



UNIVERSITÄT
LEIPZIG



Plasmabasierte Dekontaminationsverfahren – Eine Alternative zur Inaktivierung lebensmittelassoziierter Viren?

4. BfR Symposium „Lebensmittel-assoziierte Viren“, 07.11.2018

Albert, T.



— AGENDA

- Hintergrund
- Plasmatechnologie im Überblick
- Antivirale Wirkung plasmabasierter Verfahren
- Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

— HINTERGRUND

- Übertragung lebensmittelassoziierter Viren (u.a. Noroviren, Hepatitis A-Virus) vor allem über zum Rohverzehr vorgesehene Produkte
- Kaum technologische Maßnahmen zur Risikominimierung hinsichtlich dekontaminierender Technologien (schonende Behandlung vs. Erregerstabilität) für Rohprodukte verfügbar
- Forschungsbedarf zu alternativen Technologien
- Plasma-basierte Verfahren als Alternative zur Virusinaktivierung auf Produktoberflächen?

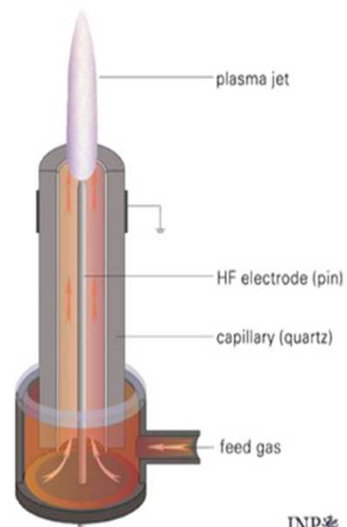
—— PLASMA TECHNOLOGIE IM ÜBERBLICK

- teilweise oder vollständig ionisiertes Gas
- „vierter Aggregatzustand“
- frei bewegliche Ionen und Elektronen
- heiß oder kalt bei unterschiedlicher Elektronendichte

— PLASMA TECHNOLOGY IN OVERVIEW

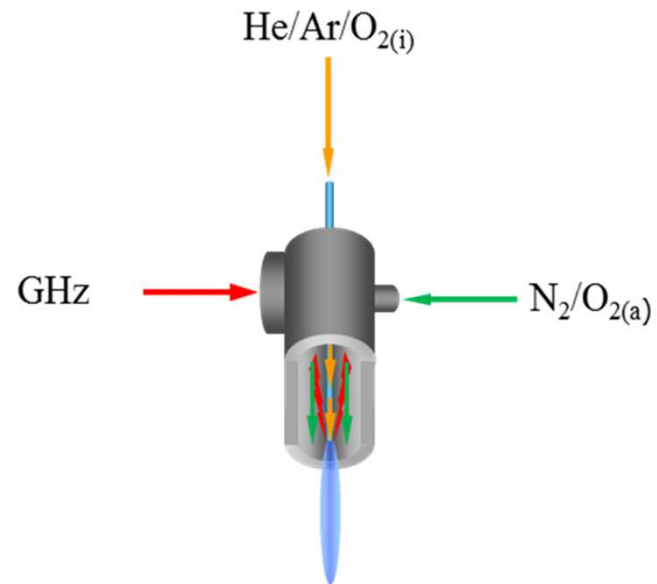
- thermal plasma
- non-thermal plasma (low pressure plasma, atmospheric pressure plasma)
- direct and indirect methods

direct methods (Plasma jets)

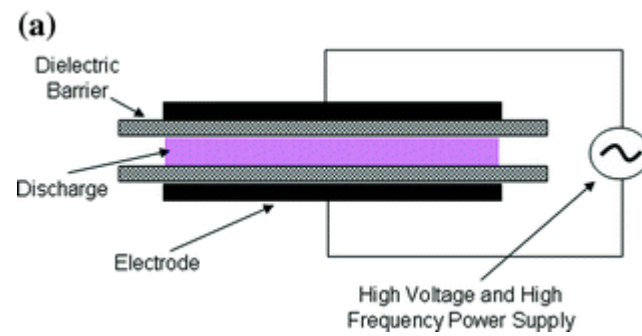


Hoentsch et al 2012 J. Phys. D: Appl. Phys. 45 025206

INP

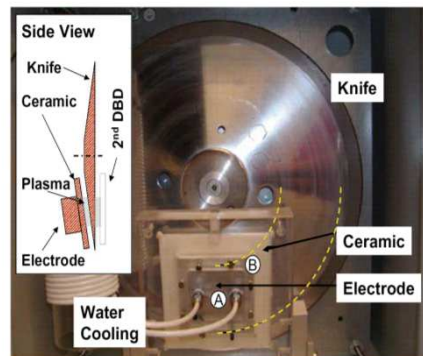


Direkte Verfahren (DBD-Dielectric Barrier Discharge)



