

PRACA POGLĄDOWA

# BADANIE AKTYWNOŚCI WIRUSOBÓJCZEJ ŚRODKÓW DEZYNFEKCYJNYCH STOSOWANYCH W OBSZARZE MEDYCZNYM

## EVALUATION OF VIRUCIDAL ACTIVITY OF DISINFECTANTS USED IN THE MEDICAL AREA

✉ AGNIESZKA TRZCIŃSKA<sup>✉</sup>

Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny



Agnieszka Trzcńska  
Zakład Wirusologii  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego  
– Państwowy Zakład Higieny  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa,  
Tel.: 22 542 12 30, Fax: 22 542 13 85,  
atrzcinska@pzh.gov.pl

Wpłynęło: 02.10.2019  
Zaakceptowano: 04.11.2019  
Opublikowano on-line: 09.12.2019

Cytowanie: Trzcńska A. Badanie aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych stosowanych w obszarze medycznym. Zakażenia XXI wieku 2019;2(5):241–248.

10.31350/zakazenia/2019/5/Z2019037

Copyright by MAVIPURO Polska Sp. z o.o., Warszawa, 2019. Wszystkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej publikacji nie może być powielana i rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie i w jakikolwiek sposób bez zgody wydawcy.

### STRESZCZENIE:

Proces dezynfekcji jest niezbędnym elementem zwalczania zakażeń wirusowych, a jego celem jest zapobieganie występowaniu zakażeń oraz ich szerzeniu się m.in. w placówkach medycznych. Zadaniem procesu dezynfekcji jest wyeliminowanie lub redukcja drobnoustrojów do takiego poziomu, by zdezynfekowany obiekt nie był źródłem zakażenia tymi drobnoustrojami. Aby osiągnąć pożądany wynik dezynfekcji, należy zastosować środek dezynfekcyjny spełniający szereg określonych kryteriów, w tym posiadać szeroki zakres aktywności obejmujący bakterie, grzyby, prątki, wirusy. Precyzyjne i rzetelne określenie zakresu aktywności wirusobójczej środka dezynfekcyjnego wymaga wyboru i zastosowania prawidłowej, dobrze zaprojektowanej metodyki badania. W artykule omówiono metodykę badań aktywności wirusobójczej produktów stosowanych w obszarze medycznym, zawartą w dostępnych obecnie normach fazy 2, etapu 1 oraz fazy 2, etapu 2.

**SŁOWA KLUCZOWE:** dezynfekcja, wirusy, badanie aktywności wirusobójczej

### ABSTRACT:

The disinfection process is an important element of eradication of viral infections. The purpose of disinfection is both to prevent the occurrence and spread of infections, among others in medical facilities. The task of the disinfection process is to eliminate or reduce microorganisms to such a level that the object that was subjected to disinfection is no longer a source of infection with these microorganisms. To achieve the desired result of the disinfection procedure, the disinfectant used must meet a number of specific criteria, including a wide range of activity including bacteria, fungi, mycobacteria, viruses. A precise and reliable determination of the range of the virucidal activity of the disinfectant is closely related to the selection of a correct, well-designed test methodology. The article discusses the methodology for testing the virucidal activity of products used in the medical field described in the currently available phase 2/step 1 and phase 2/step 2 standards.

**KEY WORDS:** disinfection, viruses, virucidal activity testing

## PROCES DEZYNFEKCJI

Proces dezynfekcji jest niezbędnym elementem zwalczania zakażeń wirusowych, a jego celem jest zapobieganie występowaniu zakażeń oraz ich szerszeniu się m.in. w placówkach medycznych, takich jak: szpitale, przychodnie, gabinety stomatologiczne itd. Według Centers for Disease Control (CDC) dezynfekcja to proces, który eliminuje większość lub wszystkie drobnoustroje chorobotwórcze, z wyjątkiem spor bakteryjnych, na obiektach nieożywionych w celu zapobiegania zakażeniu [1]. Zadaniem procesu dezynfekcji jest wyeliminowanie drobnoustrojów lub ich redukcja do takiego poziomu, by zdezynfekowany obiekt nie był źródłem zakażenia tymi drobnoustrojami. Dezynfekcja może być prowadzona różnymi metodami: fizyczną, termiczno-chemiczną, chemiczną. W procesie dezynfekcji chemicznej są używane związki chemiczne/substancje aktywne o różnych właściwościach i sposobach działania. Stosowane w obszarze medycznym środki dezynfekcyjne mogą zawierać jeden związek aktywny lub kilka związków w różnych konfiguracjach. Do substancji aktywnych najczęściej stosowanych w chemicznych środkach dezynfekcyjnych należą: alkohole (głównie alkohol etylowy, izopropylowy i n-propylowy), chlor i jego związki, formaldehyd, aldehyd glutarowy, nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy, jodofory, fenole, pochodne aminowe [2, 3, 4, 5].

