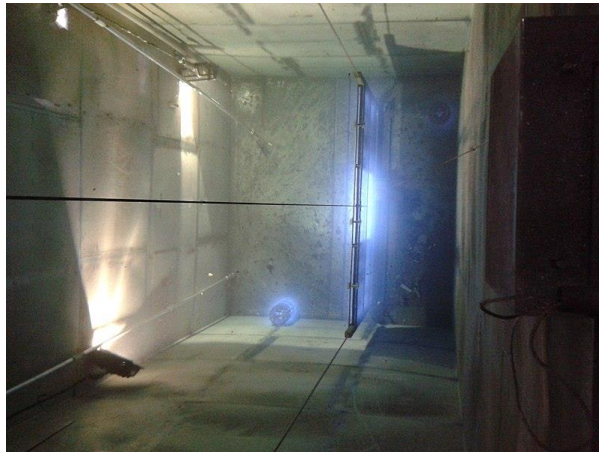


# Mikrobiologiczne aspekty procesu sterylizacji radiacyjnej ze szczególnym uwzględnieniem możliwości sterylizacji wirusów

Sylwester Sommer,  
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

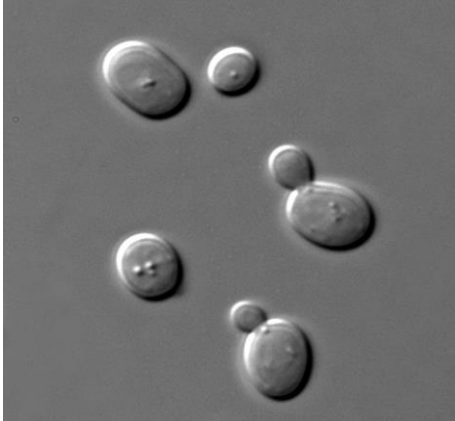


Swimmaaj Wiki

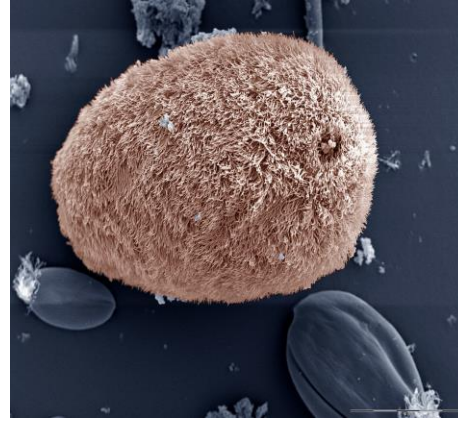


Stacja sterylizacji IChTJ

# Mikroorganizmy



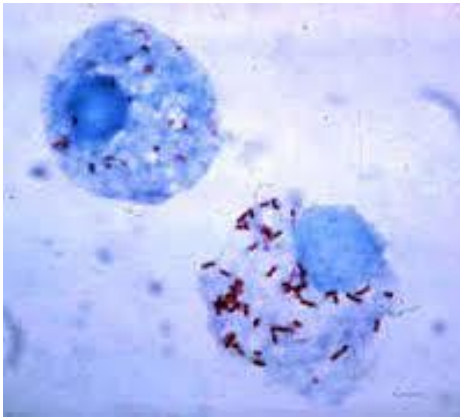
**drożdże**



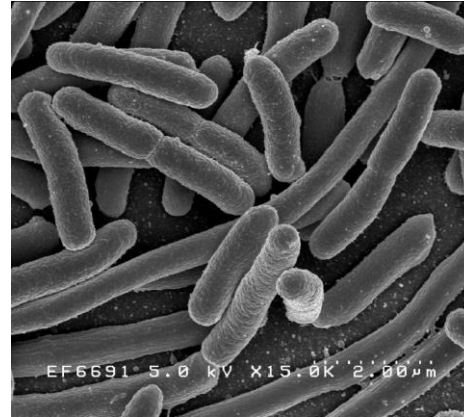
**pierwotniaki**



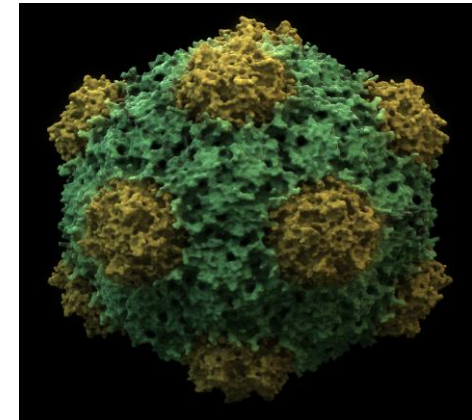
**pleśnie**



**riketsje**



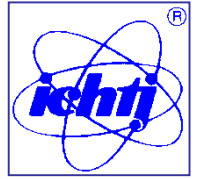
**bakterie**



**wirusy**

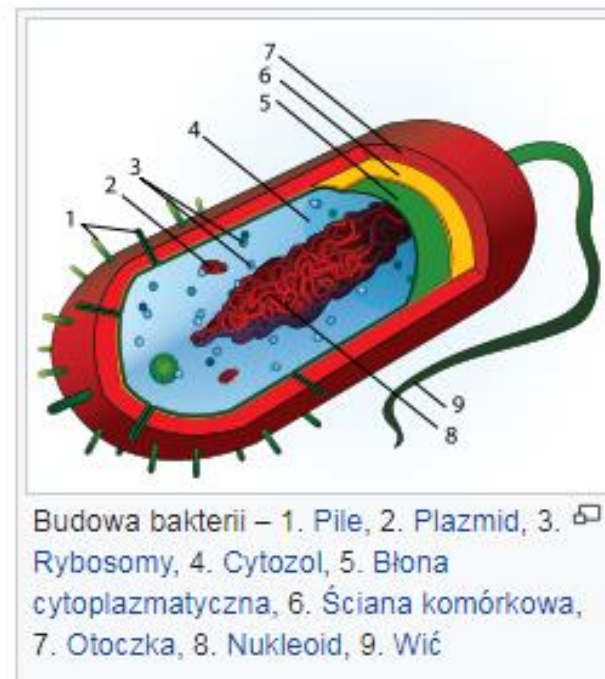
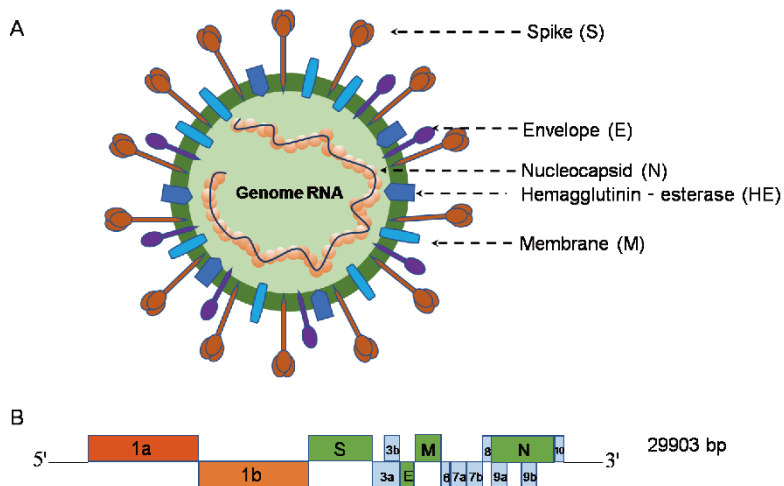
Źródło zdjęć Wikipedia

# Główne pomysły



- Celem sterylizacji radiacyjnej jest zabicie czy dezaktywowane mikroorganizmów;
- Większość mikroorganizmów (z wyjątkiem prionów) zawiera materiał genetyczny, kwasy nukleinowe, tak jak organizmy wyższe;
- Promieniowanie jonizujące niszczy DNA czy RNA i w ten sposób zabija mikroorganizmy.

