

Logo: «FONDEREPHAR»
Lääketutkimuksen kehittämissäätiö
Laadunhallintajärjestelmä
Todistus ISO 9001

Toulouse, 23.heinäkuuta 2020

TUTKIMUS 20-2699

**IHMISEN KORONAVIRUKSEN VIRUSVASTE -AKTIIVISUUDEN MITTAMINEN
229E MUOVIMATERIAALEILLA JA MUILLA EPÄHUOKOISILLA PINNOILLA
ISO 21702 -MENETELMÄN MUKAISESTI, TOUKOKUU 2019**

Tutkimuksen sponsori **WEBINESS**
80 rue de Paris
93100 MONTREUIL

Testauslaboratorio **FONDEREPHAR**
Farmaseuttinen tiedekunta
chemin des Maraichers, talo 35
31062 TOULOUSE cedex 9
RANSKA

Tohtori Laila Haddioui
Tutkimuksen johtaja
/allekirjoitus/

Tohtori Jocelyne Bakaria
Laatujohtaja
/allekirjoitus/

I - TESTAUSLABORATORION TUNNISTUSTIEDOT

Farmaseuttinen tiedekunta
chemin des Maraichers, talo 35
31062 TOULOUSE cedex 9

II - NÄYTTEEN (preparaatin) TUNNISTUSTIEDOT

- | | |
|-----------------------|---------------------------------|
| - Taudinkantaja: | Käsitlemätön taudinkantaja-aine |
| - Erän numero: | ei ilmoiteta |
| - Vastaanotettu: | 02.07.2020 |
| - Sisäinen koodi: | 20-2699-1 |
|
 | |
| - Taudinkantaja: | käsitlemätön taudinkantaja-aine |
| - Erän numero: | ei ilmoiteta |
| - Vastaanotettu: | 02.07.2020 |
| - Sisäinen koodi: | 20-2699-2 |
|
 | |
| - Toimittaja: | WEBINESS |
|
 | |
| - Koestus on pidetty: | Heinäkuussa 2020 |

III – KOESTUKSEN MENETELMÄ**III-1 virus**

Nimitys:	Ihmisen koronavirus 229E
Alkuperä:	Amerikkalainen tyypiviiljelmäkokkelma (ATCC)
Viite:	VR-740
Erän numero ATCC:	58505270
Erän sisäinen numero:	SS-2-260520 (suoritus nro 2)

III-2- Reseptorisolut

Nimitys:	Vero solut
Alkuperä:	ATCC
Viite:	CCI-81
Erän numero ATCC:	3372621
Erän sisäinen numero:	WCB-090708 (suoritus nro 13)

IV – TESTAUKSEN OLOSUHTEET

- Kontaktin aika: 1 tunti ja 24 tuntia
- Testilämpötila: 25°C ± 1°C

V - TESTAUKSEN METODI

V-1 Sytotoksisuuden kontrolli

Käsittämätön aine 2,5 ml lisätään kolmeen käsittelemättömään näytteeseen ja kolmeen käsiteltyyn näytteeseen. Näytteet pestään neutralointiväliaineella 4 kertaa. Sarjalaimennoksia suhteessa 10 tehdään tavoitteella kontrolloida sitä, että sytotoksisuus puuttuu.

V-2 Solujen viruserkkyuden tarkistaminen ja viruksenvastaisen aktiivisuuden lopettaminen

Käsittämätön aine 2,5 ml lisätään kolmeen käsittelemättömään näytteeseen ja kolmeen käsiteltyyn näytteeseen. Näytteet pestään neutralointiväliaineella 4 kertaa. Sitten 1,98 ml pelkistävää ainetta saatetaan kosketukseen 20 µl virus-suspension kanssa, joka on valmistettu konsentraatiossa 4-6 ·10⁴ DICT50 / ml (*DICT on tarttuva annos soluviljelmässä*).

Inkuboinnin jälkeen 25 ° C lämpötilassa 30 minuutin ajan koeputket pidetään jatkuvasti jäässä viruksen testaukseen saakka.

V-3 Virus/pinta -kosketus

- Jokainen 5 cm x 5 cm pintanäyte (kontrolli- ja koenäytteet) laitetaan steriiliin lasirakenteiseen Petri-astiaan
- 400 µl virusta sisältävää suspensiota asetetaan jokaiselle pinnalle ja jaetaan 16 cm²:n mukaan

V-4 Viruskalvon poistaminen

Inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisätään 3,6 ml neutraloivaa liuosta (jäädetytty viljelmä) elinkelpoisten virusten titraukseksi.

Sitten suoritetaan välittömästi jäljellä olevien elinkelpoisten virusten titraus.

V-4 Viruksen titraus

Virussuspension laimennokset suhteessa 10 on tehty soluviljelmässä.

Titraus suoritetaan 96-kuoppaisilla mikrolevyillä. Jokainen laimennos suoritetaan 8 kertaa.

