

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

—試験報告書—

試験番号：207361N

株式会社  食環境衛生研究所

〒379-2107

群馬県前橋市荒口町561-21

Tel027-230-3411

Fax027-230-3412

KIỂM TRA HIỆU LỰC VÔ HIỆU HÓA CỦA VẬT LIỆU THỬ NGHIỆM  
CHỐNG LẠI VIRUT

- BÁO CÁO THỬ NGHIỆM CHỐNG LẠI VIRUT -

Số thử nghiệm: 207361N

SONG NGŨ

Cty TNHH Viện nghiên cứu vệ sinh môi trường thực phẩm

379-2107

561-21 Thành phố Meabashi, Quận Gunma

ĐT: 027-230-3411

Fax: 027-230-3412

1. 表題

試験資材のウイルスに対する不活化効果試験

2. 試験番号

No.207361N

3. 目的

資材と豚コロナウイルス（PEDV）を反応させた時のウイルス不活化効果を確認するために実施した。

4. 試験管理組織

試験依頼者の名称及び所在地

名称 セパレータシステム工業株式会社

所在地 〒354-0043 埼玉県入間郡三芳町竹間沢 326-12

実施機関の名称、所在地及びその長の氏名

名称 株式会社 食環境衛生研究所

所在地 群馬県前橋市荒口町 561-21

氏名 代表取締役 久保 一弘

試験実施責任者の氏名

松本 彰平

試験担当者の氏名

近藤 実紀

5. 試験スケジュール

試験受託日 2020年8月31日

試験開始日 2020年11月11日

試験終了日 2020年12月25日

6. 試験資材

バイオイオナース

※試験資材は原液で使用した。また、対照資材として滅菌リン酸緩衝液を使用した。

1. Tiêu đề

Thử nghiệm vô hiệu hóa các vật liệu thử nghiệm chống lại vi rút

2. Số đăng ký

Số 207361N

3. Mục đích

Nghiên cứu được thực hiện để xác nhận tác dụng bất hoạt của vi rút khi vật liệu phản ứng với vi rút coronavirus ở lợn (PEDV).

4. Tổ chức quản lý thử nghiệm

❖ Tên và địa chỉ của khách hàng thử nghiệm

- Tên: Sevalator System Industry Co.,Ltd

- Địa điểm: 326-12 Chikumazawa, Miyoshi-cho, Iruma-gun, Saitama 354-0043, Nhật Bản

❖ Tên, địa điểm của tổ chức thực hiện và tên người đứng đầu Tên cơ quan.

- Tên: Cty TNHH Viện nghiên cứu vệ sinh môi trường thực phẩm

- Địa điểm: 561-21 Arakuchimachi, thành phố Maebashi, Quận Gunma.

- Giám đốc đại diện: **Kazuhiro Kubo**

- Tên người chịu trách nhiệm tiến hành thử nghiệm: **Shohei Matsumoto**

- Tên người phụ trách thử nghiệm: **Miki Kondo**

5. Lịch kiểm tra

Ngày hợp đồng thử nghiệm 31 tháng 8 năm 2020

Ngày bắt đầu thử nghiệm 11 tháng 11 năm 2020

Ngày kết thúc thử nghiệm 25 tháng 12 năm 2020

6. Vật liệu thử nghiệm

KAMISAMA

Các vật liệu thử nghiệm được sử dụng không pha loãng. Đệm phosphat vô trùng được sử dụng như một chất trung hòa.

## 7. 供試微生物

PED ウイルス : Porcine epidemic diarrhea virus P-5V 株

※豚感染性のコロナウイルス

培養細胞 : vero 細胞 (アフリカミドリザルの腎臓上皮由来株化細胞)

## 8. 区の設定

区	処置	感作時間
対照区	リン酸緩衝液 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 0 分、1 分
試験区	試験資材 1mL にウイルス液 0.1mL 添加	試験開始後 1 分

## 9. 試験方法

「ウイルス実験学 総論 改訂二版 丸善株式会社 ウイルス中和試験法」を参考として実施した。

## 10. 試験手順

## ①予備試験 :

試験に先立って、試験資材が培養細胞に与える影響 (細胞毒性) を調査した。

試験資材をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈した後、培養細胞に接種し、培養後の細胞の正常な状態を示す最高濃度を確認し、試験に使用するウイルス濃度を決定した。その結果、細胞毒性について、試験資材 10000 倍液において細胞の発育不良が確認された。このため、試験に際しては、試験資材とウイルス液の混合液を 10000 倍以上希釈した後細胞に接種する必要があると判明した。また、ウイルス添加濃度は  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL 以上とした。