# Budowa bakterii, wirusów



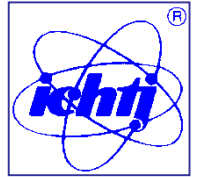
Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19.

Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, Duan G.

Viruses. 2020 Mar 27;12(4):372. doi: 10.3390/v12040372.

Mariana Ruiz Villarreal LadyofHats, Wikipedia

# Promieniowrażliwość



	D <sub>10</sub> (kGy)
Humans	0.007– 0.01
Bats	0.15
Molds	0.03 – 0.5
Escherichia coli	0.25
Vegetative form of bacteria	1-2
Bacterial spores	3-7
Viruses	5-9
Deinococcus radiodurans	10-12

D<sub>10</sub> – dla koronawirusów  
– powyżej 2 kGy (2-3 kGy)  
(<https://www.agriculture.gov.au/ba>)

D<sub>10</sub> – dawka zabijająca  
90 % populacji

# W jaki sposób promieniowanie zabija mikroorganizmy?

Uszkodzenia kwasów nukleinowych są naprawiane, albo nienaprawiane, albo błędnie naprawiane

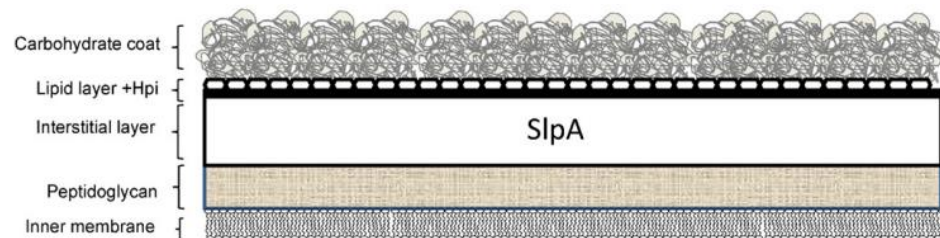
Nienaprawione lub błędnie naprawione uszkodzenia DNA (RNA) powodują powstanie niestabilności genetycznej która może być powodem śmierć komórek, najczęściej w trakcie podziału komórki.

