

STUDIERAPPORT
2020 – 4150 / 20 23 00204

RAPPORT FRA ANTIVIRAL AKTIVITETSTEST
AV TESTET PRODUKT: "ANOLYTE"
MOT POLIOVIRUS, ADENOVIRUS OG MURINT NOROVIRUS
I HENHOLD TIL EN 14476:2013+A2:2019

HL.Skjong AS

ANOLYTE

PRODUKTIDENTIFIKATOR

Produktbeskrivelse	"ANOLYTE"
Studiesponsor	HL.Skjong AS
Produktkode/-navn	2020-4150/20 23 00204
Mottaksdato	8. mai 2020
Produktets form	Klar, fargeløs væske
Oppbevaring	I romtemperatur (20 °C)
Konsentrasjon brukt i testen	1:1-fortynning av produktet

EKSPERIMENTELLE FORHOLD

Prøvmingsmetode	14476:2013+A2:2019: "Kjemiske desinfeksjonsmidler og antiseptika – Kvantitativ suspensjonsprøving for evaluering av virusaktivitet på det medisinske området – Prøvmingsmetode og krav (fase 2, trinn 1)"
Prøvmingsperiode	Mai–juni 2020
Virusstammer	Adenovirus type 5 (ATCC VR-5) Poliovirus 1 Sabin-stamme LSc-2ab (WHO) Murint norovirus (virusstamme S99 Berlin)
Cellelinjer	Humane epitelceller type 2 (Hep-2) Humane rhabdomyosarkom-celler (RD) RAW 264.7, makrofag (ATCC)
Kulturmedium	DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium)
Kontaktetid	1 min
Testtemperatur	Vannbad, 20±1 °C
Interfererende stoff	BSA 0,3 g/L (rene forhold)
Inaktiveringsprosess	Fortynning 1/10 i iskaldt vedlikeholdsmedium
Teknisk leder	Pogka Vasiliki, Ph.d.
Fasiliteter	BSL-2-senter, Public Health Laboratories, Hellenic Pasteur Institute.

1. Testprinsipp

1:1-fortynning av "Anolyte" ble tilsatt i en testsuspensjon av titrerte virus i bovine serumalbumin-løsninger på 0,3 g/L (rene forhold). Blandingene ble holdt ved 20 °C i 1 minutt. Mot slutten av kontakttiden ble det tatt en alikvot, og virusaktiviteten ble undertrykt ved fortynninger i iskaldt vedlikeholdsmedium. Fortynningene ble deretter inokulert på cellemonolag i 96-brønners kulturplater for titrering av gjenværende virus. Virustiter uttrykt i TCID₅₀-verdier, etter 5 dagers inkubasjon, ble bestemt og uttrykt i logaritmisk skala. Reduksjon av virusenes smittsomhet ble beregnet ut fra log-virustiternes differanse før (kontroll) og etter behandling med produktet. I henhold til EN 14476-standardens har et produkt antiviral aktivitet når reduksjonen av viruset er minst 4 log.

2. Titrering av testvirus

Produktets antivirale aktivitet ble testet mot de tre virusstammene foreslått i standarden EN 14476, adenovirus type 5, poliovirus type 1 og murint norovirus. Virusene ble utsådd i egnede cellekultursystemer for å produsere høy titer: Hep-2-monolag for titrering av adenovirus, RD for titrering av poliovirus og RAW cellemonolag for titrering av m. norovirus. Hvert virus ble testet i fortynningsrekker fra 10⁻³ opp til 10⁻¹⁰. Hver fortynning ble inokulert 10 ganger i brønner av 96-brønners kulturplater med egnet cellemonolag. De infiserte cellene ble inkubert ved 37 °C i en 5 % CO₂-atmosfære i 5 dager. Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀), dvs. den infeksjonsdosen til en virussuspensjon som kreves for å indusere cytopatisk effekt (CPE) i 50 % av cellekulturenhetene, ble estimert ved hjelp av endepunktsmetoden Spearman-Kraber:

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

der L er høyeste brukte viruskonsentrasjon, d er fortynningenes log-differanse, S er summen av % påvirkede (CPE) ved hver fortynning.

