



FONdation pour le

DEveloppement de la

REcherche

PHARMaceutique

Certifié ISO 9001

Toulouse, 13 kwiecień 2015

BADANIE 15-1780

Ocena aktywności bakteriobójczej, grzybobójczej, sporobójczej, prątkobójczych oraz wirusobójczej podczas procesów dezynfekcji powietrza oraz powierzchni

Zgodnie z metodą przedstawioną w normie NFT 72-281 (listopad 2014)

Obszar medyczny

Promotor

OXY'PHARM
917 rue Marcel Paul
94500 CHAMPIGNY SUR MARNE

Laboratorium testujące

FONDEREPHAR
Faculte des Sciences Pharmaceutiques
35 Chemin des Maraichers
31062 TOULOUSE cedex 9

Dr Christine ROQUES
Kierownik badań

Dr Jocelyne BACARIA
Kierownik Jakości

1. Laboratorium badawcze

Fondation pour le Developpement de la recherche en Pharmacie (FONDEREPHAR)

Faculte des Sciences Pharmaceutiques, 35 chemin des Maraichers 31062 Toulouse cedex 9, *Francja*

2. Ientyfikacja systemu dezynfekcji powietrza

Urządzenie : NOCOSPRAY

Numer seryjny: 37S347

Środek dezynfekcyjny: ONE SHOT

Partia: 231214N (Data ważności - 12/2016)

160315N+F (data ważności: 03/2017)

Stężenie produktu w pomieszczeniu: 3 mL/m³

Jeden lub dwa cykle w odstępie dwóch godzin (odzysk nośników po 2 godzinach)

Ilość środka dezynfekcyjnego ~ 155 mL/cykl przy 3 mL/m³

Promotor : OXY'PHARM

Warunki przechowywania: Temperatura otoczenia

Okres testowania: styczeń - kwiecień 2015

Aktywne substancje: Nadtlenek wodoru

3. Warunki badań

a. Testy mikroorganizmów

- Działanie bakteriobójcze:

- o *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467
- o *Staphylococcus aureus* CIP4.83
- o *Enterococcus hirae* CIP 58.55
- o *Escherichia coli* CIP 54.127

- Działanie grzybobójcze, drożdżobójcze:

- o *Candida albicans* DSM 1386
- o *Aspergillus brasiliensis* CBS 733.88

- Działanie sporobójcze :

- o *Bacillus subtilis* (spory) CIP 52.62

- Działanie prątkobójcze :

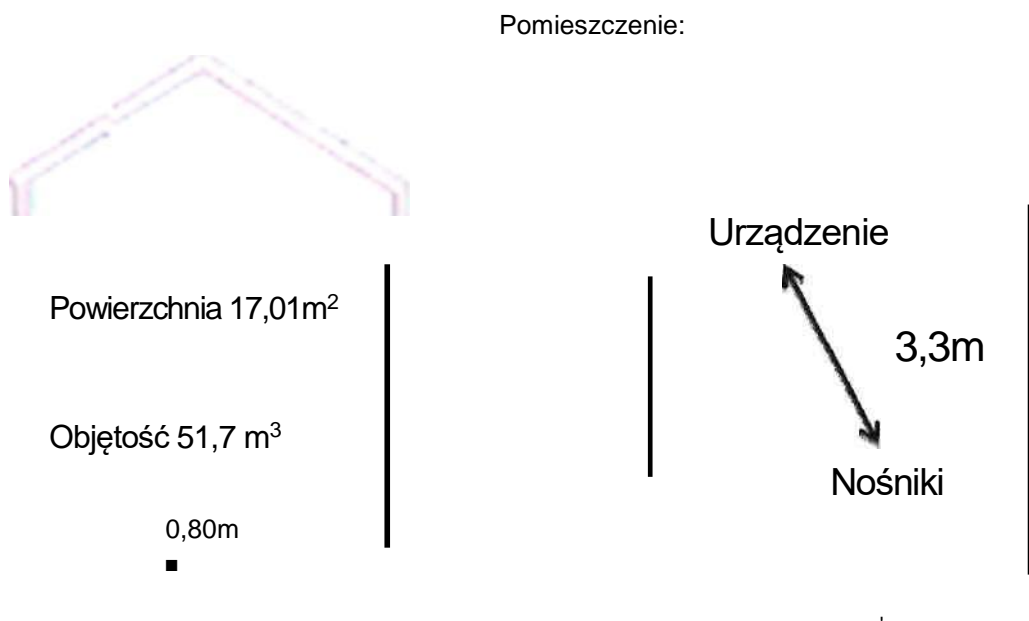
- o *Mycobacterium terrae* ATCC 15755

- Działanie wirusobójcze:

- *Adenovirus typ 5/HELA*
Pochodzenie : ATCC
Referencje dostawcy VR-5
Nr partii dostawcy: 58486654
Wewnętrzny nr partii: SS-1-240112 (przejście nr 1)
- Komórki
Pochodzenie : ATCC
Nazwa: HELA
Referencje ATCC CCL-2
Nr partii ATCC: 4440136
Wewnętrzny nr partii; WCB-080713 (przejście nr 52)
- *Murine Norovirus S99/RAW264.7:*
Pochodzenie : Friedrich Loeffler Institut Berlin
Referencje dostawcy: RVB-651
Nr partii dostawcy 4/200409/220409
Wewnętrzny nr partii: SS-1-240512 (przejście nr 1)
- Komórki
Pochodzenie : ATCC
Nazwa: RAW-264.7
Referencje ATCC CCL-71
Nr partii ATCC; 5822175
Wewnętrzny nr partii: WCB-031012 (przejście nr14)

Wybranymi powierzchniami testującymi są szalki petriego ze stali nierdzewnej, zgodnie z paragrafem 5.2.3.1 normy. Dostawcą jest firma CONTIGIANI (Tuluza).

b. Warunki pracy systemu dezynfekcji powietrza:



Wilgotność względna w zakresie od 40% do 50%.

Początkowa temperatura w zakresie od 19°C do 22°C.

Kubatura pomieszczenia do przeprowadzenia testów: 51,7m³.

Odległość między urządzeniem i nośnikami: 3,3m (tabela B.1).

Rozcieńczalniki i podłoża hodowlane

Substancje interferujące

1/20 przetworzonego mleka (partia 5763, ważność do 23/03/2015; partia 5811, ważność do 17/04/2015) BSA frakcja V przy 0,3g/l (partia Nr 126)

Rozcieńczalniki

Przygotowanie zawiesiny: EPPI (Cooper - partia 19GG17GC, ważność do 06/2016)

Rozcieńczalnik dla *A. brasiliensis* (partia 30, ważność do 05/04/2015)

Roztwór do odzysku (partie 5760, 5761, 5765, 5783, 5789, 5804)

Membrany filtracyjne

Membrany nitrocelulozowe 0,45/um (Millipore, partia F4NA10079, ważność do 10/2016; partia F4NA18553, ważność do 03/04/2015)

Podłoża hodowlane

Agar z ekstraktu słodowego (partia 5730, ważność 24/03/2015; partia 5782, ważność do 04/03/2015; partia 5773, ważność do 24/03/2015; partia 5782, ważność do 02/04/2015; partia 5787, ważność do 03/04/2015)

Agar sojowy Trypcase (Biomérieux - partia 1003531150, ważność do 01/06/2015; partia 1003701520, ważność do 20/07/2016)

Milieu GGL (partia 5902, ważność do 09/05/2015)

Agar Middlebrook + OAPC (partia 5797, Ważność do 10/04/2015)

EMEM 2% SVF partia nr1304 (Adenovirus) - DMEM 2% SVF partia nr 1341 (Murine Norovirus)

4. Testy

a. Działanie bakteriobójcze

- Cykl 3 mL / m³ – oczekiwanie 1 godz.