# Fizyczna ochrona przed promieniowaniem

- "Protective colors", e.g. melanin - soil fungi can have two forms with melanin, they are radio-resistant and more sensitive without it (Ruegsegger 2010);



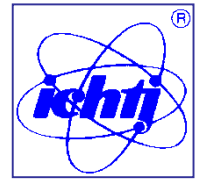
Ruegsegger 2010



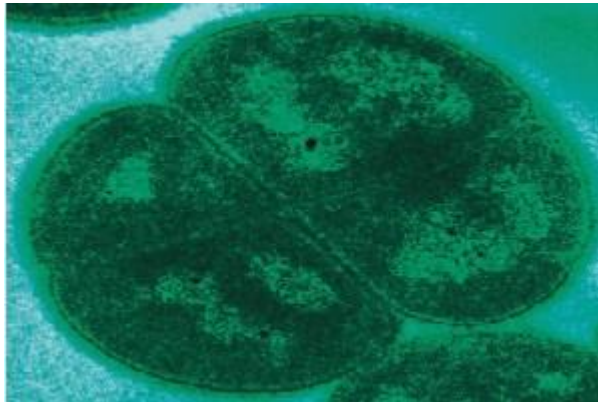
Apte 2015

"Protective layers" - the most radiation-resistant bacteria *Deinococcus radiodurans* - apart from the cell wall and plasma membrane, has five other layers outside the cell membrane (Apte 2015);

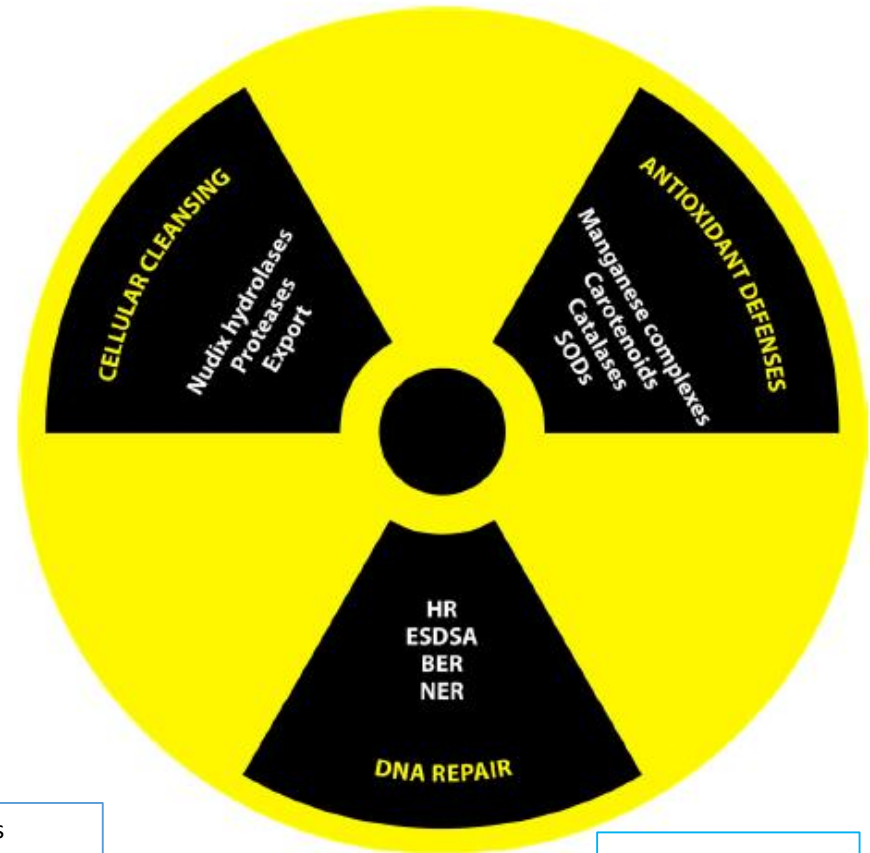
# Deinococcus radiodurans



- *D. radiodurans* jeden z najbardziej promienioopornych organizmów;
- *D. radiodurans* jest flagowym organizmem do badania promieniooporności. W Pubmedzie znajduje się około 870 publikacji na temat tej bakterii.



