

**Określenie wirusobójczego działania preparatu
dezynfekcyjnego Eco-pH wobec ludzkiego
adenowirusa typu 5 (Ad 5)**

Metoda oparta o normę PN- EN 14476

Dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni

Zakład Mikrobiologii, Katedra Patologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

1. Wstęp

Celem podjętych badań była ocena właściwości inaktywujących wirusa płynu do dezynfekcji Eco-pH wobec ludzkiego adenowirusa typu 5 przy użyciu ilościowej zawiesinowej metody według normy PN- EN 14476.

2. Laboratorium testowe

Pracownia Wirusologiczna, Zakład Mikrobiologii, Katedra Patologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

3. Charakterystyka produktu

Nazwa produktu	Eco-pH
Producent	Cleanergy sp. z o.o. ul. Długa 9, 20-346 Lublin
Data ważności	-
Wygląd i zapach	Produkt płynny; zapach swoisty
Wartość pH	-
Data dostarczenia	2025-05-23
Warunki Przechowywania	4°C, w ciemności (pomieszczenie z ograniczonym dostępem)
Składniki aktywne	biopreparat

3. Warunki doświadczenia

Data analizy	27.05-03.07.2025
Temperatura testu	20°C ± 1°C
Stężenie produktu	0.1 %; 0.04%; 0.02% (rozcieńczenia - odpowiednio 1:10, 1:25, and 1:50)
Czas kontaktu	60 min, 5 min, 2 min
Substancja interferująca	warunki czyste
Rozcieńczalnik	woda o standaryzowanej twardości
Procedura hamująca działanie produktu	bezpośrednie rozcieńczanie
Wirus testowy	Adenowirus typu 5, szczep Adenoid 75, (ATCC® VR-5™)

4. Materiał i metody

5.1 Przygotowanie zawiesiny wirusa testowego

Do przygotowania zawiesiny wirusa wg normy PN- EN 14476 (EN 5.4) linię komórkową A549 namnażano w 175 cm³ naczyniach hodowlanych (NEST SCIENTIFIC Biotechnology, New Jersey, USA) w obecności Eagle's Minimum Essential Medium z solami Earle'a i 10% surowicą płodu bydlęcego (FBS). Do monolayeru dodawano adenowirus typu 5 (zawiesina w stężeniu wyjściowym) na 1h w 37°C i delikatnie wstrząsano co 15 min. Hodowlę obserwowano codziennie do momentu pojawienia się efektu cytopatycznego, po czym 3-krotnie zamrażano ją na -80°C i rozmrażano. Zawiesinę odwirowywano (10 min., 1500 x g), a supernatant zawierający wirusa używano do testu lub przechowywano w -80°C.

5.2. Badanie zakaźności

Zakaźność określano za pomocą mianowania wirusa wg normy (EN 5.5.7). W badaniu tym, każde z testowanych logarytmicznych rozcieńczeń nanoszone było w objętości 0,1 ml do 8 dołeków na mikropłytkę, zawierających 0,1 ml świeżo strypsynizowanych komórek A549 (10-15 x 10³ komórek na dołek). Mikropłytki inkubowano w 37°C z 5% dostępem CO₂. Płytkę obserwowano codziennie do momentu pojawienia się efektu cytopatycznego w najwyższym rozcieńczeniu (7 dni) pod mikroskopem odwróconym (Axio Observer, Carl Zeiss

MicroImaging GmbH). Dawkę infekcyjną TCID₅₀/ml obliczano za pomocą metody Spearman i Karber wg następującego wzoru:

$$-\log_{10}TCID_{50} = x_0 - 0.5 + \sum r/n$$

gdzie:

x_0 = log₁₀ najwyższego rozcieńczenia wykazującego 100% reakcji pozytywnych

r = ilość pozytywnych oznaczeń w najwyższym rozcieńczeniu wykazującym 100% reakcji pozytywnych i wszystkie wyniki pozytywne w kolejnych rozcieńczeniach

n = ilość oznaczeń dla każdego rozcieńczenia

5.3 Badanie inaktywacji

Skuteczność wirusobójczą płynu do dezynfekcji Eco-pH w stężeniu 0.1%, 0.02% i 0.04% (wcześniej filtrowanego przy użyciu filtra 0.22 µm w celu usunięcia bakterii) badano według normy PN- EN 14476 (EN 5.5.2). Czas kontaktu wynosił 60 i 2 minuty. Dla większej wygody przeprowadzenia testu sporządzano zawiesinę równych objętości (0.1 ml) wirusa i czynnika interferującego (PBS) oraz 0,8 ml badanego środka. Bezpośrednio, po określonym czasie kontaktu, hamowano aktywność dezynfektantu przez sporządzenie szeregu rozcieńczeń do 10⁻¹².

