar arasında aerosol bulaşan influenza virüsü (H3N2, Pan / 99) enfeksiyonunu önler.**

Aktif iyonlaştırıcı, maruz kalan 4 kobaydan 4'ünün influenza virüsüne karşı bir bağışıklık tepkisi geliştirmesini önlerken, inaktif iyonlaştırıcı kullanıldığında 4 hayvandan 3'ü enfekte olmuştur. Grafik, enfeksiyondan önce (serum öncesi 1, 2, 3 ve 4) ve influenza virüsüne maruz kaldıktan sonra 21. günde (serum 1, 2, 3 ve 4 sonrası) ELISA ile antikor titrelerini gösterir. Kısaca, influenza virüsü H1N1; (SBL İnfluenza Aşısı, Sanofi Pasteur, Lyon, Fransa) ELISA plakaları üzerine kaplandı ve kobay serumu öncesi ve sonrası iki kat seyreltilerle inkübe edildi, takiben yöntemler'de tarif edildiği gibi biyotinitle edilmiş tavşan-anti-kobay antikorunu, HRP konjuge streptavidin ve TMB substratı uygulandı. Kesme (kesikli çizgi) değeri (0.284 OD), negatif kontroller + 2SD'nin ortalamasıydı.

## Tartışma

Havadan bulaşan viral enfeksiyonların kontrollü bir ortamda hayvanlar arasında yayılmasını önleyebilen ve aynı zamanda hızlı tanımlama için virüsü havadan toplayan, 12 voltta çalışan basit bir iyonlaştırıcı cihazı tarif ediyoruz. Hassas RT-qPCR tahlilleri ile birlikte bu örnekleme yöntemi, influenza virüsü, rotavirüs ve kalısivirüs gibi klinik açıdan önemli birkaç insan virüsünün hızlı tespitini ve son derece hassas ölçümünü mümkün kılmıştır. Cihaz, havadan negatif parçacıkları çeken iyonlaştırıcıya pozitif yüklü bir örnekleme plakasının takıldığı küçük bir taşınabilir iyonlaştırıcıdan oluşur. Bu yeni iyonlaştırıcı cihazın önemli avantajları, basit kullanım, yüksek sağlamlık ve havadaki patojenlere geniş uygulanabilirliktir.

Aktif iyonlaştırıcıda aktif olmayan iyonlaştırıcıya göre önemli ölçüde (~ 1500–3000 kez) daha yüksek sayıda rotavirüs ve CaCV partikülünün tespit edildiği gözlemi, bu tekniğin havada viral partikülleri aktif ve verimli bir şekilde toplayabileceği sonucuna varmıştır. Benzer şekilde, lateks partiküllerinin SEM ile görselleştirilmesi, incelenen tüm boyutlardaki lateks partiküllerinin aktif toplayıcı üzerinde yoğunlaştığını ortaya koydu. İlginçtir ki, 35 nm'den 10 µm'ye kadar geniş bir partikül boyutu yelpazesinin yoğunlaşması, teknolojinin geniş bir uygulama aralığı sunduğunu düşündürür. Bununla birlikte, çok büyük parçacıklar, havada daha az süre kalacakları öngörüldüğünden geri kazanımı azaltabilir<sup>33,34</sup>.

İlginç bir şekilde, düşük miktarlarda CaCV'yi aerosol haline getirdiğimizde ( $1.56 \times 10^4$  gen kopyaları ve  $1.87 \times 10^3$  gen kopyaları), sırasıyla % 10.6 ve % 21'lik geri kazanım toplanımları gözlemledik. Havada daha az miktarda virüs dağılımı ile bu önemli ölçüde artan verimlilik, virüs-virüs veya virüs-hücre kalıntı parçacıklarının havada daha uzun süre daha az toplanmasından kaynaklanıyor olabilir ve böylece toplayıcı tarafından daha güçlü elektrostatik çekime yol açar. Ayrıca, çok sayıda partikülün, kolektör plakasının duvarlarında veya iyonlaştırıcı üzerindeki kolektör plakasına bitişik alanlarda toplanması olasıdır ve daha sonra gerçek zamanlı PCR ile ölçülemez; dolayısıyla elektrostatik etki düşük tahmin edilir.