Ponieważ dezynfekcja jest procesem złożonym, jej skuteczność zależy od wielu czynników [1, 6]:

- liczby drobnoustrojów w dezynfekowanym obszarze oraz ich wrażliwości na środki dezynfekcyjne; największą wrażliwością charakteryzują się wirusy osłonkowe a największą opornością priony, spory bakteryjne, oocysty pierwotniaków [7],
- stężenia środka dezynfekcyjnego oraz czasu kontaktu patogenu ze środkiem dezynfekcyjnym,
- obecności organicznych i nieorganicznych zanieczyszczeń lub biofilmu na dezynfekowanej powierzchni,
- warunków środowiska, w którym jest prowadzony proces dezynfekcji, to jest temperatury, pH, względnej wilgotności, twardości wody,
- budowy dezynfekowanego obiektu, zwłaszcza dostępu do skażonych powierzchni.

Aby osiągnąć pożądany wynik dezynfekcji, zastosowany środek dezynfekcyjny musi spełniać szereg określonych kryteriów. Cechy idealnego środka dezynfekcyjnego to m.in. [1, 5, 6, 8]:

- skuteczność w krótkim czasie kontaktu,
- trwałość, czyli stabilność chemiczna oraz niepalność,
- skuteczność w obecności obciążenia organicznego,
- brak toksyczności i negatywnego wpływu na środowisko oraz zapachu, nie do zaakceptowania przez użytkownika,

- kompatybilność materiałowa z dezynfekowanymi powierzchniami,
- szeroki zakres aktywności, obejmujący bakterie, grzyby, prątki, wirusy.

Wirusy stanowią dużą część wszystkich czynników zakaźnych opisanych jako patogeny człowieka, jak również dominują na listach patogenów odkrytych w ostatnich dekadach [7]. Właściwa dezynfekcja jest kluczowym elementem przerwania łańcucha zakażenia wirusowego, co zapobiega rozprzestrzenianiu się wielu wirusów w środowisku. Dlatego też aktywność środków dezynfekcyjnych o działaniu wirusobójczym powinna być potwierdzona odpowiednimi i wiarygodnymi metodami badawczymi.

## WYBÓR METODYKI BADANIA AKTYWNOŚCI WIRUSOBÓJCZEJ ŚRODKÓW DEZYNFEKCyjnych

Precyzyjne i rzetelne określenie zakresu aktywności wirusobójczej środka dezynfekcyjnego wymaga zastosowania prawidłowej metodyki badania, dobrze zaprojektowanej. Wybór niewłaściwej metodyki może skutkować błędnym określeniem parametrów działania danego produktu i prowadzić do braku eliminacji zakaźności wirusów w obszarze, który został poddany procesowi dezynfekcji.

W krajach Unii Europejskiej metody określania działania wirusobójczego (podobnie jak bakteriobójczego, grzybobójczego itd.) w różnych obszarach, np. medycznym, weterynaryjnym, spożywczym, zostały opisane w szeregu norm. Zgodnie z normami europejskimi w procedurze badania m. in. działania wirusobójczego środków dezynfekcyjnych jest stosowany model trójfazowy [9].

1. Badania fazy 1 są badaniami zawiesinowymi mającymi ustalić, czy substancja aktywna będąca składnikiem lub jednym ze składników środka dezynfekcyjnego wykazuje aktywność wirusobójczą w warunkach laboratoryjnych. Badania te nie są jeszcze podstawą do uznania danego produktu za środek dezynfekcyjny, musi on być poddany kolejnym badaniom fazy 2.
2. Badania fazy 2, etapu 1 są oparte na ilościowych metodach zawiesinowych. W metodach tych organizmy testowe są poddawane działaniu produktu w różnych stężeniach, czasach kontaktu, różnej temperaturze oraz w obecności substancji obciążającej. Badania te mają potwierdzić działanie produktu w warunkach laboratoryjnych zbliżonych do zamierzonego zastosowania.
3. Badania fazy 2, etapu 2 są oparte na metodach naśladujących warunki praktycznego użycia produktu (np. do dezynfekcji narzędzi, dezynfekcji powierzchni, higienicznej lub chirurgicznej dezynfekcji rąk).

4. Badania fazy 3 to badania przeprowadzane podczas użycia produktu w praktyce. Obecnie nie ma jeszcze norm dotyczących badań aktywności wirusobójczej tej fazy.

Ogólne wytyczne dotyczące doboru metody badania środka dezynfekcyjnego są podane w normie PN-EN 14885 [10], którą można uznać za normę-przewodnika. Jej najnowsza edycja pochodzi z 2019 roku. W normie tej zestawiono wszystkie opracowane do tej pory normy dotyczące badania chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych, uwzględniając takie informacje, jak obszar zastosowania, deklarowana aktywność przeciwdrobnoustrojowa produktu, zastosowanie produktu, warunki badania, wymagania dotyczące wyniku badania. Celem normy PN-EN 14885 przede wszystkim jest umożliwienie wytwórcom produktów wyboru odpowiednich norm, które będą zastosowane w celu potwierdzenia deklarowanych właściwości bójczych określonego produktu, np. aktywności wirusobójczej. Norma ta umożliwia również potencjalnym użytkownikom produktu ocenę informacji dostarczonych przez producenta w odniesieniu do planowanego zastosowania danego środka dezynfekcyjnego.

Środki dezynfekcyjne mogą być stosowane w różnych obszarach działania: medycznym, weterynaryjnym, spożywczym, przemysłowym, domowym oraz instytucjonalnym, a dla każdego z tych obszarów opracowano normy opisujące metodykę badania produktów przeznaczonych do użycia w tych obszarach.