Testowane mikroorganizmy	N Badana zawiesina (CFU/mL)	Testy wstępne			T Kontrola (CFU/punkt - 50/uL)	n'1 + n'2 UFC/ punkt 50uL (rozcieńczanie/ filtracja – szalka w agarze)	Redukcja log Średnia
		n1/N1	n2/N2	n3/N1			
	5.10 ⁷ - 2.10 ⁹	N1 > 0.5 N1	n2 > 0.5 N2	n3 > 0.5 N1	≈ 10 ⁶		
<i>P. aeruginosa</i> Data 25/02/15 B: 19,9°C / RH 53% E: 20,5°C / RH 46%	0,97.10 ⁹	d1 : 75/97 d2 : 81/97	d1: 75/98 d2 : 79/98	d1: 74/97 d2 : 79/97	d1 : 0,51.10 ⁶ d2 : 0,68.10 ⁶ T = 0,60.10 ⁶	d1 : 6 + 0 d2 : 12 + 0 d3 : 3 + 0	R1 : 5,00 R2 : 4,70 R3 : 5,30 R = 5,00
<i>E. hirae</i> Data: 26/02/15 B: 20,3°C / RH 43% E: 20,3°C / RH 49%	1,7.10 ⁹	d1 : 170/170 d2 : 145/170	d1 : 123/150 d2 : 133/150	d1 187/170 d2 :149/170	d1 : 0,98.10 ⁸ d2 : 0,97.10 ⁸ T = 097.10 ⁸	d1 : 0 + 0 d2 : 0 + 0 d3 : 0 + 0	R1 : 7,99 R2 : 7,99 R3 : 7,99 R = 7,99
<i>E coli</i> Data: 19/03/15 B: 19.6°C / RH 45% E: 19,8°C / RH 53%	2,34.10 ⁸	d1 : 25/23 d2 : 22/23	d1 : 21/21 d2 : 32/21	d1 :27/23 d2 :26/23	d1 : 0,76.10 ⁶ d2 : 0,86.10 ⁶ T = 0,81.10 ⁶	d1 : 0 + 0 d2 : 0 + 0 d3 : 0 + 0	R1 : 5,91 R2 : 5,91 R3 : 5,91 R = 5,91

- Cykl 3 mL / m³ – oczekiwanie 2 godz. i cykl 3 mL / m³ - oczekiwanie 2 godz.

Testowane mikroorganizmy	N Badana zawiesina (CFU/mL)	Testy wstępne			T Kontrola (CFU/punkt - 50/uL)	n'1 + n'2 UFC/ punkt 50uL (rozcieńczanie/ filtracja – szalka w agarze)	Redukcja log Średnia
		n1/N1	n2/N2	n3/N1			
	5.10 ⁷ - 2.10 ⁹	n1 > 0.5 N1	n2 > 0.5 N2	n3 > 0.5 N1	≈ 10 ⁶		
S. aureus Data: 18/03/15 B: 19,0°C/RH 44% E: 19,6°C/RH 53%	3,2.10 ⁸	d1: 40/32 d2: 33/32	d1: 42/44 d2: 46/44	d1 : 41/32 d2 : 31/32	d1 : 1,63.10 ⁷ d2 : 1,47.10 ⁷ T = 1,55.10 ⁷	d1 : 0 + 1 d2 : 30 + 0 d3 : 300 + 1	R1 : 7,19 R2 : 5,71 R3 : 4,71 R = 5,87

CFU – Jednostki Tworzące Kolonie

T: ilość mikroorganizmów na szalkach petriego.

N₁ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą płytkową - N₂ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą filtracyjną

n₁ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora w agarze - n₂ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora na membranie filtracyjnej – n₃ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora po wprowadzeniu szalki petriego do agaru.

n'₁: ilość mikroorganizmów które przetrwały w 100mL soli tryptonu - n'₂: ilość mikroorganizmów po wprowadzeniu szalki petriego do agaru

n'₁ + n'₂ : całkowita liczba mikroorganizmów które przetrwały na powierzchni nośnika.

D1 : szalka nr 1 / d2 : szalka nr 2 / d3 : szalka nr 3

b. Działanie grzybobójcze

- Cykl 3 mL / m³ – oczekiwanie 1 godz.