Daha yüksek virüs konsantrasyonları havaya püskürtüldüğünde, bu etki bu nedenle daha düşük geri kazanım tahminlerine yol açabilir. CaCV, rotavirüs ve influenza virüsü kullanarak, tüm işlem kademeleri boyunca (aktif iyonlaştırıcı ile toplama, RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR) testin sağlamlığını değerlendirmek için her aerosol virüs konsantrasyonu için üç bağımsız deney gerçekleştirdik. Toplama ve saptama aşaması birkaç kademeyi kapsamasına rağmen, her bağımsız ölçümden elde edilen minimum ve maksimum virüs miktarı her zaman 1 log aralığı içinde olduğundan testi oldukça sağlam bulduk (Şekil 2).

Virüslerin elektrostatik çekim yoluyla inaktivasyonu sadece kısa süreli araştırılmıştır<sup>35</sup> Bu çalışmada, rotavirüs ve CaCV, gen kopyalarına karşı enfektivite oranı ile belirlendiği üzere iyonize havada önemli (>% 97) enfektivite (oran; CaCV  $3.0 \times 10^{-2}$ 'den  $<7.8 \times 10^{-4}$ 'e ve rotavirüs  $4.9 \times 10^{-1}$ 'den  $<7.6 \times 10^{-3}$ 'e) kaybetti. İnaktivasyon mekanizması bu çalışmada açıkça araştırılmamıştır, ancak inaktivasyon mekanizmaları daha önce tarif edildiği gibi reaktif türleri ve / veya virüsü inaktive edebilen artan protein şarj seviyelerini içerebilir<sup>36,37</sup>. Viral lipid zarfı ve protein kapsidinde hasara ve tahribata neden olabilecek lipid ve protein peroksidasyon reaksiyonları yoluyla reaktif oksijen türleri ve ozondan kaynaklanan enfeksiyon oranının azalması önerilmiştir<sup>36</sup>. Özellikle protein peroksidasyonu, adenovirüs, poliovirüs ve rota- ve kalisivirüsler gibi diğer enterovirüsler gibi zarfsız virüslerin inaktivasyonunda anahtar rol oynayabilir. Zarflı virüslerin, lipid peroksidasyonu nedeniyle bulaşıcılığı yitirdiği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, ozonun sitotoksitesi ozonun klinik uygulaması için büyük bir engel oluşturmaktadır. Havadaki iyon konsantrasyonunun artırılmasının tavukları hava yoluyla ölümcül Newcastle hastalığı virüsü enfeksiyonunun bulaşmasından etkili bir şekilde koruduğu gösterilmiştir<sup>23</sup>. Virüslerin negatif iyonla inaktivasyonunun kesin mekanizması saptanmamıştır ve daha fazla araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte, negatif ve pozitif iyonların üretimini kullanan bir çalışmada, ozon seviyesi ihmal edilebilir düzeyde olmasına rağmen (0,005 ppm veya daha az)<sup>37</sup> influenza virüsü inaktive edilmiştir.

Cihazımız, VTT (Finlandiya Teknik Araştırma Merkezi, Tampere, Finlandiya) ve ABD'deki Hava Kaynakları Kurulu tarafından test edildiği üzere tespit sınırının (0,002 ppm) altında bir kararlı durum ozon konsantrasyonu salar, bu nedenle ozon bu durumda viral inaktivasyona katkıda bulunamaz. Bununla birlikte, • O<sub>2</sub>- gibi reaktif radikaller üretilebilir ve bu, virüslerin protein veya nükleik asit yapısına zarar vererek inaktivasyona katkıda bulunabilir<sup>37</sup>. Virüs iyonizasyon olmadan odanın havasına nebülize edildiğinde bulaşıcılık kaybolmadığından ve doğrudan pozitif yüklü toplayıcı plakaya uygulandığında sadece biraz azaldığından,

bulaşıcılıktaki çoğu azalmanın muhtemelen izoelektrik noktada değişikliklere ve dolayısıyla kapsidin yapısal değişikliklerine neden olan artan negatif yüklü seviyelerden kaynaklanabileceği önerilmektedir. Araştırılan iki virüs zarfsız olduğundan, lipid modifikasyonu göz ardı edilebilir.

