



RAPORTUL TESTULUI
NF EN 14476 – ACTIVITATEA VIRUCIDĂ
A PRODUSULUI NOCOLYSE (lot 220709 OS)

Nr. Raport IPL: 1550909MA

asupra *virusului gripal* de tip A-H1N1

Acest raport se referă exclusiv la produsul supus testării.

1. Identificarea clientului:

Client: OXY'PHARM - 917 rue Marcel Paul - ZA des Grands Godets - 94508 Champigny sur Marne

2. Identificarea eșantionului

Nume produs: NOCOLYSE

Lot nr.: 220709 OS

Fabricant: OXY'PHARM - 917 rue Marcel Paul - ZA des Grands Godets - 94508 Champigny sur Marne

Condiții de depozitare: temperatura camerei, întuneric

Substanțe active: nu sunt indicate

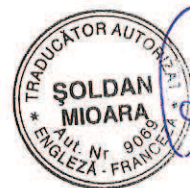
Aspectul produsului: lichid transparent

Diluanții pentru produs recomandați de fabricant pentru utilizare: produs gata preparat

3. Perioada de testare:

Data livrării: 2009/09/07

Datele testelor : 2009/09/16 până la 2009/09/28



Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille

Acest document conține 8 pagini

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.

4. Principiul de testare

Studiul constă în stabilirea activității virucide a produsului testat – organismul *Virusul gripal A-H1N1*. Acest produs este în conformitate cu EN 14476 dacă, în una dintre condițiile de testare, demonstrează cel puțin o reducere 4 log după :

- 60 de minute timp de contact pentru instrumente și dezinfectanți pentru suprafețe
- 1 minut sau 30 de secunde timp de contact pentru curățarea și spălarea igienică a mâinilor

În conformitate cu Standardul European 14476, se poate alege și testa un timp adițional, în condițiile de efectuarea a testului.

Realizarea acestui standard cuprinde câteva etape, după cum urmează:

Titrare a proporțiilor din suspensia virală.

Test preliminar constând în determinarea nivelului citotoxicității supuse dezinfecției, conform liniei celulare necesare detectării virusului. Această etapă permite definirea concentrației citotoxice a produsului, corespunzătoare sensibilității celulelor din virusul testat.

Testul de inactivare a virusului cu etanol 25 % (v/v). Această etapă reprezintă un control al sistemului de testare prin metoda de testare.

Testarea virucidă

Efectuarea controlului virusului.

5. Condițiile de efectuare a testului

Diluant produs :	apă ppi
Concentrația produsului testat :	80%
Amestec de probă :	omogen
Timp de contact (obligatoriu) :	60 de minute
Timp de contact (adițional) :	/
Temperatura de testare :	20°C±1°C
Temperatura de incubare :	37°C±1°C+5%CO ₂
Metoda de neutralizare :	Detoxifierea pe coloane Microspin TH S-400.
Grad ridicat de murdărie :	0,3g/l SAB
Celulă cu strat monomolecular :	MDCK

Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille
Acest document conține 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.



Organisme testate:

Virusul gripal tip A- H1N1- ATCC-UR1469 (10^7 la 10^8 Ui/ml).

6. Materiale și metode

6-1 – Determinarea infectivității (titrarea virusului)

Infectivitatea a fost determinată prin intermediul diluției finale în cadrul unei microanalize.

Suspensia virală netratată (suspensie gata de control și de stoc) precum și cea tratată de produs la o concentrație de test de 80% sunt diluate în serii de 10^{-1} la 10^{-11} maxim, în MEM + 2% FCS înghețat. 0.1 ml din fiecare diluție este transferat în 8 godeuri ale plăcii de microtitrare conținând celulele conflente, pornind de la cea mai mare diluție. După o ora de incubare la 37°C în prezență de CO_2 (5 %), 0,1 ml din mediul de cultură este adăugat în fiecare godeu. Pentru citirea ECP, se va folosi zilnic un microscop inversat, după 2 și apoi 5 zile de incubare. Calculul pentru titrarea infectivității este determinat prin metoda Spearman-Kärber.

6-2 – Determinarea diluției subcitotoxice a dezinfectantului

Scopul acestui test este stabilirea concentrației de dezinfectant chimic fără a induce nici un semn de toxicitate, ținând cont de linia celulară care permite descrierea virusului testat.

Pentru eliminarea citotoxicității, două tehnici sunt descrise mai jos și sunt selecționate în conformitate cu următoarele condiții:

Metoda de diluare este prima testată. Ea este validată dacă diferența între log TCID₅₀ titru virus din suspensia de stoc și gradul de non citotoxicitate este > 5 log. Dacă situația nu este așa, se va folosi cromatografia de excludere moleculară. Pentru validarea condițiilor, metoda este similară cu prima. Dacă rezultatele nu sunt satisfăcătoare din cauza metodei folosite, testul de dezinfectare a virusului nu poate fi efectuat.