Normy dla obszaru medycznego odnoszą się do chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych używanych w obszarach i sytuacjach, w których dezynfekcja i antyseptyka są wskazane ze względów medycznych. Takie wskazania występują w czasie opieki nad pacjentem [10]:

- w szpitalach, zakładach opieki medycznej i gabinetach dentystycznych,
- w przychodniach szkolnych, żłobkach i przedszkolach oraz domach opieki,
- mogą także występować w miejscu pracy i w domu,
- mogą również dotyczyć takich zakładów usługowych, jak pralnie i kuchnie, które dostarczają produkty bezpośrednio pacjentowi.

Do oceny aktywności wirusobójczej produktów stosowanych w obszarze medycznym obecnie (październik 2019 r.) jest dostępna jedna norma fazy 2, etapu 1 (PN-EN 14476 [11]) oraz dwie normy fazy 2, etapu 2 (PN-EN 16777 [12] oraz PN-EN 17111 [13]).

## NORMA PN-EN 14476

Norma PN-EN 14476 jest normą fazy 2, etapu 1, opisano w niej metodę zawiesinową, której zadaniem jest ustalenie, czy chemiczny środek dezynfekcyjny lub antyseptyczny ma działanie wirusobójcze w obszarze i sytuacjach opisanych

w zakresie niniejszej normy. Norma dotyczy obszaru medycznego, natomiast w Aneksie A do tej normy są podane przykłady wirusów zakażających organizm człowieka i mogących występować w wymienionym obszarze. Pierwsza edycja normy pochodzi z 2005 roku, a jej powstanie poprzedziły wieloletnie badania i dyskusje. Obecnie obowiązująca edycja z 2019 roku jest już siódma z kolei (tab. 1).

W normie PN-EN 14476 szczegółowo opisano metodę laboratoryjną badania aktywności wirusobójczej produktów, w tym wymaganą aparaturę, odczynniki, podłoża hodowlane, organizmy testowe, hodowle komórkowe. Przedstawiono również sposób określania cytotoksyczności produktu i jej eliminacji, a także sposób kalkulacji i weryfikacji wyników wraz z ich biometryczną oceną, jak również dokładne wytyczne do sporządzenia sprawozdania z badań.

Przedstawiona w normie metoda badania jest laboratoryjną metodą zawiesinową, w której próbka produktu jest dodawana do zawiesiny wirusa testowego w roztworze substancji obciążającej. Mieszanina do badania jest utrzymywana w jednej z temperatur i czasów kontaktu, zgodnie z wymaganiami normy. Po zakończeniu czasu kontaktu jest określone miano zakaźne wirusa testowego.

Zdolność badanego produktu do inaktywacji wirusa testowego jest określana na podstawie spadku jego miana zakaźnego. Jako kryterium wirusobójczego działania testowanego produktu wobec danego wirusa przyjmuje się spadek miana zakaźnego wirusa co najmniej o 4 log (różnica pomiędzy mianem zakaźnym wirusa w mieszaninie kontrolnej a mianem zakaźnym wirusa w mieszaninie do badania, zawierającej określone stężenie badanego produktu). Spadek miana zakaźnego wirusa o 4 log jest równoznaczny z utratą zakaźności na poziomie 99,99%.

W kolejnych edycjach normy PN-EN 14476 podstawowa zasada badania została zachowana, natomiast zmieniano wytyczne dotyczące warunków badania. W porównaniu z pierwszą edycją normy z 2005 roku (tab. 2) warunki badania w następnych edycjach uległy znacznemu poszerzeniu i uszczegółowieniu.

Poniżej zostały wymienione najistotniejsze zmiany, które wprowadzono w kolejnych edycjach normy, aż do obecnie obowiązującej.

Dla produktów przeznaczonych do higienicznej dezynfekcji rąk metodą wcierania i higienicznego mycia rąk oraz dla produktów do dezynfekcji powierzchni wprowadzono nowe zakresy badań o nazwach: ograniczony zakres działania wirusobójczego i działanie wirusobójcze na wirusy osłonkowe. Potwierdzenie w badaniach, że produkt ma ograniczony zakres aktywności wirusobójczej oznacza, że jest on aktywny wobec wszystkich wirusów osłonkowych oraz norowirusa, wirusa adeno i rotawirusa. Wykazywanie przez produkt działania wirusobójczego wobec wirusów osłonkowych oznacza, że działa on tylko na wszystkie wirusy osłonkowe.

**Tab. 1.** Wykaz wycofanych i aktualnych edycji norm dotyczących określania aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych ([www.pkn.pl](http://www.pkn.pl)).