Bu çalışmanın en ilginç ve büyük klinik önemi, iyonlaştırıcı cihazın influenza virüsü enfeksiyonunu kontrollü bir ortamda "gerçek" koşulları taklit ederek tespit edip önleyebildiğine dair yeni bulguydu. İntranazal enfeksiyon protokolümüz esasen daha önce tarif edildiği gibiydi<sup>31,33</sup>, Harley kobayları ve Pan / 99 influenza virüsünün  $5 \times 10^3$  plak oluşturan birimleri (pfu) kullanıldı. Hartley türünün kobayları, enfeksiyöz dozu (ID<sub>50</sub>) 5 pfu<sup>31</sup> olan insan influenza A virüsü türü Pan / 99'a (H3N2) karşı oldukça duyarlı olduğundan, bu özellik viral türü bu çalışmalar için en uygun hale oluşturur. Dahası Lowen ve arkadaşları, Pan / 99'un aerosol yoluyla kobaylara % 100 bulaştığını göstermiştir<sup>38,39</sup>. Önceki çalışmalar, kullanılan enfeksiyöz dozun, bu hayvan modelinde hem akciğerlerde hem de nazal pasajlarda<sup>31</sup> 3 p.i. gün civarında bir viral büyüme sıçramasına yol açtığını da göstermiştir ki, bu çalışmamızdaki saf hayvanların enfekte hayvanlardan gelen havaya maruz kaldığı bir zaman noktasıdır.

İnfluenza virüsü bulaşma şekli, bireylerle doğrudan teması, virüsle kontamine nesnelere (fomitlere) maruz kalmayı ve bulaşıcı aerosollerin solunmasını içerir. Kobay hayvan modelini kullanan önceki çalışmalar, kobaylar arasındaki Pan / 99 bulaşmasının temel yolunun fomit değil aerosol olduğunu göstermiştir<sup>33</sup>. Aşılınmış hayvanlardan aerosol formunda yayılan virüs, çok düşük gen kopya sayılarında da olsa RT-qPCR ile aktif toplayıcı plakada tespit edilebilir. Kobayları bir konak modeli olarak kullanan Lowen ve arkadaşları, influenza virüsünün hayvanlar arasında aerosol yayılımının hem bağıl neme hem de sıcaklığa bağlı olduğunu gösterdi. % 20–30'luk düşük bağıl nem ve 5 °C sıcaklığın en uygun olduğunu ve 30 °C'de hiçbir yayılım tespit edilmediğini buldular. Düzenek sistemimizde sıcaklık 20–21 °C arasında ve bağıl nem % 35–36.2 arasında tutulmuştur.

Kobayları bir konak modeli olarak kullanan Lowen ve ark.<sup>38</sup>, influenzanın aerosol yayılmasını gösterdi. Tarif edilen iyonize edici cihaz, RT-qPCR tahlilleri ile birlikte açık bir teşhis potansiyeline sahipti. Kolay kullanım, düşük maliyet, ozon içermeyen üretim, sağlamlık, yüksek verimlilik ve düşük voltajlı (12 volt) çalışma, büyük ölçekli kullanım sağlar. Uçaklar, hastaneler, gündüz bakım merkezleri, okul ortamları ve diğer halka açık yerler gibi bulaşıcı yayılma için kritik olan konumlar, böylece toplayıcı plakada havadaki virüslerin ve diğer patojenlerin toplanması ve analizi ile izlenebilir ve kontrol edilebilir. Cihaz, potansiyelin gerçek yaşam ortamlarında daha fazla araştırılması gerekmesine rağmen, yayılımı önleme potansiyeli de gösterir. Bu yenilikçi teknolojinin çevre havasındaki virüsleri toplama ve tanımlama konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna vardık.

## Metodlar

---

### Araştırma Tasarımı

Deney odası 19 m<sup>3</sup> (B250 \* L330 \* H235cm) hacimli topraklanmış metal duvarlara sahiptir. Odaya havadaki partiküllerin toplanması ve analizi için tasarlanmış bir aktif ve bir inaktif iyonlaştırıcı cihaz birbirine 64 cm mesafeyle, nebülizöre (Aiolos Albatross, Aiolos, İsveç) eşit uzaklıkta (215 cm) yerleştirildi. Deney öncesinde ve sırasında bir partikül sayacı (PortaCount Plus, TSI Incorporated, ABD) kullanıldı. Aerosol deneylerinin başlamasından önce, oda aktif iyonlaştırıcı kullanılarak partiküller boşaltıldı ve kollektör plakası deneyler başlamadan önce deşarj edildi ve yeni bir toplayıcı plaka ile değiştirildi. Deneyler, partikül sayımları, genellikle



40 dakikada ulaşılan bazal seviyeye tekrar çıkana kadar sürdürüldü. Her aerosol deneyinden önce nem ve sıcaklık koşulları ölçüldü.

