



**Rzeczywista zdolność produktu NOCOLYSE do
zwalczania aktywności wirusowej**

Zgodnie z normą NFT72 180

Numer raportu IPL: 161103

Niniejszy raport został przeprowadzony i dotyczy produktu będącego w fazie testowej.

1. Materiały i metody:

Identyfikacja próbek

Nazwa i opis produktu: NOCOLYSE .

Organ zlecający: Oxypharm -917,rue Marcel Paul- ZA des Grands Godets -
94508 CHAMPIGNY SUR MARNE Cedex .

Data przyjęcia do laboratorium: 04/08/2003

PH:5

Produkt: bezbarwny.

1) Materiał:

a) Zastosowany produkt:

Produkt Nocolyse zastosowany w 1/10^e

b) Zastosowane medium do hodowli komórek:

Środki zastosowane do hodowli kultur komórkowych

-Komórki VERO ATCC 81 CCL: medium EAGLE MEM + aminokwasy + surowica z płodu
cielęcia + glutamina+ gentamycyna 8 ug/ml.

-Komórki KB : medium EAGLE MEME + surowica z płodu cielęcia+ glutamina + gentamycyna
8ug/ml.

Niniejszy dokument zawiera 6 stron

Zabrania się kopiowanie niniejszego raportu w formie całkowitej.

Fundacja użyteczności publicznej 1,rue du Professeur Calmette
BP 245 - 59019 Lille cedex
France
Tel. 03 20 37 78 00
Fax. 03 20 37 79 06.

Internet
<http://www.pasteur-lille.fr>
SIRET 783 696 834 00010
APE 7312



c) Komórki :

Trzy rodzaje komórek zastosowanych podczas testu pochodzą z narodowych zbiorów komórek [CNCM Institut Pasteur de Lille].

1. Enterowirus Polio I , szczepu Sabina, wyhodowany na komórkach VERO.
2. Ludzki adenowirus typu 5, wyhodowany na komórkach KB.
3. Wirus z grupy Orthopox szczepionka wyhodowana na komórkach VERO

Komórki zostały zamrożone do -80°C przy zastosowaniu jednorazowych dawek.

Określenie efektu cytopatycznego (CPE) w następujących warunkach: po 5 dniach w temp. 37°C .

Techniki miareczkowania komórek w zawiesinie

We wszystkich wysokich zbiornikach (300ul) zawierających mikropłytki należy umieścić 150 pi wszystkich mediów do hodowli komórkowych w pierwszym rzędzie ośmiu zbiorników a następnie dodać 50pi mianowanej zawiesiny wirusowej. Do osiągnięcia homogeniczności, należy przełożyć 50pi z jednego zbiornika do drugiego (poza ostatnim rzędem, który umożliwi nam obserwację komórek) doprowadzi to do czterokrotnego rozcieńczenia po ośmiokrotnym wykonaniu procesu rozcieńczania.

Na koniec należy podać do wszystkich zbiorników 100pi zawiesiny komórkowej na mediach do hodowli, zawierającą 10^5 komórek na milimetr.

Obserwacje komórek należy przeprowadzić pod mikroskopem (w przeciągu 5 dni) po inkubacji w temp. 37°C w warunkach atmosferycznych o 5% stężeniu CO_2 .

Zastosowane miareczkowanie jest podobne do tego zastosowanego w eksperymentach laboratoryjnych prowadzonych przez FISHERa i YATESa stosujących tabele WYSHAKa i DETREa.

Przy zastosowaniu w/w metod uzyskaliśmy oczekiwaną liczbę skażonych jednostek na milimetr.

2) Metody

Technika zastosowana w pierwszej próbie:

Technika separacji produktu i wirusa, filtracja na żelu LH_2O

Procedury wstępne:

a) Przygotowanie zawiesiny wirusowej

Należy zastosować 10^7 jednostek zawiesiny wirusowej na milimetr, która zawiera 2% surowicę z embrionu cielęcia na enterowirus Polio I i szczepionkę przeciw wirusowi z grupy Orthopox. 10^7 UI/ml na ludzki adenowirus typu V.



Stężenie zawiesiny wirusowej:

- enterowirus Polio I = 1,25mg/ml
- wirus z grupy Orthopox (szczepionka)= 1,14mg/ml
- ludzki adenowirus typu V= 0,9mg/ml

Miareczkowanie wirusa:

- enterowirus Polio I = log 7,34
- wirus z grupy Orthopox (szczepionka)= log 7,32
- ludzki adenowirus typu V= log 6,98

b) Oznaczanie stężenia subcytotoksycznego:

Produkt NOCOLYSE i molekularny filtrat zostały rozcieńczone z 1 do 10^{-6} buforowany PBS Dulbecco.

Hodowla komórkowa w zawiesinie podczas eksperymentu:

- ♦ Podaj 0,1ml medium do hodowli komórkowych (2% surowica z płodu cielęcia) na wszystkie płytki laboratoryjne
- ♦ Dodaj 0,05 ml do każdego roztworu środka dezynfekującego – rzędy obok pierwszych czterech płytek.
- ♦ Na płytki (4) ostatniego rzędu należy podać 0,05 ml wodnego roztworu chlorku sodu, sterylnego bez dezynfekcji.
- ♦ Dodaj 0,1ml zawiesiny do medium do hodowli komórkowych zawierającej 10^3 komórek/ml
- ♦ Płyta powinna być osłonięta i inkubowana 37°C w środowisku o 5% stężeniu CO_2 .