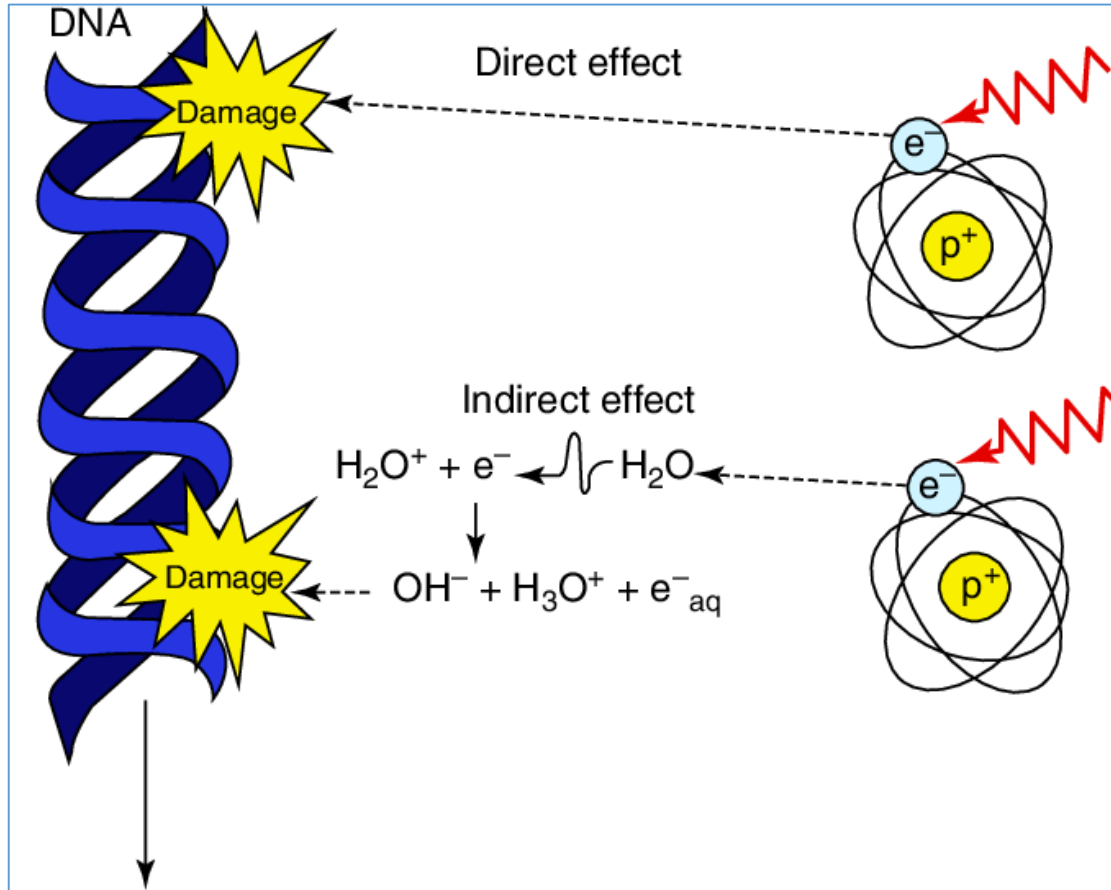
*D. radiodurans* acquired in the laboratory of Michael Daly, Uniformed Services University, Bethesda, MD, USA. Wiki



Slade 2011



# DNA damage by ionising radiation



Moreels 2020

Promieniowanie jonizujące o niskim LET (X czy gamma):

Efekty bezpośrednie = 20 %;