Normy, faza 2, etap 1				
Lp.	Numer PN (EN)	Wersja	Tytuł	Status
1	PN-EN 14476:2005 (EN 14476:2005)	angielska	Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawieszinowa metoda określania wirusobójczego działania chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych stosowanych w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1)/Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1)	Wycofana
2	PN-EN 14476:2007 (EN 14476:2005+A1:2006)	angielska		Wycofana
3	PN-EN 14476+A1:2007 (EN 14476:2005+A1:2006)	polska		Wycofana
4	PN-EN 14476:2013-12 (EN 14476:2013)	angielska	Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawieszinowa metoda określania wirusobójczego działania w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1)/Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1)	Wycofana
5	PN-EN 14476+A1:2015-10 (EN 14476:2013+A1:2015)	angielska		Wycofana
6	PN-EN 14476+A1:2015-10 (EN 14476:2013+A1:2015)	polska		Wycofana
7	PN-EN 14476+A2:2019-08 (EN 14476:2013+A2:2019)	angielska		Aktualna
Normy, faza 2, etap 2				
Lp.	Numer PN (EN)	Wersja	Tytuł	Status
1	PN-EN 17111:2018-12 (EN 17111:2018)	angielska	Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa nośnikowa metoda określania działania wirusobójczego do narzędzi stosowanych w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 2)/Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 2)	Aktualna
2	PN-EN 16777:2019-01 (EN 16777:2018)	angielska	Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa powierzchniowa metoda określania wirusobójczego działania chemicznych środków dezynfekcyjnych stosowanych w obszarze medycznym na nieporowatych powierzchniach, bez działania mechanicznego – Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 2)/Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 2)	Aktualna

Wprowadzono nowe wirusowe modele testowe [14, 15] oraz zmieniono niektóre szczyty wirusowe dla istniejących modeli wirusów (tab. 3).

Rozdzielono wytyczne do badań produktów do dezynfekcji narzędzi i do badań produktów do dezynfekcji powierzchni.

Zmieniono niektóre obligatoryjne czasy kontaktu i temperatury badania, w tym określono czasy kontaktu dla produktów do dezynfekcji powierzchni. Czasy kontaktu dla tych produktów są wybierane na podstawie praktycznych warunków stosowania produktu. Rekomendowany czas kontaktu produktu jest określany przez producenta, który ponosi za to odpowiedzialność. Produkty przeznaczone do dezynfekcji powierzchni, z którymi może mieć kontakt pacjent i/lub personel medyczny, oraz powierzchni często dotykanych przez ludzi, co prowadzi do transmisji mikroorganizmów do pacjenta, powinny być badane w czasie kontaktu trwającego nie dłuższym niż 5 minut. Produkty do innych powierzchni niż wymienione powyżej mogą być badane w czasie kontaktu wynoszącym maksymalnie 60 minut.

Wprowadzono czyste i/lub brudne warunki badania dla wszystkich grup produktów.

Wprowadzono zmodyfikowaną metodę badania, umożliwiającą badanie preparatów gotowych do użycia w wyższym stężeniu (97% zamiast 80%), zbliżonym do stężenia stosowanego produktu. W przypadku wielu produktów gotowych do użycia umożliwia to uzyskanie pozytywnego wyniku badania aktywności wirusobójczej. Nie było to możliwe przy zastosowaniu metody standardowej, w której produkt gotowy do użycia w wyniku dodania do mieszaniny badawczej wirusa i substancji obciążającej ulegał rozcieńczeniu do 80% stężenia wyjściowego [16, 17].

Wprowadzono zasadę wstępnego rozcieńczania wodą produktów do higienicznego mycia rąk przed badaniem, aby naśladować dodanie wody kranowej w czasie realnego procesu mycia rąk.

Wprowadzono ocenę biometryczną otrzymanych wyników.

Zmieniono warunki wykonania testu referencyjnego inaktywacji wirusów, będącego jednym z elementów procesu weryfikacji przeprowadzonego badania oraz wprowadzono kryteria oceny otrzymanych wyników testu referencyjnego dla wszystkich stosowanych wirusów testowych.

Wprowadzono metodę LVP (ang. large volume plating method) do określania miana zakaźnego wirusów. Metoda

**Tab. 2.** Wytyczne dotyczące badania aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych, zawarte w pierwszej edycji normy PN-EN 14476:2005.

Warunki badania	Przeznaczenie środka dezynfekcyjnego		
	narzędzia i dezynfekcja powierzchni	higieniczne wcieranie w ręce i mycie rąk	dezynfekcja chemiczno-termiczna
Badany wirus	wirus polio i adeno	wirus polio i adeno	parwowirus
Temperatura badania	20±1°C	20±1°C	zgodnie z rekomendacją wytwórcy, ale nie więcej niż 60°C
Czas kontaktu: a) obligatoryjny b) dodatkowy	60 minut 5, 15, 30 minut	1 lub 0,5 minuty 3 minuty	zgodnie z rekomendacją wytwórcy, ale nie więcej niż 60 min –
Substancja obciążająca: warunki czyste i/lub warunki brudne	0,3 g/l BSA i/lub 3,0 g/l BSA + erytrocyty	PBS –	0,3 g/l BSA i/lub 3,0 g/l BSA + erytrocyty

BSA – albumina surowicy bydlęcej; PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna.

**Tab. 3.** Obligatoryjne modele wirusowe stosowane w badaniu aktywności wirusobójczej produktów w pierwszej (A) i najnowszej (B) edycji normy PN-EN 14476.