Efekt cytopatyczny zaobserwowano po okresie inkubacji równym najdłuższemu okresowi hodowli zawiesiny, który wynosi 5 dni.

b) Obserwacja eliminacji efektu wirusowego przy zastosowaniu filtracji żelowej

Celem obserwacji jest upewnienie się, że filtracja produktu wyeliminowała aktywność wirusową. Należy dodać filtrat, uzyskany z filtracji molekularnej, do zawiesiny wirusowej (na godzinę, w temp. 4°C). Następnie należy przeprowadzić miareczkowanie zawiesiny wirusowej w takich samych warunkach z buforowaniem PBS.



Wyniki uzyskane podczas przeprowadzania procedur wstępnych:a) Rozcieńczenie cytopatyczne produktu NOCOLYSE i filtratu żelu LH₂O

na VERO	Czyste	$d=10^6$	1/5	$d=10^4$	1/10	$d=10^4$
na KB		$d=10^6$		$d=10^4$		$d=10^4$
na VERO	Filtrat (czysty)	$d=10^3$	Filtrat (1/5)	$d=10^3$	Filtrat (1/10)	$d=10^2$
na KB		$d=10^3$		$d=10^3$		$d=10^2$

b) Obserwacja eliminacji aktywności wirusowej po filtracji

Stężenie filtrowanego produktu (%) 1/10

WIRUS	MIARKOWANIE WIRUSOWE (logarytm) (UI/ML)		
	Wirus + filtrat	Wirus kontrolny + PBS	Miareczkowa ny wirus
Wirus polio	log 7,34	log 7,23	log 7,33
Szczepionka	log 7,71	log 7,33	log 7,32
Adenowirus	log 7,32	log 7,32	log 6,98

Wiarygodność badań: potwierdzona

Szczegóły badania:

Dla każdego wirusa należy przygotować po dwie próbówki.

Jedna do testu (R) zawiera 100ul zawiesiny wirusowej i 900ul produktu.Jedna do kontroli (T) zawiera 100 ul zawiesiny wirusowej i 900pi roztworu wodnego chlorku sodu.

Po procesie homogeniczności (Vortex) włóż próbówki do wanny laboratoryjnej i ustaw odpowiednią temperaturę (20°C dla środków dezynfekujących).

Po inkubacji trwającej dokładnie 15, 30 i 60 minut, efekt wirusowy jest obliczony poprzez filtrację żelową.



Podejście

Próbki R15, R30, R60 i T60 zostały przefiltrowane przez żel Sephadex LH₂0, który zatrzymuje dezynfektant a przepuszcza wirusy. Titrant filtratu wirusa został porównany z titrantem zawiesiny wirusowej, które zostały poddane obróbce w takich samych warunkach. Nieutleniające się płytki zostały szczelnie przykryte. Płytki te zawierają ruchomą rurkę na końcu której znajduje się filtr wykonany z poliestru.

Zawiesina Sephadex suspension

Należy przygotować zawiesinę Sephadex LH₂0 (Pharmacia France) przez połączenie 22g ze 100ml PBS. Następnie należy sterylizować roztwór w temp. 120°C przez 30 minut. Po sterylizacji w autoklawie pozostaw go w temperaturze elementu przed podaniem: 25ml na każdą płytkę nieutleniającą się, wysterylizowaną płytkę. Włączyć wirowanie na poziomie 1000g przez 10 minut.

Protokół podjętych działań

Próbki R15, 30, 60 i T60 zostały umieszczone w górnej części kolumny Sephadex. Wszystkie były wywirowane z prędkością 1000g w wirówce w temperaturze +4°C. W rezultacie został uzyskany sterylny filtrat o objętości 1 ml.

Opis uzyskanych wyników:

Aktywność wirusowa środka dezynfekującego zależy od stężenia i minimalnego czasu kontaktu, który prowadzi do redukcji titrantu 3 wirusów przez 4 logarytmy dziesiętne.



Warunki badania

NOCOLYSE
Stężenie : 1/10^e

Czas kontaktu	Enterowirus Polio I w log (UI/ML)	Adenowirus V	Szczepionka
15 minut	log 3,48	log 5,01	log 4,57
30 minut	log 3,09	log 3,75	log 3,1
60 minut	log 3,05	log 3,06	log 2,95
Kontrola - 60 minut	log 7,06	log 7,06	log 7,06

PODSUMOWANIE

Produkt NOCOLYSE jest aktywny w stężeniu 1/10 po 60 minutach kontaktu z enterowirusem Polio I, wirusem z grupy Orthopox (szczepionka) i ludzkim adenowirusem typu V z zachowaniem normy AFNORNFT72 180.

Lille, 19 listopad 2003

Technik
odpowiedzialny



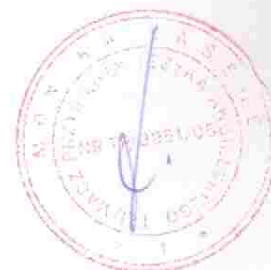
Andree TORPIER

Kierownik serwisu



Franck PQLYN

Service d'Expertises en Hygiene Hospitaliere - INSTITUT PASTEUR DE LILLE



Koniec dokumentu-/-

Repertorium Nr 65/2016

Ja, Monika Lasege, tłumacz przysięgły języka angielskiego w Zielonej Górze, poświadczam zgodność powyższego tłumaczenia z przedłożonym mi oryginałem w języku angielskim. Pobrano opłatę zgodnie z taryfą (Dz. U. Nr 38 poz. 164 z 1992r. ze zmianami)

Zielona Góra, dnia 4.kwietnia 2016r.



**TŁUMACZ PRZYSIĘGŁY
JĘZYKA ANGIELSKIEGO**

Lasege
mgr Monika Lasege