

Sarastro GmbH
Zum Schacht 7
D-56287 Qierschied – Götterborn
(<http://www.sarastro-nanotec.com>)

İçin olan
Kontrol raporu ve bilirkişi raporu

Kuş gribi virüsü H3N8
(H5N1 yerine geçen)
Kıyasla

BACOBAN – seramik kaplı – Fayansların Anti Virüs Etkililiğine
ilişkin Araştırma

ASTM E 2180'ne dayanılarak test metotları

Dr. Jochen Steinmann
MikroLab GmbH
Norderoog 2
D-28259 Bremen

Telefon: +49 (0) 421-27819102
Faks: +49 (0) 421-2760283
E-Mail: Mikrolab.GmbH@t-online.de
<http://www.mikrolab-gmbh.de>

09.06.2006

Kontr ol Rapor u

1. Laboratuar

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2. Numunenin Teşhis Edilmesi (Kontrol Konusu)

Kontrol raporu no	S05ML300
İşveren	Sarastro GmbH
Ürün amblemi	Bacoban
Kullanım alanı	Yüzey dezenfeksiyonu
Dolum no	20050504
Üretim tarihi	-
Tahakkuk	-
100 g cinsinden aktif özdek(ler) ve bunların konsantrasyon (ları)	%65,8 etanol, %9,4 izopropenol, %1,0 Benzal koynum klorid
Görünüm ve koku	Şeffaf, renksiz çözelti Ürün spesifikli
pH-değeri(leri) (cam elektrot)	Seyreltilmemiş: 6,26 (20 ⁰ C)
Depo koşulları	Oda sıcaklığı, karanlık (muhafaza alanı serbest olarak ulaşılabilir değildir)
Babacon teslimat tarihi	12.05.2005
Seramik yası teller	İşveren tarafından bize bırakılmıştır

3. Materyal

3.1 Çevre ve Reaktifler

- Earle's BSS ile Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l, katalog no: 12-125F)
- Fötale Kalberserum (Biochrom AG, Madde no: S 0115)
- Schaferythrozyten (ateşli - gıda maddesi tekniği, Madde No: 31100100)
- Aqua bidest (Fresenius Kabi Almanya, Madde No: P2N 1636071)
- PBS (invitrogen, madde no: 18912-014)

- BSA (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, madde no: CA-2153)
- Agar – Agar (işveren tarafından bırakılmıştır)

3.2 Virüs ve Hücreler

A/ördek/Ukrayna/1/63 (H3N8) grip virüsü, Virüs hastalıkları federal araştırma kurumunun Friedrich – Loeffler enstitüsü kuş gribi ve Newcastle Disease için olan referans laborantı Sayın PD Dr. Timm Harder tarafından ortaya atılmıştır. Bu virüsler kontrol amaçlı kuş gribine neden olan prototip olarak tarafımıza gönderilmişti. Riem adasındaki hayvan BFAV'lerin hücre çizgisi için hücre bankası olan MDCK-hücreleri tarafımıza sayın Dr. R. Ribe tarafından iletilmiştir. Hücreler periyodik aralıklarla morfolojik değişimler üzerinde ve maykoplazmalı bulaşma üzerinden incelenmiştir. Ayrıca morfolojik değişimler ve maykoplazmalar tekrar edilerek gösterilememiştir.

3.3 Aletler

- kuluçka dolabı (CO₂ – kuluçka, Nunc GmbH & Co. KG, model QWJ350)
- hızlı dönen karıştırıcı (mükemmel karıştırıcı, tip G 560E)
- masa santrifüjü (Sigma – Aldrich – Chemie GmbH, tip 113)
- dönüşümlü mikroskop (Olympus, Tip CK 30)
- Santrifüj 5804 R (Eppendorf AG)
- su banyosu (JULABO, Julabo U 3)
- değişken Eppendorf Pipetleri

4. Kontrol Koşulları

Kontrol sıcaklığı	22 ⁰ C ± 1,0 ⁰ C
Ürün konsantrasyonu (Bacoban)	Seyreltilmemiş
Deneye başlamadan önce seramik fayansların kaplanması	3, 5 ve 10 gün
Virüs süspansiyonuna seramik fayansın nüfuz etme süresi	0, 30 ve 60 dakika
Başlangıçtaki albümin dolumu	% 0,03 serum albümin (EN 14476:2005 göre temizlik koşulları)
Dezenfeksiyon madde etkisinin kaldırılması	Jel filtresi (sephacryl kolonu)
Virüs kaynağı	A/ördek/Ukrayna/1/63 (H3H8) kuş gribi virüsü
Kontrol süreç alanı	04.04.2006 – 09.06.2006
Kontrolün bitirilmesi	09.06.2006

5. Metotlar

5.1 Virüs Süspansiyonun Üretimi

Eagle's Minimum Medium ve %10 veya %2 fetal serum ile kültürlenen MDCK hücresi virüs süspansiyonunun üretimi için 175 cm² hücre kültür şişesi (Nunc GmbH & Co. Kg., madde no: 156502) içerisinde kuş gribi virüsüyle aşılanmıştır. İzotopik etkilerin oluşumundan (CPE) (yaklaşık 24 saat sonra) sonra virüs ürünleri ortaya çıkmıştır. Sonuç virüs süspansiyonu olarak elde edilmiştir, tam sayıya bölünmüştür ve 80⁰C de muhafaza edilmiştir.