Quelle: Subedi et al., 2017

Direkte Verfahren (DBD-Dielectric Barrier Discharge)



Quelle: Leipold et al., 2010

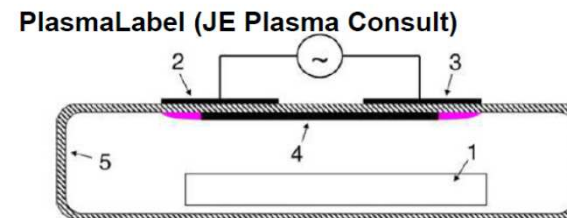
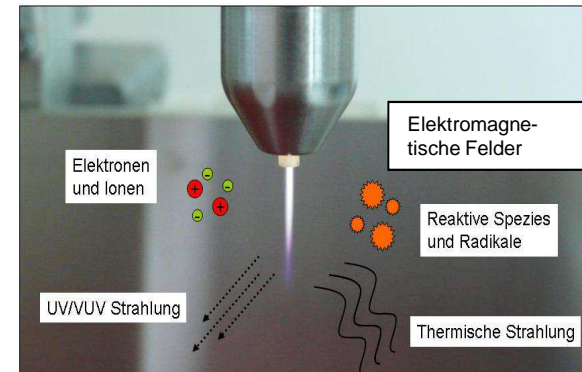
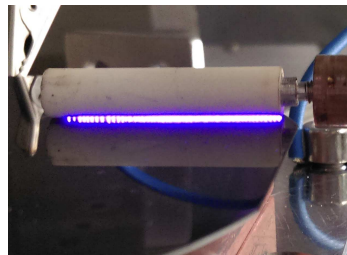


Figure 8. Scheme of PlasmaLabel concept with the goods to be disinfected (1) inside the closed package (5), two powered electrodes outside the package (2 and 3) and an inner electrode (4) (according to Schwabedissen *et al* (2007)).

Quelle: INP, Greifswald

— PLASMA TECHNOLOGIE IM ÜBERBLICK

- Mehrere Wirkmechanismen (geringe/keine Resistenzproblematik)
- Temperatur $< 60^{\circ} \text{C}$
- Oberflächenbehandlung
- Sicheres Verfahren