Mianowanie wirusa przeprowadzono po czasie kontaktu 0 min. i 60 lub 2 min.

5.4. Określenie cytotoksyczności

Cytotoksyczność preparatu określano wg EN (5.5.4.1) przy użyciu 0,2 ml twardej wody i 0,8 ml badanego środka

5.5 Wrażliwość komórek

W celu kontroli wrażliwości komórek (EN 5.5.4.2) dwie objętości podwójnie destylowanej wody mieszano z ośmioma objętościami najniższego, widocznie nietoksycznego rozcieńczenia produktu w PBS. Mieszaninę dodano do objętości podwójnie stężonej zawiesiny komórek. Po godzinie inkubacji w 37°C komórki odwirowywano i ponownie

zawieszano w płynie hodowlanym. Ostatni etap obejmował porównanie mianowania zawiesiny wirusa w komórkach traktowanych preparatem i nietraktowanych (PBS) preparatem.

5.6. Kontrola skuteczności hamowania aktywności produktu

Mieszaninę preparatu (5.5.2) ze schłodzonym DMEM + 2%FCS inkubowano w łaźni z lodem przez 30 minut, wykonywano szereg rozcieńczeń do 10^{-12} . Mianowano wirusa i porównywano z mianowaniem testowym.

5.7. Test inaktywacji wirusa referencyjnego.

Jako punkt odniesienia dla określenia aktywności wirusobójczej włączono, zgodnie z normą (EN 5.5.6.2), 1.4% roztwór formaldehydu. Cytotoksyczność zawiesiny formaldehydu określano w szeregu rozcieńczeń do 10^{-5} .

6. Weryfikacja metody

Następujące kryteria wymienione w pkt. EN 5.7 zostały spełnione:

- a. Miano zawiesiny wirusa pozwoliło na określenie redukcji wirusa o $\geq 4 \log_{10}$
- b. Cytotoksyczność produktu w stężeniu 0.1%, 0.04% and 0.02% pozwoliła na wykrycie redukcji miana o $4 \log_{10}$
- c. Stężenie 0.1% produktu nie wykazało redukcji miana wirusa na poziomie $4 \log_{10}$ w ciągu 60 i 2 min. Redukcja wyniosła odpowiednio $2.5 \log_{10}$ i $1 \log_{10}$. Stężenie 0.04% produktu nie wykazało redukcji miana wirusa na poziomie $4 \log_{10}$ w ciągu 60 min i 2 min. Redukcja wyniosła odpowiednio $3.5 \log_{10}$ i $2.5 \log_{10}$. Stężenie produktu 0.02% wykazało redukcję wirusa o $4 \log_{10}$ w obu czasach kontaktu.
- d. Porównawcze mianowanie wirusa w komórkach A549 inkubowanych w obecności produktu (rozcieńczenie 1:10000) i nie inkubowanych wykazały akceptowalne różnice ($< \log_{10}$) w mianie wirusa.
- e. Kontrola skuteczności hamowania aktywności produktu była $\leq 0.5 \log_{10}$

Ponieważ wszystkie kryteria podane w normie (EN 5.7) są spełnione, badanie z adenowirusem 5 wg normy PN- EN 14476 jest ważne.

7. Wyniki

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 1 - 6.

8. Podsumowanie

Zgodnie z założeniem normy, środek dezynfekcyjny uznaje się za wirusobójczy, jeśli po rekomendowanym czasie ekspozycji miano wirusa obniżone jest o co najmniej $4\log_{10}$ (inaktywacja $\geq 99,99\%$). Preparat Eco-pH badano w odniesieniu do adenowirusa 5, w stężeniu 0.1%, 0.04% and 0.02%. Czas ekspozycji wynosił 60 minut i 2 minuty. Po tym czasie określano redukcję miana dla każdego z badanych stężeń.

