

Résumé :

Notre objectif était de développer une méthode pratique d'utilisation des propriétés antivirales connues de l'ozone dans un appareil mobile qui pourrait être utilisé pour décontaminer des chambres dans des établissements de santé, des hôtels et d'autres bâtiments. L'efficacité antivirale maximale a nécessité une courte période d'humidité élevée (> 90% d'humidité relative) après avoir atteint la concentration maximale de gaz d'ozone (20–25 ppm). Les 12 virus testés, sur différentes surfaces dures et poreuses, et en présence de fluides biologiques, pourraient être inactivés par au moins 3 log₁₀, en laboratoire et avec des essais sur terrain simulé. L'ozone a ensuite été éliminé par un convertisseur catalytique intégré.

Introduction :

Les propriétés antivirales et antimicrobiennes de l'ozone sont bien documentées, bien que les mécanismes d'action ne soient pas bien compris, et plusieurs cibles macromoléculaires pourraient être impliquées (Carpendale et Freeberg, 1991; Wells et al., 1991; Khadre et Yousef, 2002; Shin et Sobsey, 2003; Cataldo, 2006; Lin et Wu, 2006; Lin et al., 2007).

Des solutions aqueuses d'ozone sont utilisées comme désinfectants dans de nombreuses situations commerciales, y compris le traitement des eaux usées, les blanchisseries et la transformation des aliments (Kim et al., 1999; Shin et Sobsey, 2003; Naitou et Takahara, 2006, 2008; Cardis et al., 2007), mais l'utilisation du gaz à l'échelle commerciale comme dispositif de décontamination n'a pas été exploitée.

L'ozone gazeux présente cependant un certain nombre d'avantages potentiels par rapport à d'autres gaz de décontamination ainsi que les applications de liquides chimiques (McDonnell et Russell, 1999; Barker et al., 2004). L'ozone est donc un composé naturel, facilement généré in situ à partir d'oxygène ou d'air, et se décompose en oxygène avec une période d'environ 20 minutes (\pm 10 min selon l'environnement). En tant que gaz, il peut pénétrer dans toutes les zones d'une pièce, y compris les crevasses, les luminaires, les tissus et les dessous des meubles, beaucoup plus efficacement que les vaporisateurs liquides et les aérosols appliqués manuellement (Barker et al., 2004; Malik et al., 2006; Hudson et al., 2007). Les seuls inconvénients importants sont sa capacité à corroder certains matériaux, tels que le caoutchouc naturel, lors d'une exposition prolongée, et sa toxicité potentielle pour l'homme. La reconnaissance du risque de conséquences pathologiques à la suite d'une exposition de personnes et d'animaux expérimentaux à l'ozone gazeux a conduit à des restrictions dans son utilisation dans les espaces publics. Cependant, cette dernière considération peut être compensée dans une certaine mesure par les avantages potentiels de l'ozonothérapie en médecine et en dentisterie (Devlin et al., 1996; Bocci, 2004; Ciencewicki et Jaspers, 2007; Huth et al., 2007). Le danger pour la santé peut être surmonté dans la pratique en s'assurant que la pièce à traiter est temporairement fermée aux personnes pendant le traitement et est scellée pour empêcher la fuite du gaz dans l'environnement. Les matériaux sensibles peuvent être temporairement couverts ou retirés si nécessaire.

De plus, l'ozone gazeux peut être éliminé rapidement après le traitement à l'aide d'un convertisseur catalytique, qui peut transformer l'ozone en oxygène en quelques minutes. Nous avons évalué la faisabilité de l'ozone gazeux comme moyen efficace de décontaminer diverses surfaces dures et poreuses contenant des films secs ou humides de différents virus, en présence et en l'absence de débris cellulaires et de fluides biologiques. Après des expériences de laboratoire réussies, nous avons ensuite développé un prototype efficace de générateur d'ozone et de convertisseur catalytique qui pourrait être utilisé dans une pièce contenant des contaminants viraux. Nous avons également examiné le rôle de l'humidité élevée dans l'amélioration du processus d'inactivation du virus et avons intégré cette fonctionnalité dans les tests sur le terrain.