Testowane mikroorganizmy	N Badana zawiesina (CFU/mL)	Testy wstępne			T Kontrola (CFU/punkt - 50/uL)	n'1 + n'2 UFC/ punkt 50uL (rozcieńczanie/ filtracja – szalka w agarze)	Redukcja log Średnia
		n1/N1	n2/N2	n3/N1			
	2.10 ⁷ - 1.10 ⁸	n1 > 0.5 N1	n2 > 0.5 N2	n3 > 0.5 N1	≈ 10 ⁵		
C. albicans Data: 25/02/15 B: 19,9°C/RH 41% E: 20,5°C/RH 46%	0,98.10 ⁸	d1:94/98 d2: 95/98	d1 : 86/97 d2 : 102/97	d1 : 130/98 d2 :87/98	d1 : 1,13.10 ⁶ d2 : 1,00.10 ⁶ T = 1,06.10 ⁶	d1 : 0 + 0 d2 : 0 + 0 d3 : 0 + 0	R1 : 6,03 R2 : 6,03 R3 : 6,03 R = 6,03
	5.10 ⁶ - 1.10 ⁷	n1 > 0.5 N1	n2 > 0.5 N2	n3 > 0.5 N1	~ 10 ⁵		
A. brasiliensis Data: 03/03/15 B: 19,1°C/HR 47% E: 19,7°C/HR 53%	0,93.10 ⁶	d1 : 245/93 d2 : 200/93	d1:240/80 d2 :330/80	d1 : 200/93 d2 : 260/93	d1 : 4,2.10 ⁵ d2 : 4,6.10 ⁵ T = 4,38.10 ⁵	d1 : 1 + 0 d2 : 2 + 0 d3 : 0 + 0	R1 : 5,64 R2 : 5,34 R3 : 5,65 R = 5,54

CFU – Jednostki Tworzące Kolonie

T: ilość mikroorganizmów na szalkach petriego.

N₁ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą płytkową - N₂ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą filtracyjnąn₁ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora w agarze - n₂ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora na membranie filtracyjnej – n₃ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora po wprowadzeniu szalki petriego do agaru.n'₁: ilość mikroorganizmów które przetrwały w 100 mL soli tryptonu - n'₂: ilość mikroorganizmów po wprowadzeniu szalki petriego do agarun'₁ + n'₂ : całkowita liczba mikroorganizmów które przetrwały na powierzchni nośnika.

D1 : szalka nr 1 / d2 : szalka nr 2 / d3 : szalka nr 3

c. Działanie sporobójcze

- Cykl 3 mL / m³ – oczekiwanie 1 godz. - Cykl 3 mL / m³ – oczekiwanie 1 godz.

Testowane mikroorganizmy	N Badana zawiesina (CFU/mL)	Testy wstępne			T Kontrola (CFU/punkt - 50/uL) ≈ 10 ⁴	n'1 + n'2 UFC/ punkt 50uL (rozcieńczanie/ filtracja – szalka w agarze)	Redukcja log Średnia
		n1/N1	n2/N2	n3/N1			
	2.10 ⁵ - 5.10 ⁵	n1 > 0.5 N1	n2 > 0.5 N2	n3 > 0.5 N1			
<i>B. subtilis</i> Data: 12/03/15 B: 19,6°C/RH 47% E: 20,4°C/RH 57%	2,24.10 ⁵	d1:27/20 d2 :27/20	d1 : 17/22 d2 : 22/22	d1 : 16/20 d2 : 26/20	d1 : 0,90.10 ⁴ d2 : 1,06.10 ⁴ T = 0,98.10 ⁴	d1 : 0 + 0 d2 : 0 + 0 d3 : 0 + 0	R1 : 3,99 R2 : 3,99 R3 : 3,99 R = 3,99

CFU – Jednostki Tworzące Kolonie

T: ilość mikroorganizmów na szalkach petriego.

N₁ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą płytkową - N₂ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą filtracyjną

n₁ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora w agarze - n₂ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora na membranę filtracyjnej – n₃ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora po wprowadzeniu szalki petriego do agaru.

n'₁: ilość mikroorganizmów które przetrwały w 100 mL soli tryptonu - n'₂: ilość mikroorganizmów po wprowadzeniu szalki petriego do agaru

n'₁ + n'₂ : całkowita liczba mikroorganizmów które przetrwały na powierzchni nośnika.

D1 : szalka nr 1 / d2 : szalka nr 2 / d3 : szalka nr 3

d. Działanie mikobakteriobójcze

- Cykl 5 mL / m³ – oczekiwanie 2 godz.