1 - Metoda de diluare:

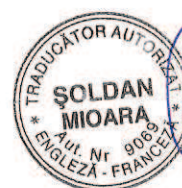
Soluția de produs testată, cu adaos de 1/5 apă pentru preparat injectabil, apă ppi, este diluată în serii de 10^{-1} la 10^{-11} în MEM 2 % FCS înghețat. Apoi, 0.1 ml din fiecare diluție este transferat în 8 godeuri ale plăcii de microtitrare, pornind de la cea mai mare diluție. După o oră de incubare la 37°C în prezență de CO_2 (5 %), 0,1 ml din mediul de cultură este adăugat în fiecare godeu. Efectul de subcitotoxicitate este evaluat după o etapă de incubare care nu trebuie să depășească cea mai lungă perioadă de cultură de virus, cultivată pe sistemul studiat (5 zile).

Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille

Acest document conține 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.



2- Tehnica cromatografiei de excludere moleculară, cu o moleculă pe coloane MicrospinTM-S-400 HR:

Soluția de produs testată, cu adaos de apă pentru preparat injectabil, apă ppi, este filtrată pe coloanele MicrospinTM-S-400 HR. Apoi, soluția filtrată este diluată în serii de 10^{-2} la 10^{-6} în MEM + 2 % FCS înghețat. Apoi, 0.1 ml din fiecare diluție este transferat în 8 godeuri ale plăcii de microtitrare. După o oră de incubare la 37°C, cu 5 % prezență de CO₂, 0.1 ml din mediul de cultură este adăugat în fiecare godeu. Efectul de subcitotoxicitate este evaluat după o etapă de incubare care nu trebuie să depășească cea mai lungă perioadă de cultură de virus, cultivată pe sistemul studiat.

6-3 – Sensibilitatea celulei la virus

Scopul acestui test este de a se asigura că celulele MDCK cu soluția testată (la concentrațiile de subcitotoxicitate) nu modifică comportamentul virusului cu celulele. Sensibilitatea celulelor în raport cu virusul este evaluată prin comparația dintre titrul virusului din suspensia virală de stoc, obținută pe o celulă cu strat monomolecular, tratată cu diluție subcitotoxică de dezinfectant, și celula cu strat monomolecular netratată.

Tratamentul celulelor (la concentrația subcitotoxică a dezinfectantului)

Se distribuie 0.1 ml din diluția non citotoxică aparent cea mai slabă a soluției testate pe fiecare dintre cele 8 godeuri ale plăcilor de microtitrare, stabilite pentru culturile de celule. Plăcile sunt incubate la 37°C timp de o oră, cu conținut de 5 % CO₂. În același timp, suspensia virală de stoc este diluată în serii de 10^{-1} la 10^{-6} . Apoi, se adaugă 0.1 ml din fiecare diluție în fiecare godeu. Plăcile sunt incubate din nou la 37°C timp de o oră, cu conținut de 5 % CO₂. Se adaugă 0.1 ml de mediu celular în fiecare godeu. Citirea ECP este efectuată prin intermediul calcului titrului de infectivitate, determinat prin metoda Spearman-Kärber.

Celule netratate cu concentrația subcitotoxică a dezinfectantului

Se aplică aceeași procedură ca la celulele tratate. Singura diferență este că diluția subcitotoxică este înlocuită cu MEM 2% ser fetal de vițel. Doar aceste diluții ale produsului pot fi utilizate în vederea determinării infectivității reziduale care produce o reducere de titru a virusului de < 1 log.

Validarea testului:

Diferența între log DICTSO și titrarea celulelor tratate și netratate trebuie să fie de < 1 log pentru ca testul de sensibilitate a celulelor virusului să fie validat.



Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille
Acest document conține 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.

6-4 – Controlul eficienței în vederea suprimării activității dezinfectantului

Diluarea în mediu foarte rece

Imediat după prepararea amestecului testat (virus + substanță interferentă + soluție testată) ($d = 10^{-1}$), reacția este oprită: se adaugă 0,5 ml din amestecul testat în 4,5 ml MEM foarte rece + 2% ser fetal de vițel ($d = 10^{-2}$). Diluțiile se fac în același mediu de la 10^{-1} la 10^{-2} . *Virusul gripal A H1N1* este titrat conform descrierii de la paragraful 6-1.

Tehnica de filtrare

Imediat după prepararea amestecului testat, reacția este oprită prin adăugarea a 1 ml de coloane MicrospinTMS-400 HR.

După centrifugare, produsul filtrat este diluat în MEM foarte rece + 2% ser fetal de vițel de la 10^{-1} la 10^{-2} . *Virusul gripal A H1N1* este titrat conform descrierii de la paragraful 6-1.

6-5 – Testarea virucidă

Scopul unui test virucid pentru un dezinfectant este punerea în contact a suspensiei virale cu o substanță interferentă și o soluție testată.

