

Określenie działania wirusobójczego produktu dezynfekującego Eco-pH wobec ludzkiego herpeswirusa typu 1 (HSV -1)

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 produktu dezynfekującego Eco-pH wobec ludzkiego herpeswirusa typu 1, 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

4. Warunki doświadczenia

Data analizy	2021-03- 08
Temperatura testu	20°C ± 1°C
Stężenie produktu	5%
Czas kontaktu	60 min
Substancja interferująca	warunki czyste
Rozcieńczalnik	woda o standaryzowanej twardości
Procedura hamująca działanie produktu	bezpośrednie rozcieńczanie
Wirus testowy	Ludzki herpeswirus typu 1 (ATCC® VR-1493™)

5. Materiał i metody

5.1 Przygotowanie zawiesiny wirusa testowego

Do przygotowania zawiesiny wirusa wg normy PN- EN 14476 (EN 5.4) linię komórkową HeLa namnażano w 175 cm³ naczyniach hodowlanych (NEST SCIENTIFIC Biotechnology, New Jersey, USA) w obecności Dulbecco's Minimum Essential Medium i 10% surowicą płodu bydlęcego (FBS). Do monolayeru dodawano ludzki herpeswirus typu 1 (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 strypsynizowanych komórek HeLa (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 produktu dezynfekującego Eco-pH w stężeniu 5% 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 użytkowym pozwoliła na wykrycie redukcji miana o $4 \log_{10}$
- c. Stężenie 5% produktu wykazało redukcję miana wirusa na poziomie $4 \log_{10}$ w ciągu 60 min.
- d. Porównawcze mianowanie wirusa w komórkach HeLa 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 herpeswirusem opryszczki typu 1 wg normy PN- EN 14476 jest ważne i wykazuje redukcję na poziomie 99.99%.

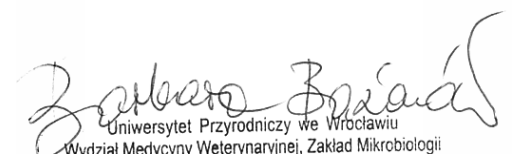
7. Wyniki

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 1.

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 $\geq 99,99\%$). Produkt dezynfekujący Eco-pH badano w odniesieniu do herpeswirusa ludzkiego typu 1, w stężeniu 5%. Czas ekspozycji wynosił 60 minut. Po tym czasie określono redukcję miana = $4 \log_{10}$. W związku z tym preparat w tym stężeniu może być uznany jako środek dezynfekujący przeciwko herpeswirusowi ludzkiemu typu 1.

Wrocław 2021-03-08



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
Dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni

Tab. 1 Badanie wirusobójczych właściwości Eco-pH baza względem herpeswirusa ludzkiego typu 1

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Eco-pH	5%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	2433 3244	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	5%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0100 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	60	tttt tttt	tttt tttt	1000 1000	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	4344	3443	4323	1202
				4444	4444	4444	4444	4344	3423	2231	1321
			60	4444	4444	4444	4444	3444	3444	3233	1322
				4444	4444	4444	4344	4444	3424	3342	3132

n.d. = nie dotyczy

0 = brak obecności wirusa

t =cytotoksyczność

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