Standardfeil ble beregnet som følger:

$$\sigma_m^2 = d^2 \sum p(1-p)/(n-1)$$

der d er fortynningsfaktorens logaritme, p_i er observert reaksjonsrate, n er antall testobjekter per fortynning og σ_m den logaritmiske titerens standardfeil.

CPE-resultatene til hvert virus på den egnede cellelinjen presenteres henholdsvis i tabellene 1a, 1b og 1c.

Tabell 1a. Titrering av adenovirus på Hep-2-celler

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE

Tabell 1b. Titrering av poliovirus på RD-celler

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁹	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE

Tabell 1c. Titrering av murint norovirus på RAW-celler

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE

Ved å bruke Spearman-Kaber-formelen på de nevnte CPE-resultatene, ble beregnet TCID₅₀ for adenovirus-, poliovirus- og norovirus-stammene henholdsvis 10^{-6.5}, 10^{-7.9} og 10^{-6.7}.

Tar man hensyn til standardfeil i beregningen ovenfor, er titerne til de tre stammene som ble brukt i testene:

Innledende titer til adenovirus, type 5	Log TCID₅₀/0,1mL = 6,5±0,141
Innledende titer til poliovirus, type 1	Log TCID₅₀/0,1mL = 7,9±0,163
Innledende titer murint norovirus	Log TCID₅₀/0,1mL = 6,7±0,133

3. Produktets cytotoksiske effekt

Bestemmelse av den høyeste konsentrasjonen av produktet (1:1-fortynning) ga ingen toksisk effekt på cellene som ble brukt til viruskulturen. Fortynninger fra 10^{-1} til 10^{-8} av produktet i kulturmedium med 0,3 g/L BSA ble inkubert i iskaldt vann i 30 min. Deretter ble 100 µL av hver fortynning inokulert på monolagene til Hep-2, RD og RAW-cellene i kulturplatenes brønner. Eventuelle mikroskopiske endringer i cellene etter 5 dagers inkubasjon ble registrert.

Det ble ikke observert noen cytotoksisk effekt på Hep-2, RD og RAW-cellene i noen av fortynningene ved en endelig konsentrasjon på 97,0 % av produktet.

4. Referanseprøving for virusinaktivering

Formaldehyd 0,7 % (w/v) ble inkludert som referanse for prøvingsvalidering i henhold til EN 14476-standard. Både cytotoksisk test og bestemmelse av antiviral aktivitet ble utført på RD-celler ved å bruke seriefortynninger på opptil 10^{-8} av nevnte formaldehydtestløsning. Kontakttid var 30 min og 60 min. Resultatene fra den cytotoksiske testen og virusinaktiveringstesten presenteres i henholdsvis tabell 2 og 3 (kun resultatene for 30 min kontakttid er oppgitt).

Tabell 2: Cytotoksisk test av formaldehydløsning testet på RD-celler

Produkt-fortynning	Forekomst eller fravær av celletotoksisitet i produktet (*)										Cellekontroll	
10⁻¹	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10⁻²	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10⁻³	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10⁻⁴	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) toks. = cytotoksisitet, 0 = fravær av toksisitet

Tabell 3: Data for inaktivering av formaldehydløsning testet mot poliovirus

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10 ⁻³	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10 ⁻⁴	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10 ⁻⁵	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10 ⁻⁶	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	toks.	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE. Toks. = cytotoksitet

En reduksjon på minst 2,4 log av poliovirus-titeren ble registrert ved 0,7 % (w/v) forekomst av formaldehyd. En høyere log-reduksjon kunne ikke observeres på grunn av formaldehyds toksisitet for RD-celler. Ifølge EN 14476-standardens bør differansen mellom viruskontrollens logaritmiske titer og testorganismens logaritmiske titer i referanseinaktiveringstesten være mellom 2 og 4,5 etter 30 min for poliovirus, for å verifisere metoden.