Equipement :

La chambre d'essai de laboratoire était une boîte en polycarbonate moulé avec une fenêtre avant en plastique transparent qui pouvait être soulevée pour permettre l'accès aux échantillons. Dans la chambre d'essai se trouvait un petit générateur d'ozone (système de décharge corona, de Treated Air Systems, Vancouver) équipé d'un cadran de commande qui pouvait être préréglé pour déterminer la dose approximative d'ozone en ppm, un tube d'échantillonneur d'ozone connecté à l'ozone extérieur système de mesure (pour enregistrer avec précision la concentration d'ozone, voir ci-dessous), et la sonde d'un hygromètre pour mesurer l'humidité relative et la température.

L'humidité a été fournie sous la forme d'un brouillard d'eau stérile désionisée au moyen d'un flacon pulvérisateur, qui avait été lavé avec de l'éthanol à 70%. Le générateur d'ozone Viroforce modèle 1000 (figure 1) était un module portable contenant plusieurs unités de décharge corona, un ventilateur de circulation et un convertisseur catalytique (épuration) efficace pour reconvertir l'ozone en oxygène à la fin de la période d'exposition à l'ozone (plus de détails sont disponibles sur www.viroforce.com). De plus, un humidificateur commercial portable (Humidifirst Inc, Floride) a été utilisé pour fournir un jet de vapeur d'eau (à température ambiante) lorsque cela était nécessaire. Tous les composants ont été contrôlés à distance depuis l'extérieur de la salle de test. La concentration d'ozone a été surveillée en continu au moyen d'un système Advanced Pollution Instrumentation Inc. modèle 450 (de Teledyne, San Diego), qui a mesuré des échantillons d'air ozoné passés à travers un spectromètre UV. Cet appareil a été utilisé pour toutes les mesures précises de l'ozone dans tous les endroits du test.

Le tube d'échantillonnage en téflon d'entrée a été scotché à un endroit approprié pendant la durée de l'expérience. L'humidité relative et la température ont été enregistrées par un hygromètre portable (VWR Scientific, Ontario). La sonde a été enregistrée dans un endroit pratique à l'intérieur de la salle de test.

Matériels :

Les couvercles des plateaux stériles de culture tissulaire en polystyrène ont été utilisés comme surfaces en plastique. Lames en verre, 75 · 25 mm; disques circulaires en acier inoxydable, 1,0 cm de diamètre; et des morceaux de tissu et de coton (typiques de ceux utilisés dans les chambres d'hôpital et d'hôtel) ont été nettoyés au détergent, lavés, séchés et stérilisés à l'autoclave. Les pointes de coton (Q-tips) ont été chauffées pendant 2 min dans un four à micro-ondes. Le sérum fœtal bovin et le PBS (solution saline tamponnée au phosphate) ont été obtenus auprès d'Invitrogen (Ontario). Les plaques stériles en plastique à 24 puits et autres fournitures étaient de marque BD-Falcon obtenues auprès de VWR Scientific (Ontario).

Cellules et virus :

Toutes les cellules (cellules rénales de singe Vero; cellules rénales canines MDCK; sous-clone H-1 des cellules HeLa; cellules épithéliales du poumon humain A549; cellules rénales félines; toutes acquises à l'origine de l'ATCC; cellules DBT de souris, du Dr. Pierre Talbot) ont été passés régulièrement dans Dulbecco MEM, dans des flacons de culture cellulaire, complétés par 5 à 10% de sérum bovin fœtal, à 37 ° C dans une atmosphère de 5% de CO₂, à l'exception des cellules H-1, qui ont été cultivées à 35 C. Aucun antibiotique ou agent antimycotique n'a été utilisé.

Les 12 virus suivants ont été utilisés : grippe, souche H3N2, isolat humain (du BC Center for Disease Control), propagé dans les cellules MDCK; HSV (virus de l'herpès simplex de type 1, BC-CDC), propagé dans les cellules Vero; les rhinovirus de types 1A et 14 (RV 1A et RV 14, d'ATCC), propagés dans des cellules H-1; Adénovirus types 3 et 11 (ATCC), dans des cellules A549; coronavirus de souris (MCV, du Dr Pierre Talbot) dans des cellules DBT. Le virus Sindbis (SINV), le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus

de la stomatite vésiculeuse (VSV), le poliovirus (PV, souche vaccinale), le virus de la vaccine (VV), toutes les souches ATCC, ont été cultivés dans des cellules Vero. Tous les virus d'origine ont été préparés sous forme de surnageants exempts de cellules clarifiés, avec des titres allant de 10^6 à 10^9 pfu (unités formant des plaques) par ml.

