

Określenie działania wirusobójczego płynu do dezynfekcji Eco-pH wobec ludzkiego adenowirusa typu 5 (Ad 5)

Metoda oparta o normę PN- EN 14476

Dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni

Zakład Mikrobiologii, Katedra Patologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

1. Wstęp

Celem podjętych badań była ocena właściwości inaktywujących wirusa płynu do dezynfekcji Eco-pH wobec ludzkiego adenowirusa typu 5 przy użyciu ilościowej zawiesinowej metody według normy PN- EN 14476.

2. Laboratorium testowe

Pracownia Wirusologiczna, Zakład Mikrobiologii, Katedra Patologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

3. Charakterystyka produktu

Nazwa produktu	Płyn do dezynfekcji Eco-pH
Producent	CleanBacter Instytut Technologii Mikrobiologicznych Sp. z o.o Bieszczadzka 16, 20-722 Lublin
Data ważności	-
Wygląd i zapach	Produkt płynny; zapach swoisty
Wartość pH	-
Data dostarczenia	2020-09-20
Warunki Przechowywania	4°C, w ciemności (pomieszczenie z ograniczonym dostępem)
Składniki aktywne	biopreparat

3. Warunki doświadczenia

Data analizy	2021-01- 27
Temperatura testu	20°C ± 1°C
Stężenie produktu	2.5 % ; 5%
Czas kontaktu	60 min
Substancja interferująca	warunki czyste
Rozcieńczalnik	woda o standaryzowanej twardości
Procedura hamująca działanie produktu	bezpośrednie rozcieńczanie
Wirus testowy	Adenowirus typu 5, szczep Adenoid 75, (ATCC® VR-5™)

4. Materiał i metody

5.1 Przygotowanie zawiesiny wirusa testowego

Do przygotowania zawiesiny wirusa wg normy PN- EN 14476 (EN 5.4) linię komórkową A549 namnażano w 175 cm³ naczyniach hodowlanych (NEST SCIENTIFIC Biotechnology, New Jersey, USA) w obecności Eagle's Minimum Essential Medium z solami Earle'a i 10% surowicą płodu bydlęcego (FBS). Do monolayeru dodawano adenowirus typu 5 (zawiesina w stężeniu wyjściowym) na 1h w 37°C i delikatnie wstrząsano co 15 min. Hodowlę obserwowano codziennie do momentu pojawienia się efektu cytopatycznego, po czym 3-krotnie zamrażano ją na -80°C i rozmrażano. Zawiesinę odwirowywano (10 min., 1500 x g), a supernatant zawierający wirusa używano do testu lub przechowywano w -80°C.

5.2. Badanie zakaźności

Zakaźność określano za pomocą mianowania wirusa wg normy (EN 5.5.7). W badaniu tym, każde z testowanych logarytmicznych rozcieńczeń nanoszone było w objętości 0,1 ml do 8 dołków na mikropłytkę, zawierających 0,1 ml świeżo strypsyzynizowanych komórek A549 (10-15 x 10³ komórek na dołek). Mikropłytki inkubowano w 37°C z 5% dostępem CO₂. Płytkę obserwowano codziennie do momentu pojawienia się efektu cytopatycznego w najwyższym

rozcieńczeniu (7 dni) pod mikroskopem odwróconym (Axio Observer, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Dawkę infekcyjną TCID₅₀/ml obliczano za pomocą metody Spearman i Karber wg następującego wzoru:

$$-\log_{10}TCID_{50} = x_0 - 0.5 + \sum r/n$$

gdzie:

x_0 = log₁₀ najwyższego rozcieńczenia wykazującego 100% reakcji pozytywnych

r = ilość pozytywnych oznaczeń w najwyższym rozcieńczeniu wykazującym 100% reakcji pozytywnych i wszystkie wyniki pozytywne w kolejnych rozcieńczeniach

n = ilość oznaczeń dla każdego rozcieńczenia

5.3 Badanie inaktywacji

Skuteczność wirusobójczą płynu do dezynfekcji Eco-pH w stężeniu 2.5% i 5% (wcześniej filtrowanego w celu usunięcia bakterii) badano według normy PN- EN 14476 (EN 5.5.2). Czas kontaktu wynosił 60 minut. Dla większej wygody przeprowadzenia testu sporządzano zawiesinę równych objętości (0.1 ml) wirusa i czynnika interferującego (PBS) oraz 0,8 ml badanego środka. Bezpośrednio, po określonym czasie kontaktu, hamowano aktywność dezynfektantu przez sporządzenie szeregu rozcieńczeń do 10⁻⁸.

Mianowanie wirusa przeprowadzono po czasie kontaktu 0 min. i 60 min.