5. Produktets antivirale aktivitet

Produktets antivirale aktivitet mot adenovirus-, poliovirus- og murine norovirus-stammer ble bestemt etter 1 min ved 20±1 °C i 0,3 g/L (rene forhold). Umiddelbart ved kontakttidens slutt ble det laget en 1/10 fortynning i iskaldt cellevedlikeholdsmedium. 30 min senere ble påfølgende seriefortynninger (trinn 1:10) inokulert på cellekulturmonolagene. Etter inkubasjon ble titeren for hvert virus beregnet, og reduksjonen av virusets smittsomhet ble vurdert fra log-differansen til virustiterne før og etter behandling med produktet. Resultatene presenteres i tabell 4, 5 og 6 for henholdsvis adenovirus, poliovirus og murint norovirus.

Tabell 4: Titrering av adenovirus etter 1 min kontakt til en endelig konsentrasjon på 97,0 % av produktet i 0,3 % BSA.

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE. Toks. = cytotoksitet

Gjenværende adenovirus-titer etter behandling med produktet er:

Log TCID₅₀ etter behandling: ≤2,5

Log-differanse = innledende virustiter – virustiter etter behandling = 6,5-(≤2,5) = ≥4

Tabell 5: Titrering av poliovirus etter 1 min kontakt med en endelig konsentrasjon på 97,0 % av produktet i 0,3 % BSA.

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE. Toks. = cytotoksitet

Gjenværende poliovirus-titer etter behandling med produktet er:

Log TCID₅₀ etter behandling: ≤2,5

Log-differanse = innledende virustiter – virustiter etter behandling = 7,9-(≤2,5) = ≥5,4

Tabell 6: Titrering av m. norovirus etter 1 min kontakt med en endelig konsentrasjon på 97% av produktet i 0,3 % BSA.

Virus- fortynning	CPE i kulturplatens cellekulturbrønner (*)										Cellekontroll	
10⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) CPE-gradering i hver brønn: 0 = ingen CPE, 1 = 25 % CPE, 2 = 50 % CPE, 3 = 75 % CPE 4 = 100 % CPE. Toks. = cytotoksitet

Gjenværende murint norovirus-titer etter behandling med produktet er:

Log TCID₅₀ etter behandling: ≤2,5

Log-differanse = innledende virustiter – virustiter etter behandling = 6,7-(≤2,5) = ≥4,2

6. Metodekrav

Produktet som testes, skal vise minst én desimal log (lg) reduksjon på 4 i virustiter når testet i henhold til EN 14476.

7. Konklusjon

Produktet ANOLYTEs antivirale aktivitet mot adenovirus type 5, poliovirus type 1 og murint norovirus ble testet i henhold til EN 14476-standarden: "Kjemiske desinfeksjonsmidler og antiseptika – Kvantitativ suspensjonsprøving for evaluering av virusaktivitet på det medisinske området – Prøvingsmetode og krav (fase 2, trinn 1)." I henhold til EN 14476-standarden har et produkt antiviral aktivitet når det observeres en reduksjon av viruset på minst 4 log.

Produktet ANOLYTE viste, ved 1:1-fortynning, følgende:

- en ≥ 4 log-reduksjon av adenovirus type 5 (ATCC VR-5) etter 1 min kontakttid ved forekomst av 0,3 g/L BSA, ved 20 °C
- en $\geq 5,4$ log-reduksjon av poliovirus 1, Sabin-stamme LSc-2ab (WHO) etter 1 min kontakttid ved forekomst av 0,3 g/L BSA, ved 20 °C
- en $\geq 4,2$ log-reduksjon av murint norovirus (stamme S99 Berlin) etter 1 min kontakttid ved forekomst av 0,3 g/L BSA, ved 20 °C

Produktet viste antiviral aktivitet mot det ikke-kappekledde DNA-adenoviruset, det ikke-kappekledde RNA-polioviruset og det ikke-kappekledde RNA murine noroviruset. I henhold til EN 14476-standarden, anses produkter som har antiviral aktivitet mot adenoviruset, polioviruset og det murine noroviruset for å ha antiviral aktivitet mot alle virus.

Studieleder:

QACS Laboratories
1 Antigonis str, 144 51 Melamari, Greece
VAT no EL 998709411, email: info@qacs.gr
Tel +30-2102934745 Fax +30-210 2934606
www.qacs.gr

Lagiopoulos Giorgos
Agronom – matteknolog, M.Sc.
farmasøytisk mikrobiolog PgCert
Dato: 01.07.2020

Studierapportens slutt