Norma	Modele wirusowe
(A) PN-EN 14476:2005	Wirus polio typ 1, szczep LSc 2ab (bezośtonkowy RNA wirus) Wirus adeno typ 5, szczep Adenoid 75 (bezośtonkowy DNA wirus) Bydlęcy parwowirus, szczep Haden (bezośtonkowy DNA wirus)
(B) PN-EN 14476+A2:2019-08	Bezośtonkowe RNA wirusy: – wirus polio typ 1, szczep LSc 2ab – mysi norowirus, szczep S99 Berlin Bezośtonkowe DNA wirusy: – wirus adeno typ 5, szczep Adenoid 75 – mysi parwowirus, drobny wirus mysi, szczep Crawford Ośtonkowy DNA wirus: – modyfikowany wirus krowianki, szczep Ankara lub wirus krowianki, szczep Elstree

LVP to jedna z trzech metod, które mogą być zastosowane, jeśli cytotoksyczność produktu jest tak duża, że nie można określić 4 log spadku miana wirusa testowego.

Zmiany w zakresie nazewnictwa, np. zastąpienie dezynfekcji termiczno-chemicznej określeniem dezynfekcja tekstyliów.

Szczegółowe wytyczne do badań produktów zgodnie z najnowszą edycją normy PN-EN 14476 przedstawiono w tabeli 4.

## NORMY FAZY 2, ETAPU 2 (PN-EN 16777 ORAZ PN-EN 17111)

W związku z coraz lepszym poznawaniem roli, jaką odgrywają zanieczyszczone powierzchnie środowiskowe w transmisji patogenów, zwiększyło się zainteresowanie skutecznymi metodami mycia i dezynfekcji tych powierzchni za pomocą środków o potwierdzonym szerokim zakresie aktywności [18]. Badania aktywności wirusobójczej oparte na metodzie zawieszinowej nie odzwierciedlają rzeczywistych warunków stosowania produktu. W praktyce wirusy znajdują się na przedmiotach i/lub powierzchniach roboczych, na których występuje obciążenie białkowe pochodzące z płynów ustrojowych człowieka, co może wpływać negatywnie na proces dezynfekcji. Aby mieć pewność, że produkty przeznaczone do dezynfekcji powierzchni

są zdolne do inaktywacji wirusów, należałoby je przebadać pod kątem działania wirusobójczego w warunkach jak najbardziej zbliżonych do rzeczywistych [19]. Prace laboratoryjne nad opracowaniem odpowiedniej metodyki dotyczyły m.in. wyboru wirusowych modeli testowych, które charakteryzowałyby się wystarczającą stabilnością podczas procesu suszenia, oraz określenia warunków badania (czasu kontaktu, temperatury itd.), najlepiej odpowiadających potrzebom obszaru medycznego [19, 20]; w rezultacie prowadzone prace doprowadziły do powstania nowej normy europejskiej. Norma PN-EN 16777 [12] dotyczy produktów używanych w obszarze medycznym do dezynfekcji nieporowatych powierzchni, w tym powierzchni urządzeń medycznych bez działania mechanicznego. Opisuje ona powierzchniową metodę badania, której celem jest ustalenie, czy produkt przeznaczony do stosowania jako środek dezynfekcyjny w obszarze medycznym wykazuje aktywność wirusobójczą na nieporowatych powierzchniach. Badanie ściśle naśladuje praktyczne zastosowanie produktu, a wybrane warunki badania (czas kontaktu, temperatura, organizmy na powierzchni itp.) odpowiadają parametrom występującym w sytuacjach praktycznych, w tym mogącym wpływać na działanie środka dezynfekcyjnego.

Jako powierzchnie testowe stosuje się krążki ze stali nierdzewnej o grubości 1,2 mm lub 1,5 mm, na nie jest



**Tab. 4.** Wytyczne dotyczące badania aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych, zawarte w najnowszej edycji normy PN-EN 14476 +A2:2019-08 [11].

Warunki badania	Higieniczna dezynfekcja rąk metodą wcierania i higieniczne mycie rąk	Dezynfekcja narzędzi	Dezynfekcja powierzchni	Dezynfekcja tekstyliów
Minimalny zakres organizmów testowych	Pełny zakres aktywności wirusobójczej: – wirus polio – wirus adeno – mysi norowirus  Ograniczony zakres aktywności wirusobójczej <sup>a</sup> : – wirus adeno – mysi norowirus  Wirusobójczy wobec wirusów ostonkowych <sup>b</sup> : – wirus krowianki	Pełny zakres aktywności wirusobójczej: – wirus polio – wirus adeno – mysi norowirus  Kiedy temperatura wynosi 40°C lub więcej: tylko parwowirus	Pełny zakres aktywności wirusobójczej: – wirus polio – wirus adeno – mysi norowirus  Ograniczony zakres aktywności wirusobójczej <sup>a</sup> : – wirus adeno – mysi norowirus  Wirusobójczy wobec wirusów ostonkowych <sup>b</sup> : – wirus krowianki	Parwowirus
Dodatkowe	Inny istotny organizm testowy			
Temperatura badania	Zgodnie z rekomendacją producenta, ale w/pomiędzy: 20°C	20–70°C	4–30°C	30–70°C
Czas kontaktu	Zgodnie z rekomendacją producenta			
	ale pomiędzy 30 a 120 sekund	ale nie dłuższy niż 60 minut	ale nie dłuższy niż 5 lub 60 minut <sup>c</sup>	ale nie dłuższy niż 20 minut
Substancja obciążająca				
warunki czyste	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej (higieniczne wcieranie w ręce) <sup>d</sup>	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej	–
warunki brudne	3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów (higieniczne mycie rąk) <sup>e</sup>	i/lub 3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów	i/lub 3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów	3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów
Dodatkowe warunki	czyste lub brudne <sup>d,e</sup> , inna istotna substancja	inna istotna substancja	inna istotna substancja	inna istotna substancja

