



Virusidal

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

NANOBIOTECH ARGE

İNOVASYON SAĐLIK ÜRÜNLERİ

SANAYİ VE TİCARET LTD.ŞTİ

Erciyes Teknopark Tekno-2 Binası 1.Kat No:5 38039 Melikgazi Kayseri

için hazırlanmıştır.

HAZİRAN 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. Sitotoksosite 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: Nanoxa'nın 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. Nanoxa:

1 adet ışık geçirmeyecek şekilde
folye ile sarılı
50 ml tüp.

1.3. ÇALIŞMA TARİHLERİ

Numunenin Alındığı Tarih: 26 Şubat 2019

Deney Başlangıç Tarihi: 01 Mart 2019

Çalışma Tamamlanma Tarihi: 08 Mart 2019

1.4. SONUÇLARIN ÖZETİ

Test Maddesi: Nanoxa-#2

Kullanılan yoğunluk: Üretici tarifine göre sulandırmadan kullanıldı

Virüsler: Poliovirus Tip 1

Maruz Kalma Süresi: 1, 5 ve 15 dakika

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

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

Etkinlik Sonucu:

Nanoxa-2: 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 15 dakikada

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 Serumu (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:

2.3.1. Nanoxa-2: Üretici tarifine göre kullanmadan önce 5 dakika süre ile çalkalanarak kullanıma hazırlandı.

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.

Nanoxa-2'nin 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. Sitotoksite Testi (ST): 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): Sitotoksosite 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 Nanoxa yerine PAA (Perasetik Asit) kullanılarak yapılan testtir. Test sonucunda virus titresinde ≥ 4 Log azalma sağlanması beklenir.

2.5. VERİ ANALİZİ

2.5.1. Titre Hesaplanması: Virus ve sitotoksosite titreleri, Spearman-Kärber yöntemiyle hesaplandı. Hücre kültürünün % 50 sini enfekte eden doz (TCID₅₀) ve Hücre kültürünün % 50 'sine toksik olan doz (CC₅₀) $-\log_{10}$ olarak ifade edilmiştir.

2.5.2. Log Azalmasının Hesaplanması: Test maddesi içermeyen virus geri kazanım kontrol (VGKK) titresini ile test (VT) sonucu arasındaki fark olarak alınmıştır.

2.6. ÇALIŞMA KABUL KRİTERLERİ

2.6.1. Virus Geri Kazanım Kontrol (VGKK) testinde en az 4 \log_{10} enfektivitenin geri kazanılması,

2.6.2. Sitotoksosite (ST) test çalışmasında, sitotoksik düzeyin 3-log üzerinde olmaması,

2.6.3. Nötralizasyon Etkinlik (NET) testinde düşük titre virus üremesinin pozitif olması,

2.6.4. Pozitif (etkin) Kontrol Testi: PAA'nın virus titresinde ≥ 4 Log azalma sağlanması,

2.6.5. Virusidal etkinlik için VT TCID₅₀ ile VGKK TCID₅₀ arasında en az 4 \log_{10} fark olması,

3. SONUÇLAR

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

Tablo 1. Nanoxa-2'nin temiz şartlarda virusidal süspansiyon testinde 1, 5 ve 15 dakikada Poliovirus'a karşı virusidal etkisi

Seyreltme (Log ₁₀)	Virusidal Test (VT) 1 d.	Virusidal Test (VT) 5 d.	Virusidal Test (VT) 15 d.	Virusidal Pozitif (VT+) 1 d.	Virus Geri Kazanım Kontrol (VGKK) 15 d.	Nötralizan Etkinlik (NET)	Sito-toksisite (ST)	Hücre Kontrol
-1	++++++	++++++	000000	000000	++++++	+++	000	000
-2	++++++	+++000	000000	000000	++++++	+++	000	000
-3	++++++	000000	000000	000000	++++++	+++	000	000
-4	+++000	000000	000000	000000	++++++	+++	000	000
-5	000000	000000	000000	000000	+++++0	+++	000	000
-6	000000	000000	000000	000000	000000	+++	000	000
-7	000000	000000	000000	000000	000000	+++	000	000
-8	000000	000000	000000	000000	000000	+++	000	000
TCID ₅₀ /ml	1e+05	1e+03	3.16e+00	3.16e+00	1.47e+06			
TCID ₅₀ Log ₁₀	5.00	3.00	0.5	0.5	6.17			
Log ₁₀ azalma	1.17	3.17	5.67	5.67	ETKİLİ (>4 log)			
% Etkinlik	93,2	99,9	99,999	99,999				

(+) = 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 (varsa) arta kalan kısmı 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)*