Testowane mikroorganizmy	N Badana zawiesina (CFU/mL)	Testy wstępne			T Kontrola (CFU/punkt - 50/uL) ≈ 10 ⁵	n'1 + n'2 UFC/ punkt 50uL (rozcieńczanie/ filtracja – szalka w agarze)	Redukcja log Średnia
		n1/N1		n1/N1			
	1.10 ⁷ - 1.10 ⁸	n1 > 0.5 N1	n2 > 0.5 N2	n3 > 0.5 N1			
<i>M. terrae</i> Data: 11/03/15 B: 19,5° C/44RH E: 20,1°C/51 RH	7,64.10 ⁸	d1 : 58/91 d2 : 56/91	d1 : 41/65 d2 : 43/65	d1:58/91 d2 :53/91	d1 : 3,22.10 ⁷ d2 : 2,78.10 ⁷ T = 3,15.10 ⁷	d1 : 0 + 0 d2 : 0 + 0 d3 : 0 + 0	R1 : 7,20 R2 : 7,50 R3 : 7,50 R = 7,40

CFU – Jednostki Tworzące Kolonie

T: ilość mikroorganizmów na szalkach petriego.

N₁ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą płytkową - N₂ : zliczanie mikroorganizmów w badanej zawieszynie metodą filtracyjną

n₁ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora w agarze - n₂ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora na membranie filtracyjnej – n₃ : zliczanie mikroorganizmów w celu określenia wpływu inhibitora po wprowadzeniu szalki petriego do agaru.

n'₁: ilość mikroorganizmów które przetrwały w 100 mL soli tryptonu - n'₂: ilość mikroorganizmów po wprowadzeniu szalki petriego do agaru

n'₁ + n'₂: całkowita liczba mikroorganizmów które przetrwały na powierzchni nośnika.

D1 : szalka nr 1 / d2 : szalka nr 2 / d3 : szalka nr 3

e. Działanie wirusobójcze

o Protokoły zatwierdzające

Kontrola podatności komórek na oddziaływanie wirusów

- Dodaj jedną porcję roztworu S lub PBS + jedną porcję zawiesiny komórkowej zawierającej $2 \cdot 10^5$ komórek/ml do pojemnika z wodą o temperaturze $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ na jedną godzinę.
- Komórki zostają odwirowane i sporządzana jest ponowna zawiesina w pożywce hodowlanej.
- Wirusy zostają rozcieńczone w proporcji 1/4 do 1/4 na 96-studzienkowej mikroplątce (15 rozcieńczeń).
- Dodaj 100 μl zawiesiny komórkowej poddanej procesowi (Roztwór S) lub nie poddanej procesowi (kontrola PBS) do każdej ze studzienek mikroplątki.
- Poddaj inkubacji przez 48 lub 72 godz.

Różnica pomiędzy redukcją miana komórek poddanych działaniu roztworu S i komórek poddanych działaniu PBS powinna wynosić $< 1\text{lg}$.

Kontrola skuteczności hamowania działania dezynfekcyjnego

- Dodaj 1 porcję BSA + 1 porcję zawiesiny wirusowej + 1 porcję roztworu S lub wody destylowanej.
- Umieść mieszaninę w kąpeli lodowej na 30 min. w temperaturze pokojowej.

Metoda miareczkowania

Poddaj wirusy miareczkowaniu (metoda miareczkowania komórek w zawiesinie) wykonując poniższe czynności:

- Wykonaj szereg rozcieńczeń (1/4) z wykorzystaniem podłoża hodowlanego w szklanej tubie.
- Umieść 0,1 ml każdego z roztworów w ośmiu studzienkach mikroplątki.
- W ostatnim rzędzie ośmiu studzienek umieść 0,1 ml podłoża hodowlanego (kontrola komórek nie poddanych procesowi).
- Dodaj 0,1 ml zawiesiny komórkowej przy ilości $2 \cdot 10^5$ komórek/ml.
- Poddaj inkubacji przez 48 lub 72 godziny w temperaturze $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ przy 5% $\text{CO}_2 \pm 2\%$.
- Odczytaj efekt cytopatyczny wykorzystując mikroskop odwrócony.