Reacția este oprită după timpul de contact indicat :

Prin diluarea în mediu foarte rece (MEM)

Prin tehnica de filtrare pe coloane MicrospinTMS-400HR. Produsul filtrat este diluat din 10^{-1} în 10^{-2} într-un mediu foarte rece. Titarea fiecărui test este stabilită conform paragrafului 6-1.

6-6 – Testul de inactivare a virusului la Ethanol 25 % (v/v)

Testele virucide sunt efectuate pe suspensii stocate ale *virusului gripal A H1N1* cu etanol, având ca scop controlul comportamentului germenului nostru cu agenții chimici. Acest control necesită respectarea următoarelor proceduri:

Controlul citotoxicității etanolului opus liniei noastre celulare

Controlul eficienței activității oprite

Testarea virucidă a etanolului (5, 15, 30 și 60 minutes)

6-7 – Titrare standard a virusului

Infectivitatea suspensiei virale testate va fi determinată în condițiile de testare, având ca timp de contact 0 minute și 60 minute.

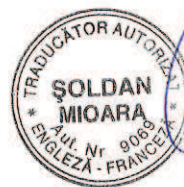
Soluția testată va fi substituită cu apă.

Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille

Acest document conține 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.



Virusul gripal A H1N1 este titrat conform descrierii de la paragraful 6-1.

7. REZULTATE

7.1 Titrare virusului:

Titru infectivității suspensiei virale: 7,625 în logUI/ml

7.2 Citotoxicitatea produsului

Examinările au arătat ca, fără tratament, dezinfectantul avea o toxicitate de 3,5 logCD50/ml. În vederea eliminării citotoxicității, tehnica de detoxifiere pe coloane Microspin TH S-400. este cea potrivită (vezi tabelul 1)

Tabel 1

	Grad de citotoxicitate (log)
Tehnica de diluare cu CI	3,5
Ultrafiltrare pe coloane Microspin TM S-400 C2	2,5

7.3 Sensibilitatea celulelor

Diferența între titrările virusului pe celulele tratate (A) și celulele netratate (B) este mai mică decât 1 (vezi tabelul 2), prin urmare testul este validat.

Tabel 2

	Celule tratate: A	Celule netratate: B
Log DICT50	7,75	8,00

7.4 Activitatea virucidă a produsului

Tabelul 3 indică rezultatele obținute în următoarele puncte:

Controlul eficienței pentru suprimarea activității dezinfectantului

Testarea virucidă

Testul de inactivare a virusului

Titrare virusului

Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille
Acest document conține 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.

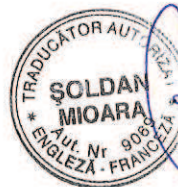


Nr. raport IPL: 1550909MA

Produs	Concentrații	Substanța interferență	Grad de citotoxicitate Log DICT50	Controlul de neutralizare Log DICT50	Log DICT50 după min					> 4 log reducere după min
					0	5	15	30	60	
NOCOLYSE	80%	0,3g/l SAB	2,5	7,825	<2,5	ad.	ad.	ad.	<2,5	Reducție mai mare de 5,375 log în 60 min
Etanol	25%	PBS	1,5	nu se aplică	8,125	7,75	7,5	6,625	5,75	Reducție mai mică de 4 log în 60 min
Controlul virusului	nu se aplică	PBS	nu se aplică	nu se aplică	8,00	ad.	ad.	ad.	7,75	nu se aplică
Testul de control al virusului	nu se aplică	0,3g/l SAB	nu se aplică	nu se aplică	8,125	ad.	ad.	ad.	7,875	nu se aplică

Calculul activității virucide: Reducție = test / control

Calculul activității virucide: Reducție = testLogDICT 50 – controlul virusului LogDICT 50



Serviciul de expertiză în igiena sanitară și industrială – Institutul Pasteur de Lille

Acest document conține 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanții săi legali.

Nr. raport IPL: 1550909MA

8. CONCLUZIE

Produsul NOCOLYSE, lot nr. 2200709, este activ 80 % după un timp de contact de 60 minute NF EN 14476 în mediu curat asupra virusului gripal tip A-H1N1.

Lille, 12 octombrie 2009

Modificat, 21 octombrie 2009



Mane-Florence GTREAUDOT

Doctor în medicină

Isabelle WATBLED

Şef tehnic



Serviciul de expertiză în igiena sanitară şi industrială – Institutul Pasteur de Lille

Acest document conţine 8 pagini.

Reproducerea acestui raport de testare este autorizată numai sub forma reproducerii integrale fotografice.

Orice referire la Institutul Pasteur de Lille se va face numai cu acordul prealabil expres, exprimat în scris, de către unul dintre reprezentanţii săi legali.

Subsemnata SOLDAN Mioara, traducător autorizat de Ministerul Justiției cu nr. 9069 / 22.05.2003, certific exactitatea acestei traduceri cu documentul original în limba engleză care a fost vizat de către mine.

TRADUCĂTOR AUTORIZAT

SOLDAN Mioara

