



WATEROX
Virusidal
Etkinlik
Test Sonuç Raporu

Bu rapor

ANTİMİKROP ANTİMİKROBİYAL MADDELERİ

ARAŞTIRMA GELİŞTİRME

VE DANIŞMANLIK HİZMETLERİ KİMYA SANAYİ TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ

Nasuh Akar Mah. Süleyman Hacıabdullahoğlu Cad. No: 37/1 Çankaya/Ankara

info@antimikrop.com.tr

Tlf: 0850 220 9089

tarafından

Palmiye Temizlik Gıda İmalat San. ve Dış Tic. Ltd. Şti.

Bahçekapı Mah. Fen İşleri Caddesi No: 4/B

Etimesgut - Ankara

için hazırlanmıştır.

NİSAN 2019

ANKARA

İÇİNDEKİLER

1. GENEL ÇALIŞMA BİLGİLERİ	
1.1. Genel	2
1.2. Test Maddesinin Tanımı	2
1.3. Çalışma Tarihleri	2
1.4. Sonuç-Özet	2
2. YÖNTEM	3
2.1. Virüs	3
2.2. Virusidal test sisteminde kullanılan hücreler	3
2.3. Test Maddesinin Hazırlanması	3
2.4. Süspansiyon Testi	3
2.4.1. Virusidal Test	3
2.4.2. Virus Geri Kazanım Kontrol	3
2.4.3. Sitotoksikite Testi	3
2.4.4. Nötralizasyon Etkinlik Testi	4
2.5. Veri Analizi	4
2.5.1. Titre Hesaplanması	4
2.5.2. Log Azalmasının Hesaplanması	4
2.6. Çalışma Kabul Kriterleri	4
3. SONUÇLAR	5
4. ÇALIŞMA KAYITLARININ SAKLANMASI	6
4.1. Kayıtların Saklanması	6
4.2. Test Maddesinin Saklanması	6
5. KAYNAKLAR	6

1. GENEL ÇALIŞMA VE SONUÇ BİLGİLERİ

1.1. Genel

Çalışma Adı: WATEROX Virusidal Etkinliği

Proje Numarası: MT-0003

Protokol Numarası: VT.0003

Test Yeri: Antimikrop Ar-Ge ve Biyosidal Analiz Merkezi

Nasuh Akar Mah. Süleyman Hacıabdullahoğlu Cad. No: 37/1 Çankaya/Ankara

1.2. TEST MADDESİNİN TANIMI

1.2.1. Test Maddesi:



Waterox: 2 adet (Komponent A ve B) ışık geçirmeyen ağzı kapalı beyaz renkli plastik şişe

Üretim Tarihi:

Lot Numarası:

1.3. ÇALIŞMA TARİHLERİ

Numunenin Alındığı Tarih: 27 ŞUBAT 2019

Deney Başlangıç Tarihi: 02 MART 2019

Çalışma Tamamlanma Tarihi: 05 MART 2019

1.4. SONUÇLARIN ÖZETİ

Test Maddesi: WATEROX

Kullanılan yoğunluk: Üretici tarifine göre sulandırmadan kullanıldı

Virüsler: Poliovirus Tip 1

Maruz Kalma Süresi: 15 dakika

Maruz Kalma Şartları: Temiz Şartlar: 0.3 g/l bovine albumin solüsyonu

Maruz Kalma Sıcaklığı: Oda sıcaklığı (22-24 C)

Etkinlik Sonucu:

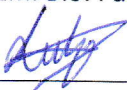
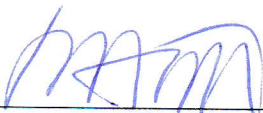
Waterox; TS EN 14476+A1 Mart 2016 standardı 'Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler -

Tıpta kullanılan kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler için virüs öldürme nicel

süspansiyon deneyi - Deney yöntemi ve gerekler (faz 2, adım 1) kullanılarak yapılan

virusidal etkinlik testinde '**temiz şartlarda**' Poliovirus Tip 1'e virüsüne karşı **VİRUSİDAL**

ETKİ GÖSTERMİŞTİR.