Jednostka zakaźna zostaje oszacowana przy wykorzystaniu metody KARBBER-SPAERMAN pozwalającej na obliczenie ujemnego logarytmu 50% punktu końcowego (lgDIC_{50}) w oparciu o poniższy wzór:

$\text{lgDIC}_{50} = \text{ujemny logarytm najwyższego stężenia wirusów} - [(\text{Suma \% wpływu na każde rozcieńczenie} / 100 - 0.5) \times (\text{lg rozcieńczenia})]$

o **Rezultaty****Adenowirus typu 5**

Miano zawiesiny wirusowej: IgDICT50 = 8,7

Nie zaobserwowano cytotoksyczności na nośniku nie poddanym procesowi, na który wcześniej oddziaływał system dezynfekcji powietrza podczas cyklu 1 i 2.

Cykl 3ml/m³ – oczekiwanie 1 godz.

	Stopień efektu cytopatogenego (log)	Redukcja log
Podatność komórek na wirusy - Z procesem (S1) Nośnik 1 Nośnik 2 Średnia - Bez procesu (S2) Nośnik 1	 8,1 8,0 8,1 8,0	 Różnica < 1 lg
Skuteczność hamowania działania dezynfekcyjnego - Z procesem (D1) Nośnik 1 Nośnik 2 Średnia - Bez procesu (D2) Nośnik 1	 7,7 7,1 7,4 7,1	 Różnica < 0,5 lg
Kontrola testu Nośnik 1 Nośnik 2 Średnia	 4,4 4,3 4,4	
Analiza Wsparcie 1 Wsparcie 2 Wsparcie 3 Średnia	 0,3 0,3 0,3 0,3	 4,1

Murine Norovirus

Miano zawiesiny wirusowej: IgDICT50 = 8,5

Nie zaobserwowano cytotoksyczności na nośniku nie poddanym procesowi, na który wcześniej oddziaływał system dezynfekcji powietrza podczas cyklu 1 i 2.

Cykl 3 ml/m³ – oczekiwanie 1 godz. - Cykl 3 ml/m³ – oczekiwanie 1 godz.

	Stopień efektu cytopatogenego (log)	Redukcja log
Podatność komórek na wirusy - Z procesem (S1) Nośnik 1 Nośnik 2 Średnia - Bez procesu (S2) Nośnik 1	7,0 7,1 7,1 6,9	Różnica < 1 lg
Skuteczność hamowania działania dezynfekcyjnego - Z procesem (D1) Nośnik 1 Nośnik 2 Średnia - Bez procesu (D2) Nośnik 1	7 7,1 7,1 7,3	Różnica < 0,5 lg
Kontrola testu Nośnik 1 Nośnik 2 Średnia	5,0 5,1 5,1	
Analiza Wsparcie 1 Wsparcie 2 Wsparcie 3 Średnia	0,5 0,5 0,5 0,5	4,6

5. Wnioski

Mając na uwadze warunki przeprowadzenia testu i pracujące urządzenie należy stwierdzić:

- Działanie bakteriobójcze (redukcja $\log \geq 5$)
 - o Następujących szczepów po cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu :
 - *P.aeruginosa* CIP 103467
 - *E. coli* CIP 54.127
 - *E.hirae* CIP 58.55
 - o Poniższego szczepu po cyklu 3 mL/m³ i 2 godz. oczekiwaniu oraz drugim cyklu 3 mL/m³ i 2 godz. oczekiwaniu:
 - *S. aureus* CPP 4.83
- Działanie grzybobójcze (redukcja $\log \geq 4$)
 - o Poniższego szczepu po cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu:
 - *C. albicans* DSM 1386
 - *A. brasiliensis* CBS 733.88
- Działanie sporobójcze (redukcja obciążenia ≥ 3)
 - o Poniższego szczepu po cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu oraz drugim cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu:
 - *B. subtilis* spores CIP 52.62
- Działanie prątkobójcze (redukcja $\log \geq 4$)
 - o Poniższego szczepu po cyklu 5 mL/m³ i 2 godz. oczekiwaniu:
 - *M. terrae* ATCC 15755
- Działanie wirusobójcze (redukcja $\log \geq 4$)
 - o Poniższego szczepu po cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu:
 - *Adenovirus* typu 5
 - o Poniższego szczepu po cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu oraz drugim cyklu 3 mL/m³ i 1 godz. oczekiwaniu:
 - *Murine Noro virus*