Protocole expérimental :

Des aliquotes de virus, diluées si nécessaire dans du PBS, généralement 100 μ L, ont été repérées sur la surface stérile appropriée, étalées dans un film au moyen d'une pointe stérile et laissées à sécher, dans une enceinte de biosécurité (normalement 30 à 40 min). Dans certaines expériences, les films étalés ont été laissés humides pour le traitement à l'ozone. Les échantillons ont ensuite été transportés dans des conteneurs stériles vers la chambre ou la salle appropriée pour le traitement à l'ozone. Les contrôles consistaient en des échantillons équivalents transportés sur le site d'essai mais non exposés à l'ozone, et d'autres conservés dans l'enceinte de biosécurité pendant toute la durée de l'expérience. Tous les échantillons de contrôle étaient contenus dans des boîtes en plastique stériles scellées et conservés à l'extérieur de la pièce ou de la chambre exposée à l'ozone pendant la durée du traitement.

Salles de test :

1. Les premiers essais sur le terrain ont été menés dans un laboratoire inutilisé, volume 65 m³, dans lequel nous avons utilisé 3 petits générateurs d'ozone (Treated Air Systems) situés dans différentes parties de la pièce, ainsi qu'un ventilateur de circulation. Ces tests ont été effectués à humidité ambiante (40–45% HR).

2. Dans la plupart des essais ultérieurs sur le terrain, nous avons utilisé un bureau, d'un volume de 35 m³, contenant du mobilier de bureau normal, qui était situé à côté du laboratoire. Nous avons placé le prototype de générateur d'ozone (modèle Viroforce 1000) au centre de la pièce, avec l'humidificateur. Des échantillons d'essai ont été placés à divers endroits de la pièce, et les sondes du moniteur d'ozone et de l'hygromètre ont été enregistrées à des endroits pratiques. Tous les instruments ont été contrôlés à distance depuis l'extérieur de la salle de test. Au début de l'essai, l'évent était recouvert de plastique et la porte était scellée avec du ruban adhésif. Le programme standard adopté pour la plupart des tests consistait à augmenter le niveau d'ozone sur une période de 15 min à 25 ppm, en maintenant ce niveau pendant 10 min, moment auquel l'humidificateur était activé pour produire une explosion rapide de vapeur d'eau. Cela a entraîné une augmentation de l'HR à > 95% en 5 min. Après cela, l'humidificateur et le générateur ont été éteints et le convertisseur catalytique a été allumé, ce qui a entraîné une diminution de l'ozone à <1 ppm en 15 minutes. La porte a ensuite été ouverte et les échantillons récupérés et couverts pour le transport vers l'enceinte de biosécurité. Ces échantillons, et des échantillons de contrôle équivalents qui avaient été conservés dans l'enceinte de biosécurité pendant la durée du test, ont ensuite été reconstitués dans 1,0 ml de PBS et stockés à 70 ° C jusqu'à ce qu'ils soient testés par formation de plaque (unités de formation de plaque, uFP) dans les cellules appropriées.

Sauf indication contraire, les résultats sont présentés en pfu / ml. 3. Un protocole similaire a été utilisé pour une utilisation dans la chambre d'hôtel d'essai, une chambre typique avec un lit double, des meubles et une salle de bains adjacente, d'un volume de 42,5 m³, située à Vancouver. Des échantillons de virus séchés sur des surfaces en plastique ont été transportés dans des conteneurs stériles entre le laboratoire et la chambre d'hôtel.

Résultats :

Inactivation des virus par l'ozone gazeux sur les différentes surfaces.

Puisque nous voulions évaluer l'effet de l'ozone gazeux sur des échantillons de virus séchés, nous avons d'abord examiné la capacité de plusieurs virus représentatifs à conserver un pouvoir infectieux significatif après le processus de séchage.

La plupart des virus ont montré jusqu'à 1 log₁₀ de diminution de l'infectiosité en raison du processus de séchage lui-même. Après cela, les films séchés (du HSV, du virus de la grippe, du FCV, du poliovirus et du RV) ont montré des courbes de décroissance similaires, avec une diminution de 50% (T_{1/2}) de 3 à 4 heures à température ambiante.