### İyonizer teknolojisini ve cihaz

Bu çalışmada kullanılan iyonlaştırıcı cihaz, LightAir AB, Solna, İsve'ten ([www.lightair.com](http://www.lightair.com)) iyon akışlı iyonlaştırma teknolojisi temelinde geliştirildi ve bu çalışma için Stockholm, Karolinska Enstitüsü, Mikrobiyoloji Bölümü tarafından modifiye edildi. İsve. Cihaz (13 × 35 cm boyutunda), kolektör plakası olarak 47 mm çapında iletken yüzeyli (GP plastindustri, Gislaved, İsve) plastik bir kap takılarak modifiye edildi (şekil 1). Kolektör plakası, güvenlik nedeniyle 80  $\mu$ A'dan çok daha düşük bir akıma sahiptir, ancak iyonlaştırıcı, 200.000 eV'den daha yüksek bir aşırı yüksek voltaja devinir. İyonlaştırıcı, havadaki parçacıkların yüzey moleküllerini negatif yüklü hale getirecek ve böylece onlarda pozitif yüklü toplayıcı plakaya çekecek elektronlar oluşturur. Bu cihaz, VTT Teknik Araştırma Merkezi Finlandiya, Tampere, Finlandiya tarafından test edildiği üzere, sabit durum ozon konsantrasyonunun tespit sınırının (0,002 ppm) altında olduğu saniyede yaklaşık 35 000 milyar elektron üretir ([www.lightair.com](http://www.lightair.com)). Ayrıca ABD'de ARB (Hava Kaynakları Kurulu) tarafından ozon testine tabi tutulmuş ve onaylanmıştır. Örnekleme sresinin bitiminden sonra iyonlaştırıcı kapatıldı ve toplayıcı plaka bir kapakla kapatıldı ve analize kadar -20 C'de saklandı. Toplayıcı plakalarda yakalanan virüsler, rotavirüs, CaCV ve influenza virüsü için bir RT-qPCR ile analiz edildi ve aktif ve inaktif iyonlaştırıcıların sonuçları karşılaştırıldı. Toplanan virüslerin ve lateks parçacıklarının görselleştirilmesi için tarama ve transmisyon elektron mikroskopu kullanıldı.

### Virüslerin ve Lateks partiküllerinin aerosol deneyleri

Farklı miktarlarda rhesus rotavirüs (genotip G3P [3]), influenza virüsü (H1N1 türü, Salomon adası, inaktive edilmiş) ve CaCV türü 48 (*Vesivirus* cinsi) su içinde 5 mL nihai hacme kadar seyreltildi. Taramalı elektron mikroskop ve enfektivite analiz aerosol deneylerinde, virüs Eagles MEM'de seyreltildi. Farklı konsantrasyonlardaki virüs süspansiyonları, bir nebülizör kullanılarak oda içine aerosol olarak püskürtüldü. Her deney, l olarak gerçekleştirildi ve aerosolize edilmiş virüs ve lateks partiküllerinin toplanması 40 dakika boyunca gerçekleştirildi.

### Geçirimli elektron mikroskopi (TEM)

İnfluenza ve rotavirüs ile yapılan aerosol deneyi sırasında toplayıcı üzerine karbon / Formvar kaplı 400 gözlü bakır ızgaralar yerleştirildi. Daha sonra ızgaralar, % 2 fosfotungstik asit ile negatif olarak boyanmadan ve TEM ile analiz edilmeden önce % 1 sığır serum albümini (BSA) içeren Eagles MEM'de rehidre edildi. rnek başına on ızgara karesi analiz edildi ve birim alan başına virüs partiküllerinin sayısı hesaplandı.