Dla **0.1% roztworu** redukcja miana po 60 min wyniosła $2.5 \log_{10}$, a po 2 min - $1 \log_{10}$ (preparat w tym stężeniu nie może być uznany jako środek dezynfekujący przeciwko adenowirusowi 5 i wykazuje odpowiednio 99.5% i 90% redukcji).

Dla **0.04% roztworu** redukcja miana po 60 min wyniosła $3.5 \log_{10}$, a po 2 min – $2.5 \log_{10}$ (preparat w tym stężeniu nie może być uznany jako środek dezynfekujący przeciwko adenowirusowi 5 i wykazuje odpowiednio 99.95% i 99.5% redukcji).

Dla **0.02% roztworu** redukcja mian wyniosła $4 \log_{10}$ w obu czasach kontaktu (99.99%). W związku z tym preparat Eco-pH w stężeniu 0.02% może zostać uznany wg normy za wirusobójczy środek dezynfekcyjny.

Wrocław 2025-07-31

Dr hab. Barbara Bażanów, prof. uczelni

Tab. 1. Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 0.1% względem adenowirusa 5, czas kontaktu 60 min.

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	0.1%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4443 4434	4332 2342	2200 0210	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	0.1%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	60	tttt tttt	tttt tttt	0010 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4434	3443	3232	3322	2212	1111
				4444	4444	4444	4434	3423	2222	1212	1111
			60	4444	4444	3444	4433	3233	2233	2221	1111
				4444	4444	4444	4433	3233	3332	2122	1111

Tab. 2. Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 0.04% względem adenowirusa 5, czas kontaktu 60 min.

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	0.04%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	3434 4444	3323 3322	0211 0100	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	0.04%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	60	tttt tttt	tttt tttt	0010 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4434	3443	3232	3322	2212	1111
				4444	4444	4444	4434	3423	2222	1212	1111
			60	4444	4444	3444	4433	3233	2233	2221	1111
				4444	4444	4444	4433	3233	3332	2122	1111

Tab. 3. Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 0.02% względem adenowirusa 5, czas kontaktu 60 min.

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	0.02%	Warunki czyste	60	tttt tttt	4444 4343	4333 3323	2213 3221	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	0.02%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	60	tttt tttt	tttt tttt	0010 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4434	3443	3232	3322	2212	1111
				4444	4444	4444	4434	3423	2222	1212	1111
			60	4444	4444	3444	4433	3233	2233	2221	1111
				4444	4444	4444	4433	3233	3332	2122	1111

Tab. 4. Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 0.1% względem adenowirusa 5, czas kontaktu 2 min.

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	01%	Warunki czyste	2	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4443 4434	2343 3442	3221 2231	1121 1112	0000 0000
Toksyczność produktu	0.1%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	2	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4444	4444	4434	3344	3322	1112
				4444	4444	4444	4444	3443	3324	2232	1131
			2	4444	4444	4444	4444	4433	4233	2233	1112
				4444	4444	4444	4444	3444	3342	2332	2211

Tab. 5. Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 0.04% względem adenowirusa 5, czas kontaktu 2 min.

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	0.04%	Warunki czyste	2	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4443 4433	2322 3333	1100 0210	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	0.04%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	2	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4444	4444	4434	3344	3322	1112
				4444	4444	4444	4444	3443	3324	2232	1131
			2	4444	4444	4444	4444	4433	4233	2233	1112
				4444	4444	4444	4444	3444	3342	2332	2211

Tab. 6. Badanie wirusobójczych właściwości płynu do dezynfekcji Eco-pH 0.02% względem adenowirusa 5, czas kontaktu 2 min.

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
płyn do dezynfekcji Eco-pH	0.02%	Warunki czyste	2	tttt tttt	3444 4443	2333 3223	1121 1122	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Toksyczność produktu	0.02%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	2	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Cytotoksyczność formaldehydu	1,4%	PBS	n.d.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444	4444	4444	4444	4434	3344	3322	1112
				4444	4444	4444	4444	3443	3324	2232	1131
			2	4444	4444	4444	4444	4433	4233	2233	1112
				4444	4444	4444	4444	3444	3342	2332	2211

n.d. = nie dotyczy

0 = brak obecności wirusa

t = cytotoksyczność

1-4 = obecność wirusa (stopień nasilenia efektu cytopatycznego w 8 dołkach mikropłytki)