Kalite Sorumlusu Kimyager Nihan SEVEN 	Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvar Birim Sorumlusu Uzm. Bio. Fulya Pak 	Sorumlu Yönetici Prof. Dr. Murat ERTÜRK 
---	--	---

2. YÖNTEM

2.1. Virüs: Bu çalışmada TS EN 14476+A1 Mart 2016 standardı olan '*Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler - Tıpta kullanılan kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler için virüs öldürme nicel süspansiyon deneyi - Deney yöntemi ve gerekler (faz 2, adım 1)*'de tarif edildiği gibi **Poliovirus type 1, LSc 2ab** suşu kullanılmıştır. Adı geçen virüs VERO hücre kültüründe yüksek titrelerde çoğaltılarak -80 C de saklanmıştır.

2.2. Test sisteminde kullanılan hücreler: Vero hücreleri 36-37⁰ C'de, %5 CO₂ ve nemli bir ortamda pasajlanarak master stok olarak saklanmış; T75 hücre kültür kaplarında % 10 Fetal Dana Serum (FDS), penisilin/streptomisin içeren Dulbecco- Minimum Essential Medium (DMEM) besi yeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Virusidal etkinlik testi için hücreler 96 kuyucuklu pleytlere ekilerek hazırlanmıştır.

2.3. Test Maddesinin Hazırlanması:

2.2.1. Waterox: üreticinin tarifine göre komponent A ve Komponent B 1:1 oranında karıştırılıp 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra kullanıldı.

2.4. Süspansiyon Testi: Özet olarak; engelleyici madde olarak 0.3 g/l bovine albumin solüsyonu (temiz şartlar) içeren bir ortamdaki virus ile virusidal etkinliği test edilecek maddenin belli süre inkübasyonu ve daha sonra ortamdan alınan örneklerde virus varlığını/yokluğunu tespitine dayanan bir test sistemidir.

Waterox'un virusidal amaçla tabi tutulduğu süspansiyon test aşamaları şu şekildedir:

2.4.1. Virusidal Test (VT): Test maddesinin kullanıldığı durumdur: Yapılan işlemler sırası ile;

2.4.1.1. İçerisinde 1 ml engelleyici madde (temiz ortam) bulunan tüpe 1 ml virus süspansiyonundan eklendi.

2.4.1.2. Üzerine 8 ml test maddesi eklendi. Karıştırıldıktan sonra 5 dakika beklenip ortamdan 0.5 ml örnek soğuk 4,5 ml % 2 FDS içeren maintenance mediuma (DMEM) eklendi. Karışım kısa bir süre vortekslendi.

2.4.1.3. Test maddesinin daha sonraki aşamada kullanılan hücre kültür sistemine toksik etkisini azaltma/gidermek amacıyla 2.4.1.2'deki ortamdan alınan örnek kromatografi kolonundan geçirildi.

2.4.1.4. Kolondan elde edilen eluat % 2 FDS A-MEM kullanılarak 10'ar kat sulandırıldı.

2.4.1.5. Her bir sulandırmadan 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarında hazırlanmış Vero hücrelerine eklendi. 72 saat 37⁰ C, % 5 CO₂ ortamda bekletildi.

2.4.2. Virus Geri Kazanım Kontrol (VGKK): 2.4.1'de tarif edilen deney şartlarına benzer şekilde fakat test maddesi yerine distile su içeren bir ortamda virusun belli bir süre sonra minimum kayıpla tekrar elde edilebildiğini kanıtlamak için yapılmıştır.

2.4.3. Sitotoksikite Testi (STT): 2.4.1'de tarif edilen deney şartlarına benzer şekilde fakat virus yerine distile su içeren bir ortamda test maddesinin kromatografi kolonundan geçirildikten sonra elde edilen eluatın hücreler üzerine toksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için yapılmıştır.

2.4.4. Nötralizasyon Etkinlik Testi (NET): Sitotoksisite test sisteminde tarif edildiği gibi

kromatografi kolonundan geçirilen test maddesinin kalıntı olarak etken madde içermediğini kanıtlamak için yapılan testtir. Burada kolondan elde edilen eluatın her bir 10 katlık sulandırması düşük titreli virus ile karıştırılıp hücre kültürüne ekilir. Test maddesinin nötralize edildiğinin göstergesi olarak inkübasyon süresi sonunda virusun üremesi beklenir.