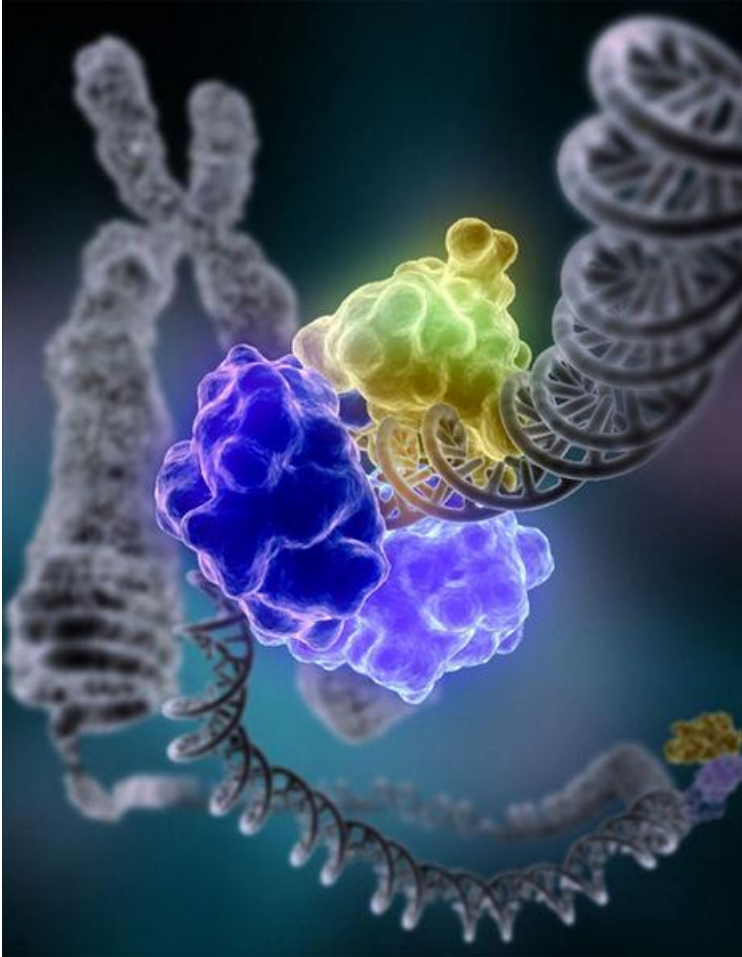
Efekty pośrednie = 80 %.

# Chemiczna ochrona przed promieniowaniem – działania antyoksydacyjne

Skierowana przeciwko wolnym rodnikom i reaktywnym formom tlenu:

- Enzymy zmiatające wolne rodniki: glutation, superoksydaza nadtlenkowa czy katalazy;
- Antyoksydanty nieenzymatyczne: karotenoidy, witaminy A, E, selen, flawonoidy i polifenole, kompleksy metali (na przykład kompleksy manganowe u D. radiodurans);
- Dla ludzi nieenzymatyczne antyoksydanty są dostępne w pożywieniu: w warzywach, pełnych ziarnach i roślinach strączkowych, w orzechach i przyprawach, kawie, herbacie, winie;
- Poziom wolnych rodników zależy od warunków tlenowych i warunków wodnych w komórce czy otoczeniu. Z uwagi na mniejsze udowodnienie, zahamowanie oddychania i podziałów spory np. grzybów czy bakterii są dużo bardziej radiooporne niż formy wegetatywne.

# Uszkodzenia DNA i ich naprawa



Tom Ellenberger Wiki 2016

Promieniowanie jonizujące powoduje kilka rodzajów uszkodzeń DNA. Najważniejsze to:

- uszkodzenia zasad;
- uszkodzenia nukleotydów;
- pojedynczoniowe pęknięcia DNA;
- podwójnioniowe pęknięcia DNA;
- uszkodzenia kompleksowe.

Uszkodzenia DNA są efektywnie naprawiane przez wysoce skomplikowane systemy naprawy DNA, które składają się z enzymów konserwowanych ewolucyjnie od bakterii do komórek ssaków.

Mikroorganizmy lepiej tolerują niestabilność genetyczną niż organizmy wyższe.

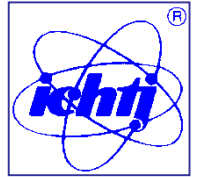
Istnieje kilka potencjalnych tłumaczeń tego faktu:

mikroorganizmy nie są kierowane na drogę śmierci komórkowej (apoptozy) co dzieje się przy niestabilności genetycznej w komórkach organizmów wyższych;

mikroorganizmy zazwyczaj mają kilka kopii każdego genu.

Mikroorganizmy dysponują efektywnymi mechanizmami rozpoznawania i oczyszczania się z nieprawidłowo sfałdowanych białek i produktów peroksydacji lipidów (aldehydów i węglowodorów). Posiadają bogaty zestaw różnego rodzaju proteaz i nukleaz.

# Efektywna sterylizacja radiacyjna



Do sterylizacji radiacyjnej używamy zazwyczaj dawek pomiędzy 10 a 30 kGy pochodzących od elektronów, promieniowania X lub promieniowania gamma.

Sukces sterylizacji zależy od dawki, warunków tlenowych, temperatury, uwodnienia mikroorganizmów, poziomu zanieczyszczenia mikroorganizmami i ich odporności na promieniowanie.