Ainsi, dans tous les cas, il restait des quantités plus qu'adéquates de virus infectieux après plusieurs heures, au cours desquelles des expériences avec du gaz d'ozone pouvaient être effectuées. Ces courbes de désintégration n'ont pas été significativement affectées par la présence de 10% de sérum (sérum fœtal bovin, FBS). Des résultats similaires sur la cinétique de séchage des virus ont été signalés récemment (Terpstra et al., 2007), et ces résultats confirment la croyance générale selon laquelle les virus infectieux peuvent persister longtemps sur des surfaces inanimées. Plusieurs virus, représentant différentes familles de virus et caractéristiques structurales, ont ensuite été traités avec un seul générateur d'ozone mobile dans la chambre de laboratoire, comme décrit dans Matériaux et méthodes. Tous les virus testés, HSV, influenza, MCV, FCV et RV, représentant des virus à ADN et à ARN avec et sans membranes, ont montré une cinétique similaire d'inactivation du virus sur trois surfaces dures, plastique, verre et acier inoxydable. Les valeurs de T_{1/2} variaient de 5 à 8 heures, mais il n'y avait pas de différences constantes entre les virus ou les surfaces. Exemples pour HSV (virus à ADN avec membrane), grippe (virus à ARN avec membrane) et RV (virus à ARN sans membrane) sont présentés à la figure 2. Le rhinovirus (figure 2c) était légèrement plus résistant que les deux autres virus. Néanmoins, ces résultats suggèrent que tous ou la plupart des virus devraient être sensibles au gaz d'ozone.

Amélioration de l'inactivation du virus par humidité élevée :

Nous avons ensuite examiné la possibilité d'améliorer la mort du virus en traitant des échantillons séchés de plusieurs virus avec le gaz d'ozone en présence d'une humidité relativement élevée. Des expériences préliminaires en laboratoire ont indiqué que l'effet d'enrichissement maximal a été obtenu en augmentant l'ozone jusqu'à la concentration maximale, suivie d'une explosion de vapeur d'eau pour augmenter l'humidité relative à plus de 70 %, de préférence >90 %. Cependant, nous n'avons pas la capacité de tester l'effet d'amélioration des doses graduées d'humidité. Le tableau 2 montre l'effet de l'humidité relative sur le degré d'inactivation de 3 virus différents dans un bureau d'essai, 35,4 m³ de volume. Dans ces conditions, qui comportaient une exposition beaucoup plus restreinte que les conditions utilisées pour le tableau 1, le degré d'inactivation était plus faible et plus variable à l'humidité relative ambiante, mais dans tous les cas, la combinaison de gaz d'ozone et d'humidité relative élevée a toujours donné lieu à une inactivation importante.

Par conséquent, l'efficacité optimale du traitement à l'ozone exige la présence d'une HR élevée pendant au moins plusieurs minutes.

Composition des échantillons de virus :

Sur la base de ces résultats, nous avons ensuite mené un certain nombre d'expériences avec différents virus dans le bureau d'essai, qui contenait du mobilier de bureau standard. À cette fin, nous avons utilisé un nouveau prototype de générateur d'ozone, contenant plusieurs unités d'ozone, ainsi qu'un convertisseur catalytique intégré et un ventilateur (illustré à la figure 1), et un humidificateur accessoire capable de produire une humidité de plus de 90 % en 5 minutes. Les détails des protocoles sont décrits dans la section Matériaux et méthodes. Dans ce système d'essai, nous avons pu examiner les effets de la préparation et de la composition de l'échantillon, de la charge organique et de la