5.4. Określenie cytotoksyczności

Cytotoksyczność preparatu określano wg EN (5.5.4.1) przy użyciu 0,2 ml twardej wody i 0,8 ml badanego środka

5.5 Wrażliwość komórek

W celu kontroli wrażliwości komórek (EN 5.5.4.2) dwie objętości podwójnie destylowanej wody mieszano z ośmioma objętościami najniższego, widocznie nietoksycznego rozcieńczenia produktu w PBS. Mieszaninę dodano do objętości podwójnie stężonej zawiesiny komórek. Po godzinie inkubacji w 37°C komórki odwirowywano i ponownie zawieszano w płynie

hodowlanym. Ostatni etap obejmował porównanie mianowania zawiesiny wirusa w komórkach traktowanych preparatem i nietraktowanych (PBS) preparatem.

5.6. Kontrola skuteczności hamowania aktywności produktu

Mieszaninę preparatu (5.5.2) ze schłodzonym DMEM + 2%FCS inkubowano w łaźni z lodem przez 30 minut, wykonywano szereg rozcieńczeń do 10^{-8} . Mianowano wirusa i porównywano z mianowaniem testowym.

5.7. Test inaktywacji wirusa referencyjnego.

Jako punkt odniesienia dla określenia aktywności wirusobójczej włączono, zgodnie z normą (EN 5.5.6.2), 1.4% roztwór formaldehydu. Cytotoksyczność zawiesiny formaldehydu określano w szeregu rozcieńczeń do 10^{-5} .

6. Weryfikacja metody

Następujące kryteria wymienione w pkt. EN 5.7 zostały lub nie zostały spełnione:

- a. Miano zawiesiny wirusa pozwoliło na określenie redukcji wirusa o $\geq 4 \log_{10}$
- b. Cytotoksyczność produktu w stężeniu 2.5% i 5% pozwoliła na wykrycie redukcji miana o $4 \log_{10}$
- c. Stężenie 2.5% produktu nie wykazało redukcji miana wirusa na poziomie $4 \log_{10}$ w ciągu 60 min. Redukcja wyniosła $3 \log_{10}$. Stężenie 5% wykazało redukcję wirusa o $\geq 4 \log_{10}$
- d. Porównawcze mianowanie wirusa w komórkach A549 inkubowanych w obecności produktu (rozcieńczenie 1:10000) i nie inkubowanych wykazały akceptowalne różnice ($< \log_{10}$) w mianie wirusa.
- e. Kontrola skuteczności hamowania aktywności produktu była $\leq 0.5 \log$

Ponieważ wszystkie kryteria podane w normie (EN 5.7) są spełnione, badanie z adenowirusem 5 wg normy PN- EN 14476 jest ważne.

7. Wyniki

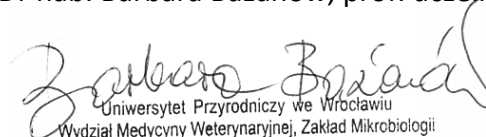
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 1 i 2.

8. Podsumowanie

Zgodnie z założeniem normy, środek dezynfekcyjny uznaje się za wirusobójczy, jeśli po rekomendowanym czasie ekspozycji miano wirusa obniżone jest o co najmniej $4 \log_{10}$ (inaktywacja $\geq 99,99\%$). Płyn do dezynfekcji Eco-pH badano w odniesieniu do adenowirusa 5, w stężeniu 2.5 i 5 %. Czas ekspozycji wynosił 60 minut. Po tym czasie określono redukcję miana dla stężenia 2.5% = $3 \log_{10}$ (preparat w tym stężeniu nie może być uznany jako środek dezynfekujący przeciwko adenowirusowi 5 i wykazuje 99.9% skuteczności) oraz dla stężenia 5% $\geq 4 \log_{10}$. W związku z tym preparat Eco-pH w stężeniu 5% może zostać uznany wg normy za wirusobójczy środek dezynfekcyjny.

Wrocław 2021-02-28

Dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni



Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Zakład Mikrobiologii
dr hab. Barbara Bażanów, prof. UPWr
Wrocław University of Environmental and Life Sciences
Faculty of Veterinary Medicine, Division of Microbiology
Barbara Bażanów, DVM, PhD, associate professor

Tab. 1 Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 2.5% względem adenowirusa 5

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	2.5%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	3343 4433	2332 3212	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	2.5%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	60	tttt tttt	tttt tttt	0010 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4444	3444	4231	3343	2211	1010
				4444	4444	4444	4444	3423	2232	1112	1101
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4433 4444	2433 3424	4233 3341	2121 2111	1110 0011

Tab. 2 Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 5% względem adenowirusa 5

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	5%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	1222 1110	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	5%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	60	tttt tttt	tttt tttt	0010 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4444	3444	4443	3343	3332	4433
				4444	4444	4444	4444	4234	4444	4233	3334
			60	4444	4444	4444	4433	3344	4233	4432	3323
				4444	4444	4444	4444	4441	3444	3332	3333

n.d. = nie dotyczy

0 = brak obecności wirusa

t =cytotoksyczność

1-4 = obecność wirusa (stopień nasilenia efektu cytopatycznego w 8 dołkach mikropłytki)