### Taramalı elektron mikroskopi (SEM)

Toplanan numuneler, hava geçirmez bir cihaza (GP Plastindustri AB, Gislaved, İsve) takılan bir polikarbonat 0.6  $\mu$ m filtrenin (Nucleopore, Inc) yüzeyine eklenmiştir. Filtre, oda sıcaklığında kurutuldu, 40  kalınlığında iyonize altın tabakasıyla kaplandı ve SEM (Philips Yüksek znrlkl SEM 515) ile analiz edildi. Yöntem daha önce sitomegalovirsn yanı sıra beyin omurilik sıvısı ile ilgili çalışmalarda kullanılmış ve rapor edilmiştir<sup>41,42,43</sup>.

## Toplama plakalarından Viral RNA'nın çıkarılması

Toplayıcı plakalara eklenen viral partiküller, doğrudan kolektör plakasına eklenen 1 mL viral liziz tamponu (tampon AVL, QIAamp viral RNA mini kiti) ile lize edildi ve üreticinin talimatlarına göre QIAamp Viral RNA Mini Kit (Kat. no: 52906 Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak hemen viral RNA'nın eldesine yönelindi. Her numune, 60 uL RNaz içermeyen % 0.04 sodyum azid (AVE tamponu; Qiagen, Hilden, Almanya) ihtiva eden su ile elute edildi.

## Ekstrakte edilmiş viral RNA'nın ters transkripsiyonu

Ekstrakte edilen viral RNA'nın 28 µL'si 50 pmol Pd (N)<sub>6</sub> rastgele hegzamer primer (GE-Healthcare, Uppsala, İsveç) ile karıştırıldı ve 2 dakika buz üzerinde hızla soğutuldu, ardından bir Illustra Ready-To- Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) boncuk (GE-Healthcare, Uppsala, İsveç) ilave edildi ve 50 µL'lik son bir hacme getirmek için RNaz içermeyen su eklendi. Rotavirüs için, dsRNA'yı denatüre etmede başlangıçta 97 °C'de 5 dakika süreyle bir denatürasyon aşaması gerçekleştirildi. Ters transkripsiyon (RT) reaksiyonu, daha sonra gerçek zamanlı PCR'de kullanılan cDNA'yı üretmek için 42 °C'de 40 dakika süreyle gerçekleştirildi.

## Rotavirüs için kantitatif gerçek zamanlı PCR

Rhesus rotavirüs, daha önce açıklandığı gibi bir LUX gerçek zamanlı PCR testi kullanılarak saptandı ve miktarı belirlendi<sup>7</sup>. Bu gerçek zamanlı PCR, her VP6 alt grubu için farklı floroforlara sahip etiketli primerler ve yarı kantifikasyon için harici plazmid standartları kullanır<sup>44</sup>.

## CaCV için kantitatif gerçek zamanlı PCR

CaCV, primerlerle bir ABI prizması 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) üzerinde bir SYBR yeşil analizi kullanılarak saptandı ve ölçüldü; (nihai konsantrasyon 200 nM) CaCV-3 (5-ACCAACGGAGGATTGCCATC-3' (GenBank erişim no. AF053720'ye göre 393 ila 410 nükleotidleri) ve CaCV-4 (5'-TAGCCGATCCCACAAGAAGACA-3' (nükleotidler 452 ila 474), CaCV türü 48. Reaksiyon, 10 µL 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) içinde 2 µL cDNA ile ve 20 µL nihai hacme kadar su ile gerçekleştirildi. Aşağıdaki döngü programı kullanıldı: 10 dakika süreyle 95 °C, ardından 15 saniye süreyle 95 °C'de 45 döngü ve 1 dakika süreyle 60 °C döngü. Erime eğrisi analizi, PCR tamamlandıktan hemen sonra 95 °C'de 15 saniye ısıtma, ardından 1 dakika 60 °C'ye soğutma ve ardından sürekli floresans kaydı ile 0.8 °C dakika -1'de 95 °C'ye ısıtma yoluyla gerçekleştirildi. Erime sıcaklıkları, Sekans Algılama Yazılımı versiyon 1.3.1 (Applied Biosystems) kullanılarak tüm numuneler üzerinde belirlendi ve negatif türevlerin sıcaklığa karşı grafiğini çizerek görselleştirildi.