5.2 Seramik Fayansların Ön Muamelesi ve Kaplanması

Seramik fayanslar üretici tarafından, tarafımıza hizmete sunulmuştur. Söz konusu olan ise kaplama yapılmadan kısa bir süre önce %100 izopropenola yatırılan ve 2 cm yarıçapa sahip kontrol materyali idi. Çıkartıldıktan sonra bir bez ile temizlendi ve 8 köşeli fayanslara havada kuruması için bırakıldı. Ondan sonra ise yüzey dezenfeksiyon maddesinin bir pipet ucu yardımıyla kenara kadar dağıtıldığı yerde 50 µL Bacoban ile kaplama yapılmıştır. Oda sıcaklığındaki muhafaza süresi 3, 5 ve 10 gün arasında olmuştur. Deneye başlamadan önce dolaysız olarak seramik fayanslar steril ve %0,85 NaCl çözeltisi içersine batırılan selüloz tampon ile temizlenmiştir.

5.3 Seramik Fayansların Yüklenmesi ve Virüslerin Geri Dönüşümü

Kaplanan seramik fayansların anti virüs özelliklerinin analizi için deney başlangıcında; 40µL virüs süspansiyonu, 10 µL yük özdeği ve 50µL Agar-Agar karıştırılmıştır. Yüklemede söz konusu olan EN 14476:2005 göre yapılan düşük (temizlik koşulları) ve yüksek yüklemeydi (kirlilik koşulları). Düşük yükleme için test tahsisatında 0,3 g/L BSA konsantrasyonunu oluşturan %0,3'lü BSA-çözeltisinin 10 µL (büyükbaş hayvan serum albümin Chon fraksiyonu V) ilave edilmiştir. Yüksek yükleme için ise 3,0 g BSA ve 3 ml yıkanmış, 100 mililitre başına paketlenmiş Schaferythrozyten ihtiva eden bir çözelti ilave edilmiştir (test başlangıcındaki konsantrasyon 3,0 g/L BSA + 3 mL/l arıtılmış Schaferythrozyten). Her iki çözeltinin üretimi de EN 14476:2005'in madde 5.2.3.3'üne göre olmuştur.

Buna müteakip ise yukarıda belirtilen tahsisatın 100 µL, seramik fayanslar üzerine iki katı tahsisat olarak konmuştur. Nemli oda içersindeki kuluçka süresi 0,30 ve 60 dakika tutarında olmuştur.

Virüs geri dönüşümü için kuluçka süresi bitiminden sonra seramik fayans 900 µL soğuk Eagle's Minimum Essential Medium ve Earle's BSS ile defalarca durulanmıştır. Daha sonra ise Eluataki virüsler belirlenmiştir.

5.4 Enfeksiyonun Tespiti

Enfeksiyonun belirlenmesi mikro titreleme yöntemindeki son nokta, titreleme yardımıyla yapılmıştır. Ayrıca numunenler çıkartıldıktan sonra ilk etapta donma soğukluğundaki bir çevrede, faktör 10 ile seyreltilmiştir. Ayrıca her defasında münferit çözeltinin 100 µL'si steril 96-mükemmel mikrotit fayansların 8 oluğuna (Nunc GmbH & Co. Kg, madde no: 149026) konan MDCK-hücreleriyle nakledilmiş (oyuk başına yaklaşık 2,7 x 10⁴ hücre) ve 37⁰C deki fayanslar CO₂- kuluçka dolabı içersinde (%5 CO₂ miktarı) kuluçkaya yatırılmıştır. 5 gün sonra ise ters bir mikroskopla mikrotit fayansın münferit oyuklarındaki virüs spesifikli CPE kararı hakkında tahsisatların değerlendirilmesi yapılmıştır. Virüstilerin hesaplanması (TCID₅₀/ml = doku kültürü enfeksiyon kutusu) aşağıdaki formül ile Spearman ve Karber metoduna göre yapılmıştır:

$$\text{Log}_{10}\text{TICD}_{50} = - (X_0 - 0,5 + \sum r / n) .$$

Bu formül içersindeki

$X_0 = \log_{10} \%100$ pozitif reaksiyonlu en düşük seyreltidir.