2.4.5. Pozitif (etkin) Kontrol Testi (VT+): Virusidal test sisteminde tarif edildiği gibi fakat Waterox yerine PAA (Perasetik Asit) kullanılarak yapılan testtir. Test sonucunda virus titresinde ≥ 4 Log azalma sağlaması beklenir.

2.5. VERİ ANALİZİ

2.5.1. Titre Hesaplanması: Virus ve sitotoksisite titreleri, Spearman-Kärber yöntemiyle hesaplandı. Hücre kültürünün % 50 sini enfekte eden doz (TCID₅₀) ve Hücre kültürünün % 50 'sine toksik olan doz (CC₅₀) -log₁₀ olarak ifade edilmiştir.

2.5.2. Log Azalmasının Hesaplanması: Başlangıç (T0) virus miktarında test maddesinin 5 dakikalık (T5) uygulanması ile gerçekleşen azalma: TCID₅₀ T0 - TCID₅₀ T5 sonucu olarak alınmıştır.

2.6. ÇALIŞMA KABUL KRİTERLERİ

- 2.6.1.** Virus Geri Kazanım Kontrol (VGKK) testinde en az 4 log₁₀ enfektivitenin geri kazanılması,
- 2.6.2.** Sitotoksisite (ST) test çalışmasında, sitotoksik düzeyin 3-log üzerinde olmaması,
- 2.6.3.** Nötralizasyon Etkinlik (NET) testinde virus üremesinin pozitif olması,
- 2.6.4.** Pozitif (etkin) Kontrol Testi: PAA'nın virus titresinde ≥ 4 Log azalma sağlaması,
- 2.6.5.** Virusidal etkinlik için VT TCID50 ile VGKK TCID50 arasında en az 4 log₁₀ fark olması,

3. SONUÇLAR

3.1. POLİOVİRUS (TEMİZ ŞARTLAR) Virusidal Süspansiyon Testi: Temiz şartlarda yüksek titrede Poliovirus içeren ortama ilave edilen WATEROX ile virusidal etkinlik test çalışmasında elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. WATEROX'unn temiz şartlarda virusidal süspansiyon testinde Poliovirus'a karşı virusidal etkisi

Seyreltme (Log ₁₀)	Virusidal Test (VT) WATEROX 15 d.	Virusidal Pozitif (VT+) PAA 15 d.	Virus Geri Kazanım (VGK) 15 d.	Nötralizan Etkinlik (NET)	Sitotoksosite (ST)	Hücre Kontrol
-1	0 0 0	0 0 0	+++	+++	0 0 0	0 0 0
-2	0 0 0	0 0 0	+++	+++	0 0 0	0 0 0
-3	0 0 0	0 0 0	+++	+++	0 0 0	0 0 0
-4	0 0 0	0 0 0	+++	+++	0 0 0	0 0 0
-5	0 0 0	0 0 0	++0	+++	0 0 0	0 0 0
-6	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++	0 0 0	0 0 0
-7	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++	0 0 0	0 0 0
-8	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++	0 0 0	0 0 0
TCID ₅₀ /ml	3.16e+00	3.16e+00	1.47 e+06			
TCID ₅₀ Log ₁₀	0,5 +/- 0	0,5 +/- 0	6,17 +/- 0,21			
Log ₁₀ azalma	5.67	5.67	ETKİLİ (≥4 log)			

(+) = virus pozitif (sitopatik etki)

(0)= virus negatif (normal hücre görünümü)

4. ÇALIŞMANIN KAYITLARININ SAKLANMASI

4.1.4. Kayıtların Saklanması: Bu çalışma için özel olarak geliştirilen tüm orijinal ham veriler arşivlenecektir. Bu orijinal veriler, yalnız bunlarla sınırlı olmamak üzere aşağıdaki bilgileri içerir: Defterler, veri formları ve hesaplamalar, elle yazılmış tüm ham veriler ile son çalışma raporunun onaylı kopyası.

4.2. Test Maddesinin Saklanması: Çalışma tamamlandıktan sonra, test maddesinin arta kalan kısmı (stabilitesine göre)Şahit Numune olarak saklanacaktır.

5. KAYNAKLAR

5.1. TS EN 14476+A1 Mart 2016: *Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler - Tıpta kullanılan kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler için virüs öldürme nicel süspansiyon deneyi - Deney yöntemi ve gerekler (faz 2, adım 1)*