## Rotavirüs ve CaCV ile enfektivite çalışmaları için örnekleme

İyonlaştırma teknolojisinin virüs enfeksiyonu üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığını belirlemek için rhesus rotavirüs ve CaCV aerosol haline getirildi ve 1 mL Eagles MEM ile kaplanmış aktif iyonlaştırıcı toplama plakalarında toplandı. Rotavirüs ( $1 \times 10^6$  peroksidaz oluşturan birim) ve CaCV ( $1 \times 10^6$  peroksidaz oluşturan birim), her biri toplam 5 mL hacimde aerosol haline getirildi ve 40 dakika süreyle toplandı, ardından viral enfeksiyon ve genom kopya sayısı belirlendi.

İyonize havanın kendi başına viral enfektivite üzerinde bir etkisi olup olmadığını belirlemek için rhesus rotavirüs aerosol haline getirildi ve nebülizörden 30 cm uzağa yerleştirilen, iyonizasyon olmadan 1 mL Eagles MEM içeren bir toplayıcı plaka üzerinde yakalandı.

Toplayıcı plakanın elektrostatik çekiminin viral enfektiviteyi etkileyip etkilemediğini belirlemek için, 1 ml Eagles MEM içinde rotavirüs ( $2 \times 10^5$  peroksidaz oluşturan birim) ve CaCV ( $2 \times 10^5$  peroksidaz oluşturan birim), inaktif ve aktif toplayıcı plakalara 40 dakika süreyle eklendi. Plakalar daha sonra viral enfeksiyon ve genom kopyalarının sayısı belirlenene kadar  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### Rotavirüs ve CaCV enfeksiyonunun belirlenmesi

Rotavirüs stoku ve numuneleri Eagles MEM'de 1:10 oranında seyreltildi ve ardından iki kat seyreltilerek inceltildi. Viral enfektivitenin belirlenmesi, 96 hazneli plakalarda 30 birleşimli Yeşil maymun böbrek hücreleri (MA104) üzerinde daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. CaCV enfektivitesi, esas olarak rotavirüs için olduğu gibi, numunelerin 48 hazneli plakalarda birleşik Madin-Darby Canine Böbrek (MDCK) hücrelerine eklenmesi ve enfektivite daha önce tarif edildiği gibi belirlendiği ve RT-qPCR ile teyit edildiği modifikasyon ile doğrulandı. Enfektivitenin azalmasını belirlemek için, viral genom kopya sayılarının enfektiviteye oranı aerosol haline getirilmiş virüs, aktif ve inaktif toplayıcı plakalara maruz kalan virüs ve viral stok arasında karşılaştırıldı.

### Hayvanlar

Kobaylar, Hartley cinsi dişi, 300–350 gr, Karolinska Enstitüsü, Astrid Fagraeus Laboratuvarı'nda, Tarım Kurulu ve Avrupa Konseyi Konvansiyonu'nun bilimsel amaçlarla kullanılan omurgalı hayvanlara ilişkin onaylı yönergelerine göre barındırıldı. Deneysel protokol Stockholm'deki Hayvan Etik Komitesi tarafından onaylandı (İzin Numarası: N177 / 11).

### İnfluenza virüsünün havadan yayılımı

İyonize tekniğin influenza virüsü enfeksiyonunun bulaşmasını önleyip engelleyemeyeceğini araştırmak için bir kobay hayvan modeli kullanıyoruz, çünkü bu model influenza virüsünün aerosol bulaşma çalışmalarının bir modeli olarak başarıyla kullanıldı<sup>31,33</sup>. İnsan influenza A virüsü, Pan / 99 türü (ihtimamla Peter Palese, New York, ABD tarafından sağlanmıştır), bu türün üst solunum yollarında etkili bir şekilde çoğaldığı ve kobaylarda fomitlerle değil aerosollerle etkili bir şekilde yayıldığı gösterildiğinden kullanılmıştır. Dişi kobaylar, 300-350 g, Hartley türü, Astrid Fagraeus Laboratorium, Solna, Stockholm'de barındırıldı (Etik izin N177 / 11). Dört hayvana periton içi 50 mg / kg ketamin (Ketalar el Ketaminol) ve ksilazin (Rompun) 5 mg / kg enjeksiyonu ile anestezi uygulandı ve 100 uL'de  $5 \times 10^3$  pfu Pan / 99 virüsü (her bir burun deliğine 50 uL) ile intranasal olarak enfekte edildi. Enfekte olmuş dört hayvanın tümü deney kafesine yerleştirildi (Şekil 3, kafes "A"). 30 saat p.i.'de, bulaşma kafesinin yanına (Şekil 3, kafes "B") 15 cm mesafede dört saf enfekte olmamış kobay yerleştirildi. Hava kafesler arasında serbestçe akıyordu, ancak aşılana ve maruz kalan hayvanlar arasında doğrudan temas yasaklandı.