a – badanie dla ograniczonego zakresu aktywności wirusobójczej obejmie wszystkie wirusy ostonkowe (patrz Annex A normy) oraz norowirusa, wirusa adeno i rotawirusa; b – badanie dla aktywności wirusobójczej wobec wirusów ostonkowych obejmie wszystkie wirusy ostonkowe (patrz Annex A normy); c – czasy kontaktu dla produktów do dezynfekcji powierzchni, umieszczone w tej tabeli, są wybrane na podstawie warunków praktycznych zastosowania produktu. Szczegółowe wytyczne znajdują się w normie; d – preparaty do higienicznego wcierania w ręce powinny być badane jako minimum w warunkach czystych; e – preparaty do higienicznego mycia rąk powinny być badane jako minimum w warunkach brudnych.

**Tab. 5.** Wytyczne dotyczące badania aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych do dezynfekcji powierzchni, zawarte w normie PN-EN 16777:2019-01 (faza 2, etap 2) [12].

a – wirus polio (stosowany w metodzie zawiesinowej) nie może być stosowany do badań na powierzchni z powodu problemów z suszeniem; b – Badanie dotyczące ograniczonego zakresu aktywności wirusobójczej obejmie wszystkie wirusy ostonkowe (patrz Annex A normy) oraz norowirusa, wirusa adeno i rotawirusa; c – Badanie dotyczące aktywności wirusobójczej wobec wirusów ostonkowych obejmie wszystkie wirusy ostonkowe (patrz Annex A normy); d – Czasy kontaktu dla produktów do dezynfekcji powierzchni, umieszczone w tej tabeli, są wybrane na podstawie warunków praktycznych zastosowania produktu. Szczegółowe wytyczne znajdują się w normie.

Minimalny zakres organizmów testowych	Pełny zakres aktywności wirusobójczej <sup>a</sup> – wirus adeno typ 5, szczep Adenoid 75 – mysi norowirus, szczep S99 Berlin Ograniczony zakres aktywności wirusobójczej <sup>b</sup> – wirus adeno typ 5, szczep Adenoid 75 – mysi norowirus, szczep S99 Berlin Wirusobójczy wobec wirusów ostonkowych <sup>c</sup> – wirus krowianki, modyfikowany szczep Ankara lub szczep El-stree
Temperatura badania	18–25°C
Dodatkowa temperatura	4–30°C
Czas kontaktu	Zgodnie z rekomendacją producenta, ale nie dłuższy niż 5 lub 60 minut <sup>d</sup>
Substancja obciążająca	
warunki czyste	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej i / lub
warunki brudne	3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów
Dodatkowe warunki	Inne czasy kontaktu, substancja obciążająca, wirusy

**Tab. 6.** Wytyczne dotyczące badania aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych do dezynfekcji narzędzi, zawarte w normie PN-EN 17111:2018-12 (faza 2, etap 2) [13].

Warunki badania	Aktywność wirusobójcza wobec wirusów osłonkowych <sup>a</sup> (produkty do wstępnego czyszczenia w połączeniu ze środkiem czyszczącym/dezynfekującym)	Aktywność wirusobójcza <sup>b</sup> (dezynfekcja narzędzi, jeśli temperatura < 40°C)	Aktywność wirusobójcza (dezynfekcja narzędzi, jeśli temperatura jest ≥ 40°C)
Minimalny zakres organizmów testowych	wirus krowianki, modyfikowany szczep Ankara lub szczep Elstree	wirus adeno typ 5, szczep Adenoid 75 mysi norowirus, szczep S99 Berlin	mysi parwowirus, szczep Crawford
Dodatkowe	Inny istotny organizm testowy		
Temperatura badania	Zgodnie z rekomendacją producenta, ale w/pomiędzy: 20°C	20 a <40°C	≥40 a 70°C
Czas kontaktu	zgodnie z rekomendacją producenta, ale nie dłuższy niż 60 minut	60 minut	60 minut
Substancja obciążająca:			
warunki czyste	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej i/lub	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej i/lub	0,3 g/l roztwór albuminy bydlęcej i/lub
warunki brudne	3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów	3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów	3,0 g/l roztwór albuminy bydlęcej plus 3,0 ml/l erytrocytów
Dodatkowe warunki	Inna istotna substancja obciążająca		

a – badanie dla aktywności wirusobójczej wobec wirusów osłonkowych obejmie wszystkie wirusy osłonkowe (patrz Annex A normy); b – wirus polio (stosowany w metodzie zawieszinowej) nie może być stosowany do badań na powierzchni z powodu problemów z suszeniem. Aby stwierdzić, że produkt wykazuje aktywność wirusobójczą, produkt musi spełnić pozytywnie wymagania normy EN 14476 z wirusem polio, adeno i mysim norowirusem.

nanoszona zawiesina wirusowa w roztworze substancji obciążającej. Po wysuszeniu krążki pokrywa się warstwą badanego produktu lub wodą (krążki kontrolne). Po określonym czasie kontaktu wirus jest odzyskiwany z krążków, następnie określa się jego miano zakaźne oraz oblicza redukcję miana wirusa inkubowanego z produktem w odniesieniu do wyniku kontroli. Redukcja miana zakaźnego wirusa, wymagana do uzyskania pozytywnego wyniku, wynosi 4 log. Szczegółowe wytyczne dotyczące procesu badania przedstawiono w tabeli 5.

