



Dr. Markus Eickmann, Institut für Virologie, Hans-Meerwein-Str 2, 35043 Marburg  
(Institut Virologii, ul. Hansa-Meerweina 2, 35043 Marburg)

Do  
Bioclimatic GmbH (Bioclimatic Sp. z o.o.)  
Im Niedernfeld 4  
D-31542 Bad Nenndorf

Specjalizacja Medyczna  
Instytut Wirusologii  
**Dr Markus Eickmann**  
Tel.: 06421 2864315  
Faks: 06421 2865482  
E-Mail: eickmann@staff.uni-marburg.de  
Adres: Hans-Meerwein-Straße 2  
35043 Marburg  
Internet: www.uni-marburg.de/FB20/virologie  
Marburg, dnia: 03.11.2009

## **Ekspertyza potwierdzająca skuteczność urządzenia Bioclimatic serii Viroxx przeciwko wirusowi grypy H1N1 (A/Hamburg/05/09)**

Urządzenie Viroxx firmy Bioclimatic GmbH (Bioclimatic Sp. z o. o.), D-31542 Bad Nenndorf badano pod kątem jego właściwości dezaktywujących wirusa grypy H1N1 (szczep A/Hamburg/05/09). Oceniano skuteczność źródła promieniowania UV, zastosowanego w urządzeniu.

Wirusa poddawano ekspozycji na promieniowanie UV w podłożu hodowlanym z 0,1% albuminą osocza wołowego (BSA), przez 60 sekund, 1 sekundę i 0,5 sekundy.

**Podsumowując można stwierdzić, że źródło UV, zastosowane w urządzeniu firmy Bioclimatic Viroxx z odległości ustalonej przez producenta, już po 0,5 sekundy cechowało się właściwościami dezaktywującymi wirusa grypy H1N1, którego zakaźność po zastosowanej procedurze spadała poniżej progu wykrywalności.**

Dr Markus Eickmann

## Laboratorium

Instytut Wirusologii, Hans-Meerweinstraße 2, 34043 Marburg

### Charakterystyka urządzenia

Oznaczenie produktu	<b>Viroxx</b>
Producent	Bioclimatic GmbH (Bioclimatic Sp. z o. o.) Im Niedernfeld 4 D-31542Bad Nenndorf

### Warunki testu

Okres testowania	<b>październik - listopad 2009</b>
Temperatura prowadzenia testu	20,0 +/- 0,5°C
Czas działania promieniowania UV w odległości ustalonej przez producenta	<b>60,1 i 0,5 sekundy</b>
Zanieczyszczenie (obciążenie proteinowe)	0,2% BSA
Rozcieńczalnik	Preparat Minimum Essential Medium (MEM) (Firma: GIBCO)
Szczep wirusa	Wirus grypy H1N1 (A/ Hamburg/05/09)

### Wytworzenie zawiesiny wirusowej

Do wytworzenia zawiesiny wirusowej wykorzystano komórki MDCK, które hodowano w kolbach Roux o pojemności 175 cm<sup>2</sup> (Nunc GmbH & Co, Wiesbaden) z podłożem hodowlanym Minimum Essential Medium (MEM), z dodatkiem 10% płodowego osocza cielęcego (FKS), pirogronianu sodu, penicyliny, streptomycyny i glutaminy. Hodowane i skoncentrowane do 80% komórki MDCK zostały zakażone wirusem grypy H1N1 (A/Hamburg/05/09) w kolbach o pojemności 175 cm<sup>2</sup> z wielokrotnością zakażenia (moi) o wartości 0,1. Komórki inokulowano z 10 ml odpowiednio rozcieńzonego roztworu wirusowego i następnie inkubowano przez jedną godzinę w temperaturze 37°C (5% CO<sub>2</sub>) w inkubatorze. Następnie 30 ml MEM z dodatkiem glutaminy, penicyliny, streptomycyny, 1µg/ml TPCK-trypsyny i BSA o stężeniu końcowym równym 0,2%, aż do momentu wystąpienia działania cytopatycznego, przechowywano w inkubatorze w temperaturze 37°C (5% CO<sub>2</sub>). 72 godziny po zakażeniu zebrano supernatant. Zawierający wirusy supernatant poddano dziesięciominutowemu wirowaniu z prędkością 3000 obrotów na minutę w wirówce Megafuge 1.0 R (Heraeus) w celu oczyszczenia z resztek komórkowych i przechowywano w temperaturze 4 °C.

### Wykonanie próby dezaktywacji

Zawiesina zawierająca testowanego wirusa (80 µl) została naniesiona na odpowiedni nośnik i przez 60, 1 i 0,5 sekundy, w ustalonej przez producenta odległości poddawano ją ekspozycji na działanie źródła promieniowania UV. Przestrzeganie krótkich czasów inkubacji (1 i 0,5 sekundy) zapewniono dzięki zastosowaniu mechanizmu wyzwalającego jednostki oświetlającej.

Kontrolę wirusową poddawano analogicznej procedurze, tak, jak roztwór produktu testowego. Procedurę testową prowadzono w temperaturze 20,0 +/- 2°C. Po napromieniowaniu przeprowadzono od razu miareczkowanie zakaźności resztkowej w 10 etapach z MEM z penicyliną, streptomycyną, glutaminą, BSA oraz trypsyną, oraz wykonano szereg rozcieńczeń hodowli komórkowych formujących kolonie w płytkach z 96

studzienkami. Inkubację hodowli komórkowej prowadzono w temperaturze 37°C w inkubatorze CO<sub>2</sub>, ze stężeniem CO<sub>2</sub> równym 5%.

### **Określenie zakaźności**

Zakaźność określono na podstawie próby ilościowej (punkt końcowy miareczkowania): do tej próby zastosowano płytki z 96 studzienkami ze stężonymi hodowlami komórek MDCK. W co czwartej studzience umieszczono po 100 µl szeregu rozcieńczeń. Następnie płytki do hodowli komórkowych inkubowano przez 3 dni w temperaturze 37° C w inkubatorze CO<sub>2</sub> w stężeniu CO<sub>2</sub> równym 5%. Działanie cytopatyczne dokumentowano na podstawie oceny w mikroskopie świetlnym. Następnie wykrywano rozcieńczenie zawiesiny wirusowej, przy którym 50% zaszczerpionych rozcieńczonych hodowli było zakażone (TCID<sub>50</sub>/ml). Obliczenie wartości TCID<sub>50</sub>/ml wykonano na podstawie metody wg Spearman-Kärbera (Br. J. Psychol. 2(1908): 227-42, Arch. exp. Path. Pharmac. 162 (1931): 480-87).

### **Obliczenie skuteczności dezaktywacji wirusa**

Ocenę skuteczności dezaktywacji wirusa wykonano obliczając zmniejszenie miana (  $\Delta \log$  TCID<sub>50</sub>) w porównaniu do każdorazowo, równolegle przeprowadzanego miareczkowania kontrolnego.