Dört saf kobay 24 saat maruz bırakıldı ve daha sonra hayvanlar arasında aerosol geçişinin olmamasını sağlamak için ayrı ayrı havalandırılan kafeslere konuldu. Aktif ve inaktif bir iyonlaştırıcı ile iki özdeş deney gerçekleştirildi. Nazal olarak enfekte olmuş hayvanlar, maruziyet süresinden sonra çıkarıldı ve akciğer ve trakea biyopsileri toplandı (54 saat p.i.) ve RT-qPCR ile influenza virüsü araştırıldı. Maruziyetten 21 gün sonra, enfekte olmamış kobaylardan serum alındı ve influenza A virüsüne karşı antikörlerin prevalansı ELISA ile belirlendi. Enfekte kobaylara maruz kalmadan önce (sera öncesi) ve maruziyetten 21 gün sonra (sera sonrası) her hayvandan alınan sera analiz edildi.

## İnfluenza A antikollarının ELISA tespiti

Kısaca, formalin-inaktivali Influenza A virus H1N1 (SBL Influenza Vaccine, Sanoil Pasteur, Lyon, Fransa) sıvımalı 96 hazneli plakalar (Nunc, 96 F MAXISORP, Roskilde, Danimarka), sıvama tamponunda (0.05 M sodyum karbonat tamponu, pH 9.5–9.7) 5 µg / mL'de seyreltildi ve +4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Oyuklar x3 (% 0.9 NaCl ve% 0.05 Tween-20) ile yıkandı ve 37 ° C'de 1 saat PBS tamponu içinde% 3 BSA ile bloke edildi. Serum numuneleri 1: 100 oranında seyreltildi ve ayrıca seyreltme tamponunda (% 0.5 BSA ve% 0.05 Tween-20 içeren PBS) iki kat seyreltildi ve 37 ° C'de 90 dakika inkübe edildi. Hazneler 3 kez (% 0.9 NaCl ve% 0.05 Tween-20) ile yıkandı ve 37 ° C'de 1 saat PBS tamponu içinde % 3 BSA ile bloke edildi. Serum numuneleri 1: 100 oranında seyreltildi ve ayrıca seyreltme tamponunda (% 0.5 BSA ve% 0.05 Tween-20 içeren PBS) iki kat seyreltildi ve 37 ° C'de 90 dakika inkübe edildi. Plakalar daha sonra 5 kez yıkandı ve 60 dakika süreyle 37 ° C'de ikincil biyotinlenmiş keçi-anti kobay antikoru (Vector, BA-7000) ve yaban turpu-peroksidaz (HRP) konjuge Streptavidin (DAKO, Danimarka, P0397) ile her ikisi de aynı sıcaklıkta 1: 3000 oranında seyreltmeli inkübe edildi. Plakalar daha sonra 5 kez yıkandı ve her hazneye 100 uL tetrametil benzidin (TMB) substratı (Sigma Aldrich, T-0440-16) eklendi, reaksiyon 10 dakika sürdürüldü ve 100 uL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek durduruldu. Absorbans, bir ELISA okuyucusunda (VersaMax, Molecular Devices) 450 nm'de ölçüldü. Kesme değerleri, negatif kontrol OD'nin ortalama değeri ve SD'nin 2 katı olarak hesaplandı.

## Kobay dokusundan influenza RNA'sının ekstraksiyonu

RNA, enfekte kobayın trakeasından ve akciğer dokusundan çıkarıldı. Kısaca, 100-250 mg doku bir doku homojenleştirici ile homojenize edildi ve toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre RNAeasy Midi Kit (Qiagen) ile ekstrakte edildi.