Trzeba zachować balans pomiędzy prawdopodobieństwem efektywnej sterylizacji, a wielkością dawki bo podwyższanie dawki zwiększa koszty oraz może zniszczyć sterylizowany obiekt,

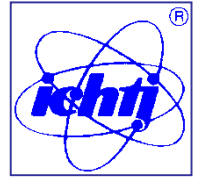
TABLE 8.1. REFERENCE MICROBIAL RESISTANCE DISTRIBUTION USED IN METHOD 1 OF ISO 11137:1995 [8.8]

$D_{10}$ (kGy)	1.0	1.5	2.0	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0	4.2
Probability (%)	65.487	22.493	6.302	3.179	1.213	0.786	0.350	0.111	0.072	0.007

TRENDS IN RADIATION STERILIZATION OF HEALTH CARE PRODUCTS, IAEA 2008

- Dla każdego rodzaju sterylizowanego produktu zawartość mikroorganizmów po napromienieniu powinna być sprawdzona w godnym zaufania laboratorium mikrobiologicznym;
- Wszystkie procedury powinny być walidowane i standaryzowane;
- Procedury powinny być zgodne ze standardami ISO;
- Powinna być stosowana kontrola jakości;
- Powinny być spełnione określone wymagania techniczne;

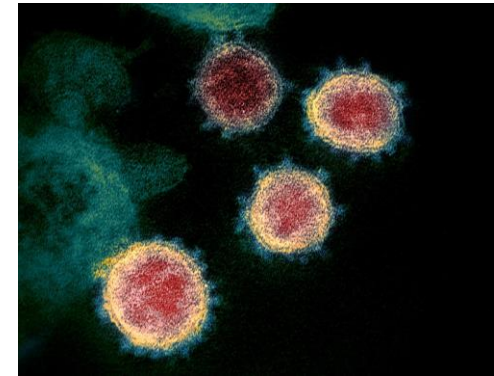
# Sterylizacja wirusów



- Generalnie wirusy są bardziej promieniooporne od bakterii i nawet ich formy przetrwalnikowej;
- Promieniowanie niszczy materiał genetyczny wirusów, ich otoczkę lipidową oraz białkowy kapsyd, ale dokładne mechanizmy nie są znane i opieramy się na analogiach;
- Do tej pory nie było potrzeby zwracania uwagi na wirusy w procesie sterylizacji, ale pandemia Covid-19 zmieniła w jakimś stopniu materiały które są sterylizowane. W większym stopniu sterylizuje się sprzęt ochrony osobistej (PPE), a ochrona przed wirusami stała się ważna.
- W przypadku wirusów dawka sterylizacyjna rzędu 20 kGy wydaje się być wystarczająca (1) ale rozpatruje się również wyższe dawki (2).

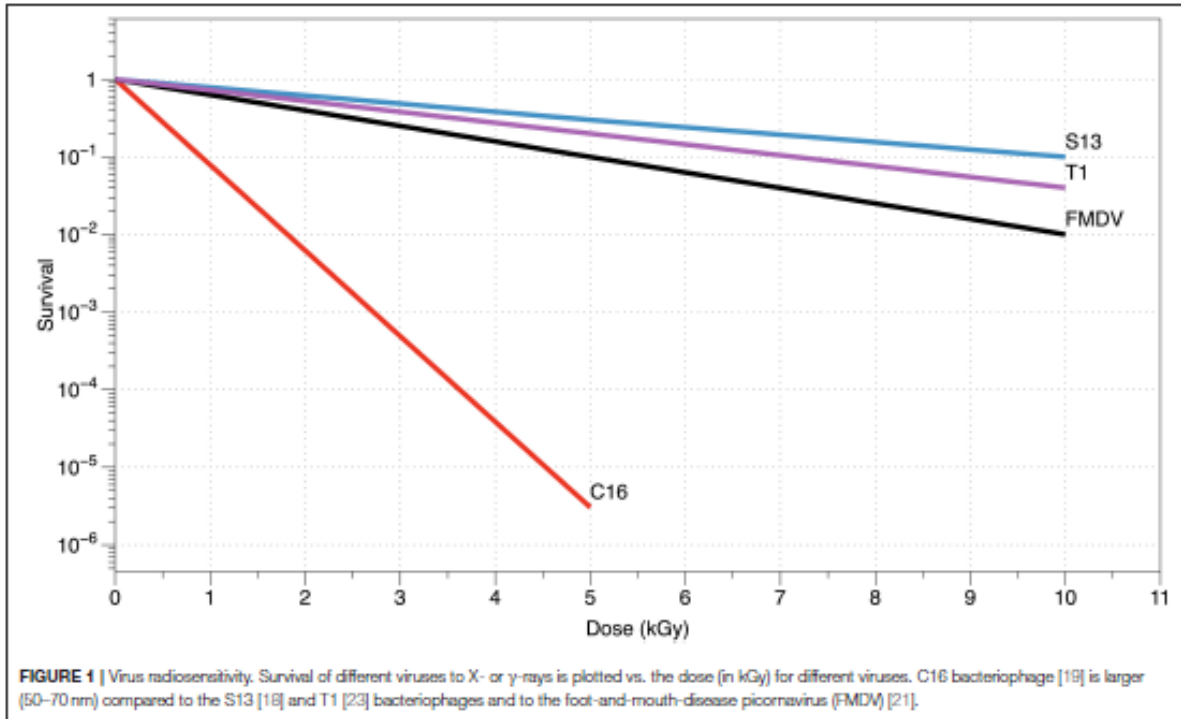
1. European Centre for Disease Prevention and Control, 2020b. Cloth masks and mask sterilisation as options in case of shortage of surgical masks and respirators. Available on 8th April 2020 at <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/clothmasks-sterilisation-options-shortage-surgical-masks-respirators>.