Wymagania dotyczące aktywności wirusobójczej środków przeznaczonych do dezynfekcji powierzchni [12]:

- aby stwierdzić aktywność wirusobójczą wobec wirusów osłonkowych, produkt musi spełniać wymagania zarówno normy PN-EN 14476, jak i normy PN-EN 16777 w badaniu z wirusem krowianki,
- aby potwierdzić, że produkt ma ograniczony zakres aktywności wirusobójczej, musi on z pozytywnym skutkiem przejść badania z wirusem adeno i mysim norowirusem, opisane zarówno w normie PN-EN 14476, jak i w normie PN-EN 16777,
- aby stwierdzić, że produkt cechuje się pełną aktywnością wirusobójczą, musi on spełniać wymagania normy PN-EN 14476 w badaniu z wirusem polio, wirusem adeno i mysim norowirusem oraz normy PN-EN 16777 w badaniu z wirusem adeno i mysim norowirusem, ponieważ wirus polio nie jest odporny na suszenie i nie można go zastosować w badaniu z krążkami.

Kolejna metoda nośnikowa, której metodyka naśladuje praktyczne warunki zastosowania produktu, to norma PN-EN 17111 [13]. Dotyczy ona produktów używanych w obszarze medycznym do dezynfekcji narzędzi przez zanurzenie i opisuje badanie nośnikowe, którego celem jest ustalenie, czy środek chemiczny do dezynfekcji narzędzi ma działanie wirusobójcze. Badanie laboratoryjne ściśle naśladuje warunki praktycznego stosowania produktu, w tym etap wstępnego suszenia wirusa na nośniku, czas kontaktu, temperaturę, organizmy testowe i substancję obciążającą, to znaczy warunki, które mogą wpływać na działanie chemicznych środków dezynfekujących w praktyce.

Jako narzędzie testowe stosuje się nośniki ze szkła matowego o wymiarach 15×60×1 mm z jedną powierzchnią piaskową, na nie jest nanoszona zawiesina wirusa testowego w roztworze substancji obciążającej. Po wysuszeniu nośnik zanurza się w roztworze produktu lub w wodzie (kontrola), następnie inkubuje w jednej z temperatur i czasów kontaktu, określonych w wymaganiach normy (tab. 6). Po zakończeniu się czasu kontaktu wirus jest odzyskiwany z nośnika, po czym określa się jego miano zakaźne oraz redukcję miana wirusa inkubowanego z produktem w odniesieniu do wyniku kontroli. Wymagana redukcja miana zakaźnego wirusa, konieczna do uzyskania pozytywnego wyniku, wynosi 4 log. Wirus polio (stosowany w metodzie zawieszinowej) nie może być stosowany do badań z użyciem nośnika z powodu problemów z suszeniem. Aby stwierdzić, że produkt wykazuje aktywność wirusobójczą, musi on spełniać

wymagania normy PN-EN 14476 w badaniu z wirusem polio, adeno i mysim norowirusem oraz normy PN-EN 17111 z wirusem adeno i mysim norowirusem. Badania z wykorzystaniem metodyki obu norm, przeprowadzone dla kwasu nadoctowego (PAA) użytego do dezynfekcji narzędzi, opisał m.in. Becker i wsp. [21].

## DALSZE KIERUNKI BADAŃ

W przygotowaniu jest kolejna norma fazy 2, etapu 2 – prEN 17430 „Chemical disinfectants and antiseptics – Hygienic handrub virucidal – Test method and requirements (phase 2, step 2)”. Norma ta opisuje metodę badania i wymagania dla produktów przeznaczonych do higienicznej, wirusobójczej dezynfekcji rąk metodą wcierania. Liczne badania wykazały, że istnieje ścisły związek pomiędzy właściwą higieną rąk a zmniejszeniem się zarówno częstości zakażeń szpitalnych, jak i odsetka chorób zakaźnych w społeczeństwie. Właściwa higiena rąk to narzędzie skutecznie ograniczające rozprzestrzenianie się wirusów w środowisku wskutek przerwania łańcucha transmisji [22]. Dlatego jest istotne, aby środki stosowane do higieny rąk były jak najlepiej scharakteryzowane pod kątem aktywności.

Trwają również końcowe prace nad normą FprEN 17272 „Chemical disinfectants and antiseptics – Methods of airborne room disinfection by automated process – Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and phagocidal activities”. Norma ta dotyczy metody dezynfekcji pomieszczeń drogą powietrzną z wykorzystaniem zautomatyzowanych procesów i opisuje m.in. badanie działania wirusobójczego. Inny kierunek prac nad metodyką badań aktywności wirusobójczej to na przykład opracowywanie metody badań skuteczności chusteczek do dezynfekcji powierzchni [23].