position de l'échantillon dans la chambre. Les films humides et secs de virus se sont révélés également sensibles au schéma thérapeutique. De plus, la nature de la surface sur laquelle les échantillons ont été séchés n'a pas affecté le résultat. Ainsi, en plus des différentes surfaces dures mentionnées ci-dessus (verre, plastique et acier inoxydable, figure 2), les surfaces en coton et en tissu ont donné des résultats similaires au plastique (non illustré). La taille de l'inoculum (10–1 000 uL) et le degré de dilution du virus n'ont pas influencé le résultat, pas plus que la présence de débris cellulaires dans l'échantillon. Par exemple, le virus de la grippe et le virus Sindbis dans les extraits de cellules brutes et dans les surnageants clarifiés étaient également sensibles (plus de 3 log d'inactivation dans des films séchés traités à l'ozone dans une humidité élevée). Nous avons également testé l'effet du sérum et des produits sanguins, car les échantillons sur le terrain, tels que les tissus et les cadavres, et les instruments utilisés dans les cliniques dentaires et hospitalières, peuvent être contaminés par de tels matériaux (Cristina et al., 2008). Cependant, comme le montre le tableau 3, la présence de sang humain total ou de composants sériques humains et bovins n'a pas affecté l'efficacité de l'inactivation du virus, que ce soit dans des échantillons secs (données présentées) ou humides de virus.

Aérosols viraux :

Les aérosols viraux contenant des virus, un problème potentiel dans certaines pratiques dentaires et médicales (Cristina et al., 2008), ont également été testés en pulvérisant des volumes connus de suspension de FCV dans la chambre d'essai en présence ou en l'absence d'ozone gazeux, et en collectant des échantillons de condensat pour les analyses de virus. En comparaison, des quantités similaires de virus ont été pulvérisées dans la chambre sans gaz d'ozone et les volumes mesurés recueillis. Cette expérience a été effectuée deux fois, ce qui a permis de récupérer environ 1 % du virus pulvérisé à chaque fois, et d'inactiver plus de 99 %, comme l'indique le tableau 4. Ainsi, le gaz d'ozone est également capable de tuer efficacement les virus en aérosol.

Essais sur le terrain avec une humidité élevée :

Une chambre d'hôtel standard (volume 42,5 m³) a été utilisée pour l'évaluation du prototype de générateur d'ozone avec humidificateur accessoire, en utilisant la grippe et le FCV comme exemples de virus avec et sans membrane, respectivement. Des quantités connues de virus ont été séchées sur des lames de verre, qui ont ensuite été transportées dans la pièce pour un traitement à l'ozone et à l'humidité, en utilisant le protocole développé dans les tests de bureau ci-dessus. Des paires d'échantillons ont été placées à trois endroits différents dans la pièce, y compris une salle de bains adjacente. Les échantillons traités et témoins (non exposés) ont ensuite été retournés au laboratoire pour reconstitution et dosage. Les résultats sont résumés dans le tableau 5. Les deux virus ont été sensiblement inactivés, et l'emplacement des échantillons dans la pièce n'a pas affecté le résultat.

Virus sensibles :

Le tableau 6 résume les virus inactivés avec succès, par 3 log₁₀ ou plus, et leur pertinence. Comme indiqué, ces virus représentent de nombreuses familles différentes avec une gamme de structures virales animales. Certains d'entre eux ont également été suggérés comme des substituts de virus importants qui sont difficiles à cultiver *in vitro* ou qui nécessitent des installations de confinement spéciales (par exemple, virus Sindbis et virus de la fièvre jaune pour l'hépatite C; ces deux virus plus les virus de la stomatite vésiculeuse pour le VIH; virus de la grippe humaine pour la grippe aviaire; Steinman, 2004). À ce jour, nous n'avons pas rencontré de virus résistant à l'ozone.

Débat :

L'objectif de cette étude était de développer un appareil pratique et efficace pour la décontamination des espaces confinés contenant des virus infectieux. Un tel appareil pourrait être très utile dans les

hôpitaux et les établissements de soins de santé, et dans d'autres endroits où les épidémies sont relativement courantes, comme les paquebots de croisière (Lawrence, 2004).