2. COVID-19 Pandemic: Radiation Sterilization of PPE (personal protective equipment). IAEA presentation 2020.



NIAID, Wiki 2020

# Sterylizacja wirusów



## Virus Irradiation and COVID-19 Disease

Marco Durante, Kai Schulze, Sebastien Incerti, Ziad Francis, Sara Zein and Carlos Alberto Guzmán. *Frontiers in Physics*, published: 20 October 2020  
doi: 10.3389/fphy.2020.565861.

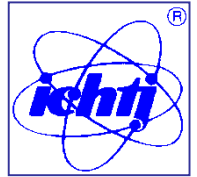


TABLE 1. D<sub>10</sub> VALUES OF SOME REPRESENTATIVE VIRUSES

Virus	Irradiation conditions	D <sub>10</sub>	Dose (9 log <sub>10</sub> reduction)	Reference / Remarks from authors
Coronavirus (transmissible gastroenteritis)	Cell culture medium	2 kGy	18-32.4 kGy	Gamma irradiation as a treatment to address pathogens of animal biosecurity concern (agriculture.gov.au/ba)
	Cell culture media	<3.1 kGy		
	Liquid manure	<3,6 kGy		
MERS-CoV	Frozen (dry ice)	<2 kGy	< 18 kGy	<i>Kumar et al.</i> (The use of gamma irradiation was shown to render 10 log <sub>10</sub> MERS-CoV undetectable by plaque assay following a dose of 2Mrad)
SARS-CoV	Wet and dry ice (not defined)	<2 kGy	< 18 kGy	<i>Feldmann et al.</i> (SARS-CoV, harboring the largest genome of all studied viruses here, was already completely inactivated by a dose of 1 Mrad)
Other RNA viruses	Frozen (dry ice)	2.5-2.7 kGy	~ 25 kGy	<i>Hume et al.</i> (D <sub>10</sub> value calculated for rVSV-EBOV <sub>gp</sub> -GFP was 0.271 Mrad, the D <sub>10</sub> value for LACV was 0.261 Mrad, and the one for rMVKSEGFP(3) was 0.253 Mrad)

IAEA Technical Report 2020: STERILIZATION AND REPROCESSING OF PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT (PPE), INCLUDING RESPIRATORY MASKS, BY IONIZING RADIATION

# Dawka sterylizacyjna (SD)



$$SD = D_{10} (\log_{10} N - \log_{10} SAL)$$

Gdzie:

$D_{10}$  – dawka przy jakiej przeżywa 10 % konkretnego rodzaju mikroorganizmu, dla koronawirusów około 2 kGy;

$N$  – początkowe zanieczyszczenia mikroorganizmami – są dane literaturowe i na przykład jeżeli chodzi o maski, o można założyć że jest to około 1000 mikroorganizmów;

$SAL$  - Sterility Assurance Level, czyli jak bardzo czysty produkt chcemy dostać po procesie sterylizacji. Dla masek to powinien być poziom w granicach  $6 \log_{10}$  redukcji;

Przy takich założeniach można obliczyć  $SD = 18$  kGy.

IAEA Technical Report 2020: STERILIZATION AND REPROCESSING OF PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT (PPE), INCLUDING RESPIRATORY MASKS, BY IONIZING RADIATION

Zmiana rodzaju produktów które się sterylizuje:



[The U.S. Food and Drug Administration](#) 2011, Wiki

Głównie sterylizujemy  
wyroby medyczne  
jednorazowego użytku  
oraz materiały do  
przeszczepów



<https://www.nursetogether.com/>. 2020, Wiki



Paul Farrant 2008, Wiki

W teraz istotnym  
wyrobem staje się  
sprzęt ochrony  
osobistej (PPE)



CDC Global ,2014, Wiki

Fot. LUVIMINA G. LANUZA PHILIPPINE NUCLEAR RESEARCH INSTITUTE DEPARTMENT OF SCIENCE AND TECHNOLOGY IAEA Webinar: "COVID-19 Pandemic: Radiation Sterilization of PPE"

