

**Określenie wirusobójczego działania produktu
dezynfekującego Eco-pH wobec ludzkiego
herpeswirusa typu 1 (HSV -1)**

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 produktu dezynfekującego Eco-pH wobec ludzkiego herpeswirusa typu 1, 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

4. 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	Ludzki herpeswirus typu 1 (ATCC® VR-1493™)

5. Materiał i metody

5.1 Przygotowanie zawiesiny wirusa testowego

Do przygotowania zawiesiny wirusa wg normy PN- EN 14476 (EN 5.4) linię komórkową HeLa namnażano w 175 cm³ naczyniach hodowlanych (NEST SCIENTIFIC Biotechnology, New Jersey, USA) w obecności Dulbeco's Minimum Essential Medium i 10% surowicą płodu bydlęcego (FBS). Do monolayeru dodawano ludzki herpeswirus typu 1 (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 dołków na mikropłytkę, zawierających 0,1 ml świeżo strypsynizowanych komórek HeLa (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 wykazało redukcję miana wirusa na poziomie $4 \log_{10}$ w obu czasach kontaktu (60 i 2 min). Stężenie 0.04% produktu wykazało redukcję miana wirusa na poziomie $4 \log_{10}$ w ciągu 60 i 1 log w ciągu 2 min. Stężenie produktu 0.02% wykazało redukcję wirusa $>4 \log_{10}$ ($4.5 \log$) w czasie kontaktu 60 min i 1.5 log po 2 min.
- d. Porównawcze mianowanie wirusa w komórkach HeLa 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 $\leq 0.5 \log$

Ponieważ wszystkie kryteria podane w normie (EN 5.7) są spełnione, badanie z herpeswirusem opryszczki typu 1 wg normy PN- EN 14476 jest ważne.

7. Wyniki

Wyniki przedstawiono w tabelach 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 log₁₀ (inaktywacja ≥ 99,99%). Preparat Eco-pH badano w odniesieniu do ludzkiego herpeswirusa typu 1 (wirus opryszczki pospolitej typu 1), w stężeniu 0.1%, 0.04% i 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 i 2 min wyniosła 4 log₁₀ (99.99% redukcji).

Dla **0.04% roztworu** redukcja miana po 60 min wyniosła 4 log₁₀, a po 2 min – 1 log₁₀ (odpowiednio 99.99% i 90% redukcji).

Dla **0.02% roztworu** redukcja mian wyniosła 4 log₁₀ (99.99%) po 60 min i 1.5 log₁₀ (95%) po 2 min.

W związku z tym preparat Eco-pH w stężeniu 0.1% może zostać uznany wg normy za wirusobójczy środek dezynfekcyjny w obu czasach kontaktu (60 min i 2 min). Preparat w stężeniu 0.02% i 0.04% również może być uznany za środek dezynfekcyjny przeciwko ludzkiemu herpeswirusowi typu 1, ale po 60 min czasie kontaktu.

Wrocław 2025-07-31

Tab. 1 Badanie wirusobójczych właściwości 0.1% Eco-pH względem HSV -1, czas kontaktu 60 min

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Eco-pH	0.1%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4433 4433	0000 0000	0000 0000	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	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	4434	4444	3422	3222	3321	1212	1111
				4444	4444	4444	4432	2223	2122	1112	1121
			60	4444	4444	3443	4233	3232	2231	2121	1111
				4444	4444	4443	4433	3232	3311	2121	1111

Tab. 2 Badanie wirusobójczych właściwości 0.04% Eco-pH względem HSV -1, czas kontaktu 60 min

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Eco-pH	0.04%	Warunki czyste	60	tttt tttt	tttt tttt	3334 4334	3211 1122	0000 0000	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	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	4434	4444	3422	3222	3321	1212	1111
				4444	4444	4444	4432	2223	2122	1112	1121

			60	4444	4444	3443	4233	3232	2231	2121	1111
				4444	4444	4443	4433	3232	3311	2121	1111

Tab. 3. Badanie wirusobójczych właściwości 0.02% Eco-pH względem HSV -1, czas kontaktu 60 min

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Eco-pH	0.02%	Warunki czyste	60	tttt tttt	3343 4344	2233 3323	2200 0021	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	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	4434 4444	4444 4444	3422 4432	3222 2223	3321 2122	1212 1112	1111 1121
			60	4444 4444	4444 4444	3443 4443	4233 4433	3232 3232	2231 3311	2121 2121	1111 1111

Tab. 4. Badanie wirusobójczych właściwości 0.1% Eco-pH względem HSV -1, czas kontaktu 2 min

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eco-pH	01%	Warunki czyste	2	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	2233 2234	2221 1111	0000 0000	0000 0000	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	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	2	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	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	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444 4444	4434 4444	4444 4444	3422 4432	3222 2223	3321 2122	1212 3222	1211 2222	1121 1111

			2	4444 4444	4444 4444	3443 4443	4233 4433	3232 3232	2231 3311	2121 2121	1122 2221	1111 1111
--	--	--	---	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Tab. 5 Badanie wirusobójczych właściwości 0.04% Eco-pH względem HSV -1, czas kontaktu 2 min

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eco-pH	0.04%	Warunki czyste	2	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4434 3344	3342 3323	3322 2112	1221 1111	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	0000 0000
Formaldehyd	1,4%	PBS	2	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	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	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444 4444	4434 4444	4444 4444	3422 4432	3222 2223	3321 2122	1212 3222	1211 2222	1121 1111
			2	4444 4444	4444 4444	3443 4443	4233 4433	3232 3232	2231 3311	2121 2121	1122 2221	1111 1111

Tab. 6. Badanie wirusobójczych właściwości 0.02% Eco-pH względem HSV -1, czas kontaktu 2 min

Produkt	Stężenie	Substancje interferujące	Czas kontaktu (min)	Rozcieńczenia								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eco-pH	0.02%	Warunki czyste	2	tttt tttt	tttt tttt	4343 4433	3342 2322	3223 3212	2212 2232	2212 2111	0110 1001	0000 0000
Toksyczność produktu	0.02%	Warunki czyste	n.d	tttt tttt	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	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	0000 0000
Kontrola wirusa	n.d	Warunki czyste	0	4444 4444	4434 4444	4444 4444	3422 4432	3222 2223	3321 2122	1212 3222	1211 2222	1121 1111
			2	4444 4444	4444 4444	3443 4443	4233 4433	3232 3232	2231 3311	2121 2121	1122 2221	1111 1111

n.d. = nie dotyczy

0 = brak obecności wirusa

t =cytotoksyczność

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