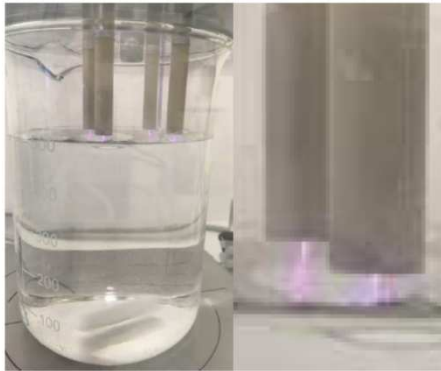
Schädigung der Zellmembran/ DNA



Zelltod

— PLASMAAKTIVIERTES WASSER

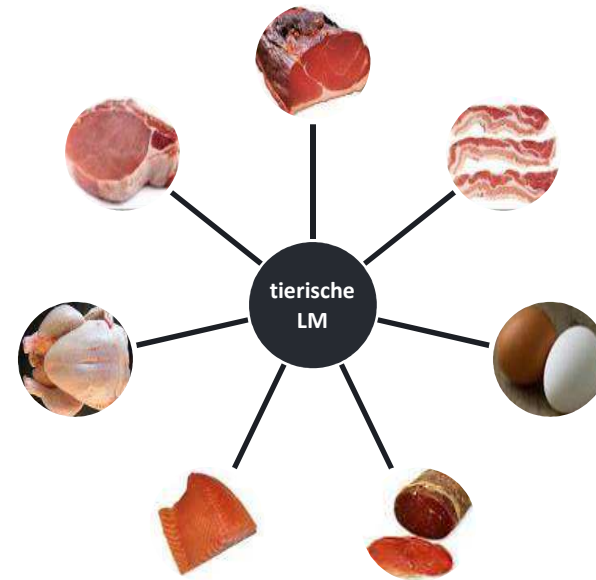
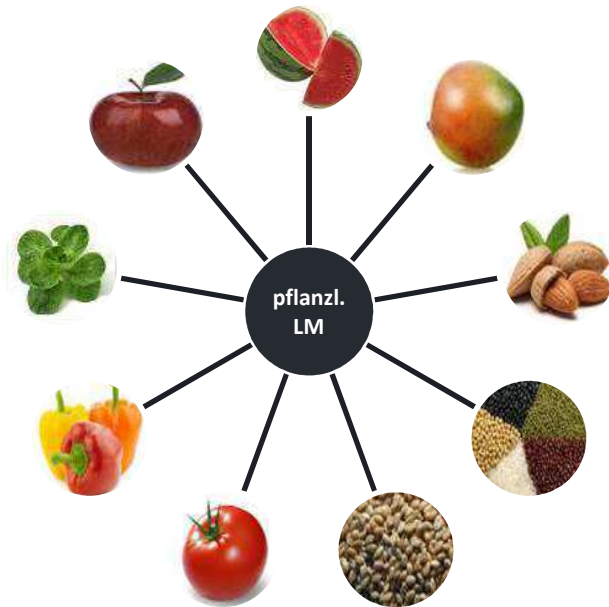
Einwirkung eines **Plasmajets**
auf der Wasseroberfläche



Einwirkung eines ionisiertes **Plasma-
Gases** im Wasser

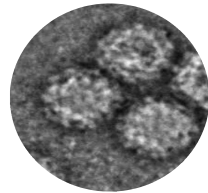
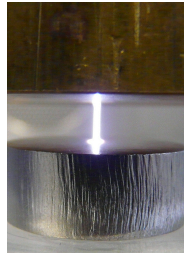


— PLASMA TECHNOLOGIE IM ÜBERBLICK

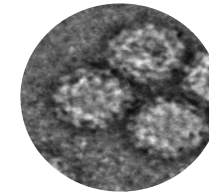


— ANTIVIRALE WIRKUNG PLASMABASIERTER VERFAHREN

1. Direktes / indirektes Plasma

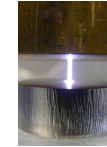


2. Plasma-aktiviertes Wasser



Antivirale Wirkung?

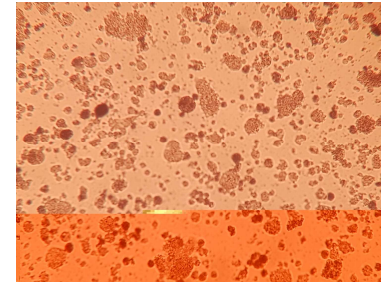
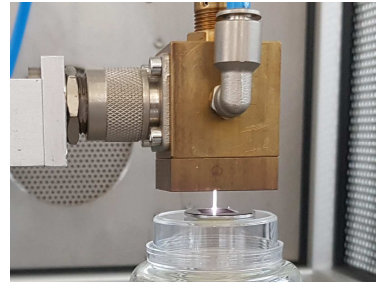
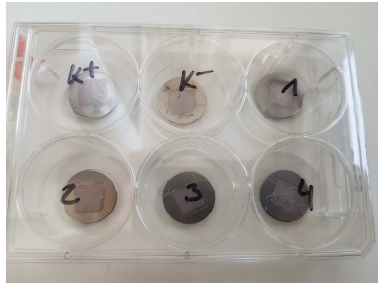
ANTIVIRALE WIRKUNG VON DIREKTEM / INDIREKTEM PLASMA