En outre, de nombreux autres bâtiments publics et privés pourraient bénéficier d'un appareil de décontamination antiviral approprié. Les technologies existantes sont clairement inadéquates (McDonnell et Russell, 1999; Barker et al., 2004; Sattar, 2004). Des études antérieures sur l'ozone dans l'eau ont prouvé son utilité dans les blanchisseries commerciales et les installations de transformation des aliments (Kim et al., 1999; Shin et Sobsey, 2003; Naitou et Takahara, 2006; 2008; Cardis et al., 2007). Cependant, afin de réduire ou d'éradiquer les contaminants viraux dans des endroits inaccessibles, tels que les crevasses, les luminaires, le dessous des meubles, etc., il est nécessaire d'utiliser la capacité de pénétration efficace d'un gaz. L'oxyde d'éthylène n'étant pas considéré comme une alternative acceptable (McDonnell et Russell, 1999; Tseng et Li, 2008), l'ozone gazeux devrait donc être le meilleur choix disponible. Quelques études ont indiqué la faisabilité de l'ozone gazeux comme agent antiviral (Carpendale et Freeberg, 1991; Wells et al., 1991; Khadre et Yousef, 2002; Shin et Sobsey, 2003; Cataldo, 2006; Lin et Wu, 2006; Tseng et Li, 2008). Nous l'avons vérifié au moyen d'études en laboratoire et de plusieurs essais sur le terrain dans une grande salle. Nous avons ensuite découvert que l'ajout d'une salve d'humidité élevée, à la suite de l'atteinte du pic d'ozone, entraînait des réductions sensiblement plus importantes de l'infectiosité virale, dans diverses conditions. Les mécanismes précis d'action contre le virus ne sont pas compris; cependant, la large activité oxydante contre de nombreuses macromolécules (Cataldo, 2006) suggère que les membranes virales, les couches protéiques et les acides nucléiques pourraient tous être vulnérables.

Néanmoins, l'exigence d'humidité pour une efficacité optimale indique que des ions hydroxyle et éventuellement des radicaux dérivés de l'eau supplémentaires pourraient être impliqués, comme suggéré pour les environnements aqueux (Lin et Wu, 2006; Tseng et Li, 2008). Nous avons développé l'appareil prototype pour tirer parti des caractéristiques souhaitées sur la base de ces résultats expérimentaux (figure 1, Viroforce 1000). Les principales caractéristiques sont: une batterie de générateurs d'ozone enfermés dans la machine; un puissant catalyseur pour convertir l'ozone en oxygène en quelques minutes, permettant une entrée immédiate dans les locaux décontaminés, un ventilateur de circulation; télécommande intégrée et fonctions programmables.

De plus, nous utilisons un humidificateur accessoire, qui produit un nuage immédiat ou un brouillard de gouttelettes d'eau microscopiques, sans chauffage. Nous avons démontré que cet appareil était capable d'inactiver 3 journaux ou plus de nombreux virus infectieux différents dans des chambres telles qu'un bureau et une chambre d'hôtel. Nous avons également signalé récemment que le même appareil fonctionnait efficacement dans une cabine de paquebot de croisière pour inactiver les norovirus (Hudson et al., 2007).

À ce jour, nous avons testé avec succès l'appareil dans des conditions de laboratoire et de terrain contre 12 virus représentatifs, principalement des agents pathogènes humains. Certains de ces virus (légende du tableau 6) ont également été promus comme substituts valides pour des virus difficiles ou dangereux à cultiver et à tester par des techniques conventionnelles, telles que le virus de l'hépatite C, le VIH, la grippe aviaire (Steinman, 2004).

L'emplacement du virus testé dans la pièce n'était pas un facteur, un résultat auquel on pouvait s'attendre compte tenu de la pénétrabilité du gaz ozone, pas plus que la présence de sang et de produits sériques. Ce dernier résultat est important car la possibilité d'une protection microbienne contre l'ozone par des films organiques a été suggérée (Serra et al., 2003).

De plus, la présence de tels matériaux contaminés a été suggérée comme un risque de propagation des infections dans les cabinets médicaux et dentaires (Cristina et al., 2008). Un autre facteur possible, dont il a été démontré qu'il joue un rôle dans d'autres applications antimicrobiennes liquides (Sattar,

2004; Malik et al., 2006), est la présence d'une surface poreuse telle qu'un tissu ou un tapis dans laquelle le virus ou d'autres l'organisme est intégré. Cette limitation n'a cependant pas été constatée dans notre expérience de l'ozone gazeux contre les virus ou les bactéries (Hudson et al., 2007; Sharma et Hudson, 2008).

À la suite de ces études, nous pensons que l'appareil que nous avons développé, basé sur l'utilisation de l'ozone et d'une humidité élevée, a de nombreuses applications potentielles partout où une décontamination efficace des pièces est requise.