## İnfluenza virüsü için kantitatif gerçek zamanlı PCR

Kobay doku örneklerinin yanı sıra toplayıcı plakalarda influenza A virüsünü saptamak ve ölçmek için, F1-mxA (150 nM) (5'-AAGACCAATYCTGTACCTCTGA- primerleriyle Tek Adımlı Taq Man gerçek zamanlı RT-PCR testi 46) 3'), F3-mxA (150 nM) (5'-CAAGACCAATCTTGTCACCTCT GAC-3') ve R1-mxA (900 nM) (5'-TCCTCGCTCACTGGGCA - 3') ve proplar P1-Mx (110 nM) (5' -FAM-TTGTGTTACGCTCACC - MGB - 3') ve P2-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTTGTATTCACGCTCACCG - MGB -3'), Rotor-Gene Probu RT-PCR Kiti (Qiagen) ile kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, aşağıdaki döngü protokolü ile bir Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen) içinde gerçekleştirildi: 10 dakika için 50 °C, ardından 45 döngülü 5 saniye için 95 °C ve 15 saniye için 57 °C.

## Ek bilgiler

**Bu makaleden nasıl alıntı yapılır:** Hagbom, M. *et al.* Ionizing air affects influenza virus infectivity and prevents airborne-transmission. *Sci. Rep.* **5**, 11431; doi: 10.1038/srep11431 (2015).

## Teşekkürler

Dr Peter Palese'ye bu çalışmaya influenza virüsü Pan / 99 ve antiserum sağladığı için teşekkür ederiz. Bu çalışma, İsveç Araştırma Konseyi (LS) 320301 tarafından desteklenmiştir.

## Dip notlar

---

**Yazar Katkıları** L.S., H.W., R.N., M.H. ve J.N. deneyleri tasarladı, R.N. iyonlaştırıcı cihazı geliştirdi, deney odasının kurulumunu hazırladı ve taramalı elektron mikroskobu, L.S., M.H., J.N. ve R.N. deneyleri gerçekleştirdi, K.O.H. transimiyon elektron mikroskobu yaptı, M.H. ve J.N. laboratuvar analizini yaptı, L.S. ve H.W. verileri yorumladı, L.S., H.W., M.H. ve J.N. el yazmasını topladı.

## Referanslar

---

1. Lipsitch M. *et al.* Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1966–1970, (2003). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Tellier R. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *J R Soc Interface* 6 **Suppl** 6, S783–S790, (2009). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Stilianakis N. I. & Drossinos Y. Dynamics of infectious disease transmission by inhalable respiratory droplets. *J R Soc Interface* 7, 1355–1366, (2010). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. 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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. 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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Fiegel J., Clarke R. & Edwards D. A. Airborne infectious disease and the suppression of pulmonary bioaerosols. *Drug Discov Today* 11, 51–57, (2006). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Mackay I. M., Arden K. E. & Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30, 1292–1305, (2002). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. 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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Verreault D., Moineau S. & Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 413–444, (2008). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Brankston G., Gitterman L., Hirji Z., Lemieux C. & Gardam M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* 7, 257–265, (2007). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Sato T. [Infection control in hospitals]. *Masui* 59, 56–63, (2010). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Hans C. Infection control practices for avian influenza in healthcare facilities. *J Indian Med Assoc* 104, 388, 390, 392 passim, (2006). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Hatagishi E. *et al.* Establishment and clinical applications of a portable system for capturing influenza viruses released through coughing. *PloS one* 9, e103560, (2014). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. 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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. 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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Mitchell B. W. & King D. J. Effect of negative air ionization on airborne transmission of Newcastle disease virus. *Avian diseases* 38, 725–732, (1994). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Escombe A. R. *et al.* Upper-room ultraviolet light and negative air ionization to prevent tuberculosis transmission. *PLoS medicine* 6, e43, (2009). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]



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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Parvaneh S. *et al.* A new method for collecting airborne allergens. *Allergy* 55, 1148–1154, (2000). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Mochizuki M. *et al.* A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet Rec* 132, 221–222, (1993). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Galton 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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Kettleson E. M. *et al.* Airborne virus capture and inactivation by an electrostatic particle collector. *Environ Sci Technol* 43, 5940–5946, (2009). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Murray B. K. *et al.* Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of virological methods* 153, 74–77, (2008). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Nishikawa K. & Nojima H. Airborn virus inactivation technology using cluster ions generated by discharge plasma. *Sharp Tech J* 86, 10–15, (2003). [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Andersson J. *et al.* Rapid detection of cytomegalovirus using immune scanning electron microscopy. *Journal of virological methods* 16, 253–262, (1987). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Wetterberg L. *et al.* Micrometer-sized particles in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 329, 91–95, (2002). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
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). [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]