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

## PIŚMIENICTWO

- Rutala WA, Weber DJ; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. CDC, 2008, update: May 2019 ([www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/](http://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/)).
- Eggers M. Infectious disease management and control with povidone iodine. *Infect Dis Ther* 2019;8(4):581–593. doi:10.1007/s40121-019-00260-x
- Kampf G. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *J Hosp Infect* 2018;98(4):331–338. doi:10.1016/j.jhin.2017.08.025
- Rutala WA, Weber DJ. Disinfection and sterilization: an overview. *Am J Infect Control* 2013;4(Suppl. 5):S2–S5. doi:10.1016/j.ajic.2012.11.005
- Rutala WA, Weber DJ. Selection of the ideal disinfectant. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014;35(7):855–865. doi:10.1086/676877.
- World Health Organization and Pan American Health Organization. Decontamination and reprocessing of medical devices for health-care facilities, 2016. (dostęp 10.2019) [www.who.int/infection-prevention/publications/decontamination/en/](http://www.who.int/infection-prevention/publications/decontamination/en/).
- Sattar SA. Hierarchy of susceptibility of viruses to environmental surface disinfectants: a predictor of activity against new and emerging viral pathogens. *J AOAC Int* 2007;90(6):1655–1658.
- Trzcińska A. Dezynfekcja przeciwwirusowa w obszarze medycznym. *Post Mikrobiol* 2019;58(1):101–110. doi:10.21307/PM-2019.58.1101
- Röhm-Rodowald E, Jakimiak B. Podstawa doboru preparatów dezynfekcyjnych – ocena ich skuteczności działania (dostęp 10.2019) [sterylizacja.org.pl/Dobor\\_preparatow\\_dezynfekcyjnych\\_Ewa\\_Rodowald.pdf](http://sterylizacja.org.pl/Dobor_preparatow_dezynfekcyjnych_Ewa_Rodowald.pdf)).
- PN-EN 14885:2019-01 (wersja angielska) Chemical disinfectants and antiseptics – Application of European standards for chemical disinfectants and antiseptics; (wersja polska) Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Zastosowanie norm europejskich dotyczących chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych.
- PN-EN 14476+A2:2019-08 (wersja angielska) Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area – Test method and requirements (phase 2/step 1); (wersja polska) Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawieszynowa metoda określania wirusobójczego działania w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (faza 2/etap 1).
- PN-EN 16777:2019-01 (wersja angielska) Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area – Test method and requirements (phase 2/step 2); (wersja polska) Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa powierzchniowa metoda określania wirusobójczego działania chemicznych środków dezynfekcyjnych stosowanych w obszarze medycznym na nieporowatych powierzchniach, bez działania mechanicznego – Metoda badania i wymagania (faza 2/etap 2).
- PN-EN 17111:2018-12 (wersja angielska) Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 2); (wersja polska) Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa nośnikowa metoda określania działania wirusobójczego do narzędzi stosowanych w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 2).
- Rabenau HF, Rapp I, Steinmann J. Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants? *BMC Infect Dis* 2010;10:185. doi:10.1186/1471-2334-10-185
- Verheust C, Goossens M, Pauwels K i wsp. Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine* 2012;30(16):2623–2632. doi:10.1016/j.vaccine.2012.02.016.
- Siddharta A, Pfaender S, Vielle NJ i wsp. Virucidal activity of World Health Organization-recommended formulations against enveloped viruses, including Zika, Ebola and emerging Coronaviruses. *J Infect Dis* 2017;215(6):902–906. doi:10.1093/infdis/jix046.
- Steinmann J, Becker B, Bischoff B i wsp. Virucidal activity of Formulation I of the World Health Organization's alcohol-based handrubs: impact of changes in key ingredient levels and test parameters. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013;2(1):34. doi:10.1186/2047-2994-2-34.
- Boyce JM. Alcohols as surface disinfectants in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018;39(3):323–328. doi:10.1017/ice.2017.301.
- Rabenau HF, Steinmann J, Rapp I i wsp. Evaluation of a virucidal quantitative carrier test for surface disinfectants. *PLoS One* 2014;9(1):e86128. doi:10.1371/journal.pone.0086128.
- Ionidis G, Hübscher J, Jack T i wsp. Development and virucidal activity of a novel alcohol-based hand disinfectant supplemented with urea and citric acid. *BMC Infect Dis* 2016;16:77. doi:10.1186/s12879-016-1410-9
- Becker B, Brill FHH, Todt D i wsp. Virucidal efficacy of peracetic acid for instrument disinfection. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017;6:114. doi:10.1186/s13756-017-0271-3
- Eggers M, Koburger-Janssen T, Ward LS i wsp. Bactericidal and virucidal activity of povidone-iodine and chlorhexidine gluconate cleansers in an in vivo hand hygiene clinical simulation study. *Infect Dis Ther* 2018;7(2):235–247. doi:10.1007/s40121-018-0202-5.
- Becker B, Henningsen L, Paulmann D i wsp. Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8:121. doi:10.1186/s13756-019-0569-4.