

“NANO4-HYGIENE LIFE” -suihkeen virusidisen tehon testaaminen

RKI-Richtlinien (1995) ja ISO 21702:2019 mukaisen käytännönläheisen kantajatestijärjestelmän mukaan virusidisella tehopinnoitteella olevien testipintojen tutkimus koskien **Tarttuvaa gastroenteriittivirusta (TGEV-koronavirus)** -
Testiajo S2 päivätty 11./12.03.2020

Lyhyt raportti: seulontatesti S2

Tekijät:

PD Tri. Olaf Thraenhard ja Tri. Christian Jursch

Testijakso: maaliskuu 2020
Toimeksiantaja: NANO4LIFE EUROPE L.P.
Vouliagmenis Ave. 318,
Ag. Dimitrios - 173
43 Ateena / Kreikka

Antivirale Validierung & Rabies

Toimeksiantaja: NANO4LIFE EUROPE L.P.
Vouliagmenis Ave. 318,
Ag. Dimitrios - 173 43
Ateena / Kreikka

Tuotteet:

- Testipinnat: *Leneta*® -folio, mitoilla 1,6 cm x 6 cm
- 1. testituote: testipinnat pinnoitettu yhdeltä puolelta NANO4-HYGIENE LIFE -suihkeella (sisältäen tehoaineet)
- 2. testituote: pinnoittamattomat testipinnat (tai pinnoitettu ilman tehoaineita)

Testiparametrit:

- Testiolosuhteet: T = 25 °C ja 90 % r.LF
- Proteiinikuorma: ei lisäproteiinikuormaa; virusmateriaali (soluviljelyn supernatantti) levitettiin pinnalle/pinnoille ilman manipulaatiota/muutoksia
- Tilavuus/neliö -suhde: 25 µL/cm²
- Virussuspensio peitettiin foliolla (LDPE, 50 µm), jonka mitat olivat 1,2 x 5 cm (6 cm²)
- Itäminen: 1h, 8h ja 24h ilmastoidussa kammiossa KBF 115 (Fa Binder)

Testijärjestelmä:

- Sian tarttuva gastroenteriittivirus (TGEV-koronavirus); viruskanta: Toyama 36 [käytetty testissä SARS-CoV-virusta mallintavana viruksena] (Alkuperä: Friedrich Löffler-Institutin viruspankki, Insel Riems, Saksa)
- ST75/2-solut (sian sikiöaikaiset kivessolut) (Alkuperä: Robert Koch-Institute, Berliini, Saksa)

Testimenettely:

- Testi suoritettiin a. RKI-Richtlinie (1995) ja b. ISO 21702:2019 mukaisesti
- Testin periaate: kvantitatiivinen virusidinen kantajatesti, T = 25 °C ja 90 % r.LF (ilmastoitu kammiio)
- testi suoritettiin ilman (lisä)proteiinikuormaa

Taul. 1: Testatut tuotenäytteet

Nro.	Tuotteet	Säilytys-olosuhteet ¹
#1	Testituote / <u>NANO4-HYGIENE LIFE-suihke</u> (sisältäen virusidisia tehoaineita / „testinäyte“)	huoneenlämmössä
#2	Testituote / pinnoittamaton (tai pinnoitettu ilman virusidisia tehoaineita / „kontrollinäyte“)	huoneenlämmössä

¹ = rajoitettu pääsy

Antivirale Validierung & Rabies

Testitulokset:

Havainnot:

- Testipinnat kostutettiin laajalti vesipohjaisella virussuspensiolla; näin ollen, suunnilleen yhdenmukainen nestekalvo voitiin luoda lasisten lastojen avulla.
- Kun virus oli peitetty LDPE-foliolla, virusmateriaali pysyi vakaana kalvona koko tarkastelujakson ajan eikä kuivunut. Tilavuudessa kuitenkin havaittiin vähennys.

Taul. 2.1: Viruskontrolli (Virustitraus laimennusta rajoittamalla)

Näyte	VK-1a	VK-1b	VK-2a	VK-2b	VK-3a	VK-3b
	Viruskontrolli / 1 h		Viruskontrolli / 8 h		Viruskontrolli / 24 h	
Titterin/Testin til. (lg ID ₅₀)	4,2	4,8	4,05	3,9	2,25	2,85
ka. virustitteri ± K (95%) ¹	5,50 ± 0,37 / 1 mL		4,98 ± 0,35 / 1 mL		3,55 ± 0,37 / 1 mL	

¹ = Virustitterin laskelma ja 95%:n luotettavuusväli EN14476 mukaisesti

Taul. 2.2: Viruksen inaktiointi (Virustitraus laimennusta rajoittamalla)