$r = \%100$ pozitif ve en yüksek tüm pozitif seyrelti basamaklarıyla en düşük seyrelti basamağının pozitif tespitinin miktarı
 $n =$ seyrelti basamağı balına tespitinin miktarı

5.5 Hücre Toksinleri Redüksiyonu

Seramik fayanstı durulan Eluat belirgin bir hücre toksinlerini gösterdiğinden dolayı hayvan atığı sunumuna ilişkin olarak MicroSpin S-400 HR-sütunları (sephacryl) oluşturulmuştur. Nüfuz süresi bitiminden sonra dolaysız olarak her defasında, üreticinin verilerine göre önceden sıkı bir şekilde tahlil edilmiş olan ve ek olarak %0,5'li BSA – çözeltinin 200 µL ile durulanmış olan, Eluatın 100 µL'si MicroSpin S-400 HR-sütununa verilmiştir. Virüstütlerin sütun faaliyetleriyle zarar görmediği ispatı için gerekli kontroller de yapılmıştır. Eluat'ın 100 µL'si ile 5.4 içeriğinde tanımlandığı üzere virüstrasyon ircaa edilmiştir.

5.6 Kontroller

İnaktif deneydeki virüstitlerin tespiti için deney başlangıcında dolaysız olarak ve deney bitiminde MicroSpin S-400 HR-kolonları ile ve MicroSpin S-400 HR-kolonları olmaksızın gerçekleşen kontrol tahsisatları da (virüs kontrolleri) işlenmiştir. Bu tahsisatlar her iki yüklerin (temizlik ve kirlilik koşulları) altında icra edilmiştir.

Virüsleri inaktif hale getiren Bacobanın özelliklerini belirleyebilmek için seramikle kaplanan fayansa ve de kaplanmayan fayansa paralel olarak; 40 µL Virüs süspansiyonu, 10 µL yük özdeği ve 50 µL Agar-Agar ile çift tahsisatlı olarak kaplanmıştır.

Ek olarak önceden tanımlanan kontrollere ilişkin olarak deney tahsisatına uygun olan hücrelerin sadece hücre çevre kültürü ile donatıldığı hücre kontrolleri de yapılmıştır.

5.7 virüsü inaktif hale getiren etkinin hesaplanması ve değerlendirilmesi

Bacoban – seramikle kaplı – fayansı virüsleri inaktif hale getiren etkisinin değerlendirilmesi; seramik kaplı olmayan fayansla her zaman paralel olarak icra edilen tahsisata karşın hayvan atığı (çıkarma) hesaplamasıyla yapılmıştır. Bu fark redüksiyon faktörü (RF) olarak verilmektedir.

6. Sonuçlar

İnaktif hale getirme deneylerinin araştırılan sonuçları tablo 1 ile 3 arasında bulunmaktadır.

Önceki muhafaza ve nüfuz süresinden (0, 30 ve 60 dakika) bağımsız olarak kaplamalı olamayan seramik fayans üzerinde virüslerin redüksiyonun olmadığını üç tablo göstermektedir. Tasvir edilen virüstitle sadece bu tarz saptamalarda olağan dalgalanmayı gösterir.

Bu teşhise aykırı olarak seramik kaplı fayansın kontrolünde şekilsiz hayvan redüksiyonlarına rastlanılmıştır. Böylelikle 30 dakikalık nüfuz süresinden sonra temizlik koşulları altında (düşük yükleme) ileriki redüksiyon faktörleri (iki tespitin ortalama değeri) gösterilebiliyordu: 3,38 (üç günlük muhafaza süresi), 2,94 /5 günlük muhafaza süresi) ve $\geq 3,24$ (on günlük muhafaza süresi).

Kirli yükleme altında indirgenmiş hayvan redüksiyonlarına rastlanılmıştır: 2,82 (üç günlük muhafaza süresi), 2,68 (beş günlük muhafaza süresi) ve 1,31 \log_{10} -basamakları (on günlük muhafaza süresi).

60 dakika nüfuz süresinden sonraki ilgili redüksiyonlar temizlik koşulları altındaki tutarları; $\geq 4,62$ (üç günlük muhafaza süresi), $\geq 4,50$ (beş günlük muhafaza süresi) ve $\geq 4,40$ \log_{10} -basamakları (on günlük muhafaza süresi). Kirli koşullar altında şu redüksiyon faktörleri ölçülmüştür: 3,00 (üç günlük muhafaza süresi), $\geq 4,50$ (beş günlük muhafaza süresi) ve 3,55 (on günlük muhafaza süresi).

Böylece virüstitlelerin 60 dakikalık nüfuz süresi redüksiyonundan sonra kirlilik koşulları altında bu redüksiyon %99,9 dan daha fazla seyrederken, temizlik koşulları altında bu durum %99,99 dan daha fazla olarak çıkmıştır.

Dezenfeksiyon maddesi Bacoban ile seramik fayans kaplamanın kuş gribi virüsünün preslenerek virüs inaktif hale getirmek için 30 ve 60 dakikalık bir süreye ihtiyaç duyulduğunu ki burada kısa süreler kontrol edilmemiştir özet olarak formüle edilebilir. Seramik fayanslar on gün öncesinden oda sıcaklığında muhafaza edildiğinde de Bacoban etkililiği kendini göstermiştir.

İmza

Dr. J. Steinmann

MiroLab GmbH teknik bilgi müdürü