V-5 Virustitterin laskeminen

Sekundäärisuspension sytopaattinen vaikutus määritetään 4 päivän kuluttua viljelmän kasvattamisen jälkeen. Tartuntayksiköiden lukumäärää arvioidaan SPIRMEN-KERBER -menetelmällä laskemalla 50% rajapisteen negatiivinen logaritmi (\lg DIKT₅₀) seuraavan kaavan avulla:

\lg DIKT₅₀ = korkeimman käytetyn viruspitoisuuden negatiivinen logaritmi - [(summa% jokaisessa laimennoksessa / 100-0,5) X (log-laimennos)]

Seuraavat testit suoritetaan 3 kertaa

VI- TULOKSET

VI-1 Validointi

VI-1-1 Sytotoksisuuden kontrollointi

Soluissa ei ole havaittu sytotoksisuutta, kun viljelyalusta oli saatettu kosketukseen käsiteltyjen kantajien ja käsittelemättömien kantajien kanssa.

VI-1-2 Solujen virusherkkyyden kontrollointi ja virucidisen vaikutuksen lopettaminen

Neutraloivan laimennoksen kontrollinäytteiden keskimääräisten titterien (\lg DIKT₅₀) ja käsiteltyjen sekä käsittelemättömien pintojen keskimääräisten titteriherkkyys tulee olla pienempi tai yhtä suuri kuin 0,5 \lg .

Kontrollina oleva neutraloiva liuos:

- Kontrollinäyte 1: \lg DIKT₅₀ = 5,00
- Kontrollinäyte 2: \lg DIKT₅₀ = 5,00
- Kontrollinäyte 3: \lg DIKT₅₀ = 4,88

Keskiarvo \lg DIKT₅₀, Herkkyyden kontrollinäyte = 4,96

Käsittelemättömien pintojen herkkyyden kontrollinäyte

- Kontrollinäyte 1: \lg DIKT₅₀ = 5,00
- Kontrollinäyte 2: \lg DIKT₅₀ = 4,88
- Kontrollinäyte 3: \lg DIKT₅₀ = 4,63

Keskiarvo \lg DIKT₅₀, herkkyyden kontrollinäyte = 4,84

Neutraloivan liuoksen keskimääräinen titteri - Käsittelemättömien pintojen herkkyys = 0,12

Koe, käsiteltyjen pintojen herkkyys ja sytotoksisuus

- Kontrollinäyte 1: $\lg \text{DIKT}_{50} = 4,88$
- Kontrollinäyte 2: $\lg \text{DIKT}_{50} = 4,75$
- Kontrollinäyte 3: $\lg \text{DIKT}_{50} = 4,63$

Keskimääräinen $\lg \text{DIKT}_{50}$, herkkyuden kontrollinäyte = 4,75

Neutraloivan liuoksen keskimääräinen titteri - Käsittelemättömien pintojen herkkyys = 0,21

VI-1-3 Kontrollinäyte TO

- Kontrollinäyte 1: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,13$
- Kontrollinäyte 2: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,38$
- Kontrollinäyte 3: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,25$

Keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50}$ TO = 6,25

Maksimaalinen virustitteri - Minimaalinen virustitteri = 0,08

Keskiarvo 3:sta virustitteristä

Titterit ($\lg \text{DIKT}_{50}$) 3:ssa TO kokeessa tulee olla homogeenisia

Maksimaalinen virustitteri - Minimaalinen virustitteri / Keskiarvo 3:sta virustitteristä $\leq 0,2$.

VI-2 Koenäytteiden testaaminen**VI-2-1 Koe- 1 tunti****Kontrollinäyte, aika 1 tunti:**

- Kontrollinäyte 1: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,13$
- Kontrollinäyte 2: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,13$
- Kontrollinäyte 3: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,25$

Keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50}$ TO = 6,17

Koe 1 tunti

- Koe 1: $\lg \text{DIKT}_{50} = 4,50$
- Koe 2: $\lg \text{DIKT}_{50} = 4,25$
- Koe 3: $\lg \text{DIKT}_{50} = 4,38$

Keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50}$ koe = 4,38

R = keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50}$, Kontrollinäyte 1 tunti – Keskimääräinen $\lg \text{DIKT}_{50}$, Koe 1 tunti = 1,79 log

VI-2-1 Koe 24 tuntia

Koe 24 tuntia

- Kontrollinäyte 1: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,13$
- Kontrollinäyte 2: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,25$
- Kontrollinäyte 3: $\lg \text{DIKT}_{50} = 6,13$

Keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50} \text{ TO} = 6,17$

Koe 24 tuntia

- Koe 1: $\lg \text{DIKT}_{50} = 2,63$
- Koe 2: $\lg \text{DIKT}_{50} = 2,63$
- Koe 3: $\lg \text{DIKT}_{50} = 2,50$

Keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50} \text{ Koe} = 2,59$

R = keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50}$, kontrolliarvo 24 tuntia – Keskiarvo $\lg \text{DIKT}_{50}$, Koe 24 tuntia = 3,58 log

VII – LAUSUNTO

ISO 21702 -standardin asettaman menetelmän mukaan (toukokuu 2019) kantajien käsittely, joihin on laitettu ihmisen 229E-koronaviruskanta antaa seuraavat tulokset:

- Viruskuormituksen väheneminen 1,79 lg:lla kosketusajalla 1 tunti
- Viruskuormituksen väheneminen 3,58 lg :lla kosketusajalla 24 tuntia

Kantajien käsittely aiheuttaa viruskuormituksen vähenemistä 98,4% 1 tunnin kontaktissa ja 99,97% 24 tunnin kontaktissa.