Näyte	In-1a	In-1b	In-2a	In-2b	In-3a	In-3b
	Inaktiointi / 1 h		Inaktiointi / 8 h		Inaktiointi / 24 h	
Titterin/Testin til. (lg ID ₅₀)	3,6	3,45	1,35	1,2	[0,30	[0,30
ka. virustitteri ± K (95%) ¹	4,53 ± 0,22 / mL		2,28 ± 0,29 / mL		≤1,30 / mL	
Vähennys ² (lg ID ₅₀ ± K [95%])	0,97 ± 0,43		2,70 ± 0,46		≥2,25 ± 0,37	

¹ = Virustitterin laskelma ja 95%:n luotettavuusväli EN14476 mukaisesti

² = Viruksen vähennys: lähtöviruksen lg ID₅₀ (viruskontrolli) miinus näytteen lg ID₅₀ (nimenomaisena aikana)

Viruksen inaktiointi: (Ks. Taul. 2)

- Kun virusmateriaalia levitettiin pinnalle, nimenomaisen virustitterin vähennys oli havaittavissa melkein kaikkien virusten kohdalla. Tämä on aikaperusteista ja ilmenee myös ilman muunlaisia vaikutteita. Tämä pätee myös nykyisessä testauksessa käytettyyn testivirukseen. Kun materiaalia oli levitetty testipinnalle 8h- ja 24h -jaksoiksi, 8h jälkeen oli havaittavissa 0,5 Log:n titterivähennys ja noin 2 Log:n vähennys 24h kuluttua (ks. Taul. 2.1). On kuitenkin otettava huomioon, että tätä vähennystä voidaan pitää erittäin matalana verrattuna 1). koronavirusen ja b) muiden virusten (jopa vaipattomat virukset) yleiseen pysyvyyteen.
- Jotta testattavan pinnoitteen virusinaktiointikapasiteettia voidaan arvioida yksinomaisena tekijänä, erillistä viruskontrollia analysoitiin kunakin testatulla ajankohdalla. Viruksen vähennystekijä on määritettävissä nimenomaisen ajankohdan lähtövirusmäärällä (ks. taul. 2.1) ja jäljellä olevan testiviruksen vastaavalla määrällä (ks. taul. 2.2).

Tri. Christian Jursch

☒ Itämisajan jälkeen, ja yllä määritetyissä testiolosuhteissa, tehoainetta sisältävän pinnoitteen viruksen vähennystekijä oli $RF = 0,97 \pm 0,43$ 1h jälkeen, $RF = 2,70 \pm 0,46$ 8h jälkeen, ja $RF \geq 2,25 \pm 0,37$ 24h jälkeen (ks. Taul. 2.2). On huomioitava, että 24h jälkeen testivirusjäämiä ei ollut havaittavissa.

Antivirale Validierung & Rabies

Johtopäätökset:

- Testituotteisiin laitettu viruskalvo, joka peitettiin LDPE-foliolla, oli vakaa koko tarkastelujakson ajan. Tämä tarkoittaa sitä, että viruskalvo pysyi nestemäisessä tilassa jopa pisimmän altistusajan (24h) päätteeksi eikä kuivunut. Näin ollen, virusmateriaalin ja testikantajan pinnan välillä oleva jatkuva kontakti varmistettiin koko tarkastelujakson ajaksi, ja suoritettiin virusmateriaalin levitys nestemäisessä vaiheessa diffuusioiden.
- Tunnin kuluttua ($t = 1$ h) kirjattiin 0,97 Log -virusvähennys (vastaten 90% inaktiivointia) ja kahdeksan tunnin jälkeen ($t = 8$ h) viruksen vähennykseksi mitattiin $RF = 2,7$ (vastaten 99,8% inaktiivointia). Teknisistä syistä viruksen vähennyksen havainnollistaminen rajoittui arvoon $RF \geq 2,25$ 24 h kuluttua.
- Kerättyjen tietojen avulla voidaan päätellä, että tehoaineita sisältävä pinnoite on yhdistettävissä viruksen vähentymiseen. Nykyisellä testauksella osoitettiin hyvää TGEV-koronaviruksen (SARS-CoV-virusta mallintavana viruksena) inaktiivointitehoa testattavalla virusidisella pinnoitteella.
- Mainittakoon myös, että ISO 21702-ehdoissa on määritelty korkeampi itämislämpötila kuin mitä S1-testissä käytettiin (25 vs. 21 ° C).
- Ajalla $t = 8$ h saavutettu viruksen vähennys antaa ymmärtää, että korkeampi viruksen vähennys on ilmeistä kuin mitä oli osoitettavissa endpoint-titrausmenetelmällä. Tässä kohtaa, virustitterin määrittäminen *Large Volume Plating (LVP)* -pinnoituksella saattaa tarjota paremmat tulokset.

Luckenwaldessa, 28. huhtikuuta 2020

Tri. Ch. Jursch
(GF und Laborleiter Eurovir)