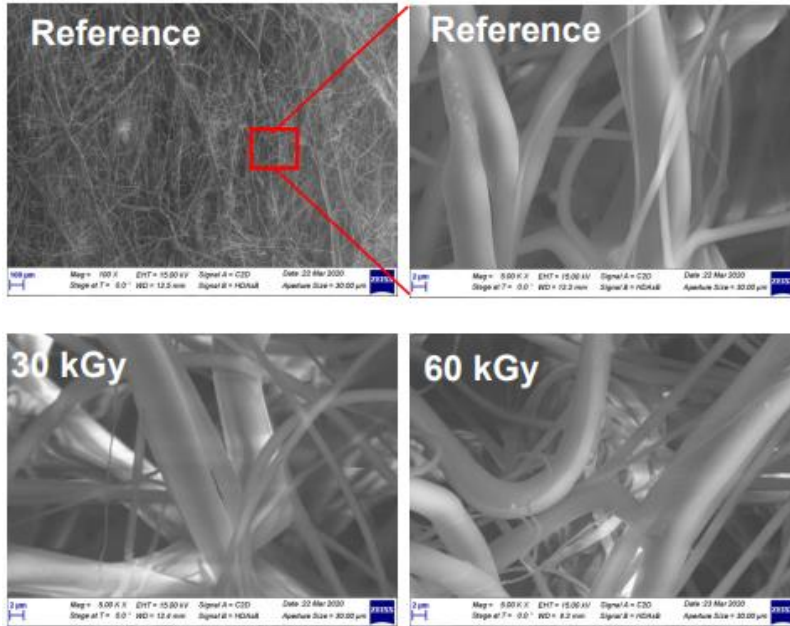
Dlaczego? Bo skokowy wzrost zapotrzebowania.  
Możliwość ponownego użycia po sterylizacji.

Badane cechy:

- Efektywność filtrowania (maski);
- Toksyczność chemiczna po napromienieniu;
- Degradacja mechaniczna;
- Degradacja chemiczna;
- Zmiany morfologiczne i wizualne;
- Zmiany mechaniczne, które wpływają na dopasowywanie masek, kombinezonów;
- Struktura chemiczna;



Photo Dr. Javed Anees, Wiki



W ocenie mikroskopowej brak strukturalnych zmian po napromienieniu różnymi dawkami;

3M aura 9332+ (FFP3) mask – internal PP layer

I. GOUZMAN, H. DATZ, R. VERKER, A. BOLKER, L. EPSTEIN, L. BUCHBINDER, Y. FRIED and E. SARID

Soreq Nuclear Research Center (SNRC), Yavne, Israel

Praca finansowana w ramach projektu Nr 305.3938-20 Central European Initiative (CEI) (Extraordinary Action 2020)

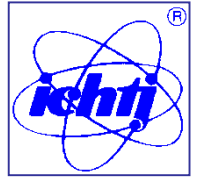


Webinar: COVID-19 Pandemic: Radiation Sterilization of PPE (personal protective equipment), May 2020;

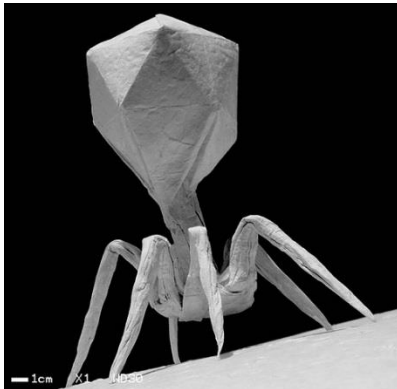
IAEA Technical Report 2020: STERILIZATION AND REPROCESSING OF PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT (PPE), INCLUDING RESPIRATORY MASKS, BY IONIZING RADIATION

Options for the decontamination and reuse of respirators in the context of the COVID-19 pandemic – Technical report, June 2020.

# Wnioski dotyczące sterylizacji PPE na podstawie danych IAEA



Promieniowanie jonizujące jest dobrym narzędziem do sterylizacji sprzętu ochrony osobistej (PPE) takiego jak np. maseczki (w tym chirurgiczne), kombinezony czy rękawiczki. Używane PPE poddane sterylizacji radiacyjnej jest bezpieczne do ponownego użycia.



Creation Wiki

Popularne maseczki oddechowe (np. N95) z włókniny polipropylenowej typu melt-blown nadają się do sterylizacji i ponownego użycia, jednak dawka sterylizacyjna nie powinna przekraczać 25 kGy. (IAEA Technical Report 2020).



**Dziękuję bardzo  
Za uwagę**