Virus	Plasmaart	Reduktion	Quelle
MS2-Phage (ATTC 15597-B1)	kaltes Atmosphärendruckplasma (Plasmajet) 99,25 % Helium + 0,75 % O ₂ oder 100 % Helium	1,38 log ₁₀ nach 3 min (ohne O ₂) 3 log ₁₀ nach 3 min (mit O ₂) > 7 log ₁₀ nach 9 min (mit O ₂)	Alshraiedeh et al., 2013
Humanes Norovirus G II.4 (Stuhlisolat)	kaltes Atmosphärendruckplasma (SMD-Surface Microdischarge)	1 log ₁₀ nach 2 min	Ahlfeld et al., 2015
Murines Norovirus (MNV-1)	kaltes Atmosphärendruckplasma (Plasmajet) 99,5 % Stickstoff	2 log ₁₀ nach 5 min auf Fleischoberflächen	Bae et al., 2015
Hepatitis A-Virus (HM-175)	kaltes Atmosphärendruckplasma (Plasmajet) 99,5 % Stickstoff	1 log ₁₀ nach 5 min auf Fleischoberflächen	Bae et al., 2015
FCV	kaltes Atmosphärendruckplasma (Plasmajet) Argon 100 %, Argon mit 1 % O ₂	6 log ₁₀ nach 30 s (100 % Argon) 6 log ₁₀ nach 15 s (Argon+1 % O ₂)	Hamada et al., 2015
Aviäres Influenzavirus	kaltes Atmosphärendruckplasma (Plasmajet) 88 % Argon + 2 % O ₂ + 10 % N	komplette Inaktivierung nach 2 min	Wang et al., 2015

— EIGENE UNTERSUCHUNGEN MIT DIREKTEM PLASMA

Virologische Parameter

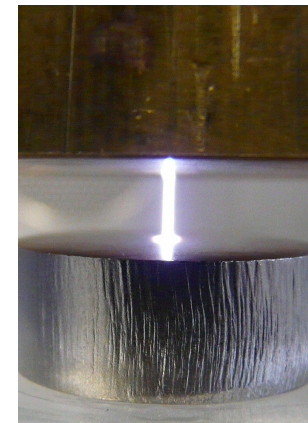
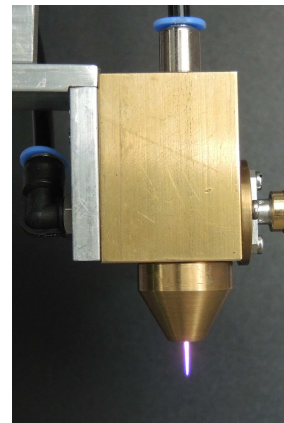


Viren:	murines Norovirus MNV-2, Newcastle Disease Virus Montana
Zellkulturen:	murine Makrophagen (MM-Zellen), LMH
Virustiter:	10^6 bis 10^7 TCID ₅₀ / Edelstahloberfläche (1x1 cm)
Probenvorbereitung:	gemäß DVG-Desinfektionsmittelprüfung Viruzidie, Ermittlung von Reduktionsfaktoren, Kontrollen

— EIGENE UNTERSUCHUNGEN MIT DIREKTEM PLASMA

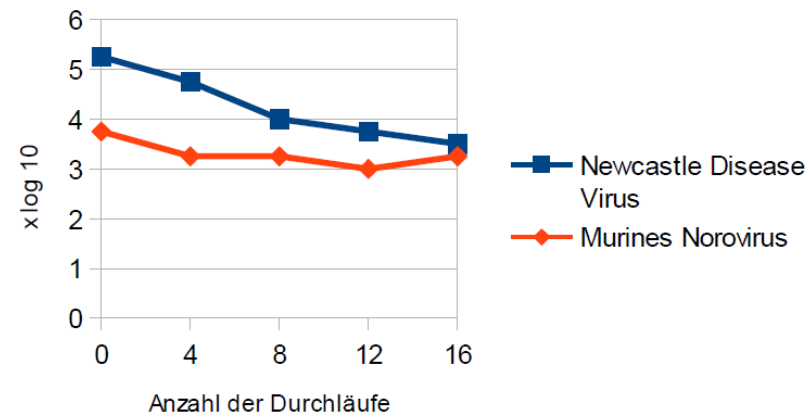
Teststand-Parameter

- Anregungsart, Leistung: Mikrowelle, 6 Watt
- Prozessgase: Ar (33 %), N₂ (66,5 %), O₂ (0,5 %)
- Temperatur Messeroberfläche: < 50 ° C
- Abstand: 6 mm
- Modelloberfläche: Edelstahl (Ø 2 cm)
- Bewegung Plasmaquelle: mäanderförmig, v=16 mm/s, Vorschub 3 mm
(4-16 Durchläufe, Gesamtexpos.: 8-128 s)



— EIGENE UNTERSUCHUNGEN MIT DIREKTEM PLASMA

Ergebnisse



- Reduktionsfaktoren murines Norovirus: max. $0,75 \log_{10}$
- Reduktionsfaktoren Newcastle Disease Virus: max. $1,75 \log_{10}$

— ANTIVIRALE WIRKUNG VON PLASMA-AKTIVIERTEM WASSER





- Antimikrobielle Wirkung bislang vor allem für bakterielle Erreger belegt
 - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Oehmigen et al., 2010)
 - *Staphylococcus epidermidis*, *Hafnia alvei* (Kamgang-Youbi et al., 2009)
 - *Escherichia coli* (Traylor et al., 2011)

- Antimikrobielle Wirkung durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

RONS (OH·, atomarer Sauerstoff O, H₂O₂, NO·, NO₂⁻, NO₃⁻...)

- Antivirale Wirkung bislang kaum untersucht
 - Newcastle Disease Virus, PAW+0,9 % NaCl/3 % H₂O₂ (Su et al., 2018)
 - Phagen (T4, MS2, φ174) (Guo et al., 2018)

— EIGENE UNTERSUCHUNG MIT PLASMA-AKTIVIERTEM WASSER (PAW)

<p>Testanlage 1</p> 	<p>Testanlage 2</p> 
<p>PAW 1: Leitungswasser nach 30 min Aktivierung: pH 3,96 – 5,04, T.: 33,1 – 33,7 °C Leitfähigkeit: 3,08 – 3,14 ms</p>	<p>PAW 3: Leitungswasser nach 5 min Aktivierung: pH 6,62 T.: 22,17 °C Leitfähigkeit: 2,95 ms</p>
<p>PAW 2: Leitungswasser + 0,85 % NaCl nach 30 min Aktivierung: pH 3,32 – 3,96, T.: 32,9 – 34,2 °C Leitfähigkeit: 52,6 – 54,5 ms</p>	<p>PAW 4: Leitungswasser + 0,85 % NaCl nach 5 min Aktivierung: pH 5,40 – 7,1 T.: 21,2 – 25,1 °C Leitfähigkeit: 52,6 – 54,8 ms</p>
<p style="text-align: center;">Prüfviren Tulane Virus RT 0450 (AT: $10^{5,5} - 10^7$ TCID₅₀) Newcastle Disease Virus Montana (AT: $10^{6,75} - 10^{7,5}$ TCID₅₀)</p>	

EIGENE UNTERSUCHUNGEN MIT PLASMA-AKTIVIERTEM WASSER

Keimträgertest (gemäß DVG)

50 µl Virussuspension
(Tulane Virus oder Newcastle Disease Virus)



Trocknung im Exsikkator
(18 min, 22 °C, 950 mbar)



Zugabe von 100 µl PAW
Zugabe von 100 µl Wasser (Kontrolle)



Exposition: 1, 5, 15 und 30 min

Abstoppen der Reaktion mit
4950 µl PBS

Virustiterbestimmung mittels
Endpunkttitration

Suspensionstest

50 µl Virussuspension
(Tulane Virus oder Newcastle Disease Virus)

+
4950 µl PAW
oder
+
4950 µl Wasser (Kontrolle)



Exposition: 60 min

Virustiterbestimmung mittels
Endpunkttitration

→ Reduktionsfaktoren für MNV und NDV
bei allen geprüften
Varianten von PAW $<1 \log_{10}$

—— ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Direkte und indirekte Plasmatechnologien

- Nachweis antiviraler Wirkung (abhängig von Virusspezies + Plasmaart)
- Weiterführende Untersuchungen sind notwendig:
 - erweitertes Erregerspektrum (z.B. humane Noroviren, Hepatitis E-Virus)
 - Optimierung von Plasmaquellen
 - Wirkung auf LM-Oberflächen (Sensorik, Toxizität?)
 - industrielle Umsetzung

Plasma-aktiviertes Wasser

- Wirkung gegenüber Viren ist bis dato in Literatur kaum beschrieben.
- Wenige Daten suggerieren potentiellen antiviralen Effekt.
- In eigenen ersten Untersuchungen konnte keine signifikante antivirale Wirkung festgestellt werden.
- Weiterführende Untersuchungen sind notwendig (proof of principle).



UNIVERSITÄT
LEIPZIG

VIELEN DANK!

Thiemo Albert

Institut für Lebensmittelhygiene

An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig

T +49 341 97-217 F +49 341 97-249

albert@vetmed.uni-leipzig.de

www.lebensmittelhygiene.vetmed.uni-leipzig.de