## ②本試験・試験液混合 :

試験区分に従い、試験資材及びリン酸緩衝液の各 1mL をそれぞれ分取し、予備試験で決定した濃度にウイルス液を添加した。

ウイルス液添加後、混合液として室温 (25℃) にて所定の時間静置した。

## ③本試験・細胞接種及び菌数測定 :

試験区分ごとに感作が終了した混合液をそれぞれ 10 倍段階希釈し、96well プレートに培養した細胞に 100μL ずつ接種した。

判定は、37℃、炭酸ガス培養 (5%) で 5 日間培養した後、培養細胞を顕微鏡観察し、培養細胞に現れる CPE (細胞変性) をもってウイルス増殖の有無を確認し、その濃度を算出した。

## 7. Kiểm tra vi sinh vật

Virus PED: Virus tiêu chảy dịch lợn chủng P-5V

\* Virus coronavirus lây nhiễm ở lợn

Tế bào nuôi cấy: tế bào vero (dòng tế bào có nguồn gốc từ biểu mô thận khỉ xanh Châu Phi)

## 8. Thiết lập thử nghiệm

Mẫu thử nghiệm	Tiến hành	Thời gian tiếp xúc
Mẫu trắng	Thêm 0,1 ml dung dịch virut vào 1ml đệm phosphat	1 phút
Mẫu thử	Thêm 0,1 ml dung dịch virut vào 1 ml mẫu thử nghiệm	1 phút

## 9. Phương pháp kiểm tra

Thử nghiệm được tiến hành theo "Phương pháp Thử nghiệm Trung hòa Vi rút của Tập đoàn Maruzen, Phiên bản thứ hai của Lý thuyết Chung về Thí nghiệm Vi rút, Đã sửa đổi".

## 10. Quy trình kiểm tra

## (1) Kiểm tra sơ bộ:

Trước khi thử nghiệm, ảnh hưởng của mẫu thử nghiệm lên tế bào nuôi cấy (độc tính tế bào) đã được khảo sát.

Sau khi pha loãng 10 lần mẫu thử với dung dịch đệm phosphat, các tế bào nuôi cấy được cấy vào và nồng độ cao nhất mà tế bào ở trạng thái bình thường sau khi nuôi cấy được xác nhận để xác định nồng độ vi rút được sử dụng trong thử nghiệm. Kết quả là, sự suy giảm sự phát triển của tế bào đã được xác nhận trong dung dịch pha loãng 1000 lần của mẫu thử nghiệm liên quan đến độc tính tế bào. Do đó, người ta thấy rằng cần phải pha loãng hỗn hợp mẫu thử nghiệm và dung dịch vi rút hơn 10.000 lần trước khi cấy tế bào. Nồng độ vi rút được thêm vào phải là  $10^6$  TCID<sub>50</sub> / mL hoặc cao hơn.

## (2) Hỗn hợp dung dịch thử nghiệm và thử nghiệm chính:

Một mL của mỗi mẫu thử nghiệm và dung dịch đệm phosphat được trích dẫn tùy theo loại thử nghiệm, và dung dịch virut được thêm vào nồng độ đã xác định trong thử nghiệm sơ bộ.

Sau khi thêm dung dịch virut, hỗn hợp được để ở nhiệt độ phòng (25 ° C) trong một thời gian xác định.

## (3) Xét nghiệm chính, cấy tế bào và đếm vi khuẩn.

Hỗn hợp này được pha loãng 10 lần và cấy vào 100μL các tế bào được nuôi cấy trong các giếng 96 WELL.

Sau 5 ngày ở 37 ° C với 5% khí carbon dioxide, các tế bào nuôi cấy được quan sát dưới kính hiển vi, xác nhận sự hiện diện hay không có sự tăng sinh của virut bằng CPE (sự thoái hóa tế bào) xuất hiện trên các tế bào nuôi cấy, và tính toán nồng độ.

11. 結果

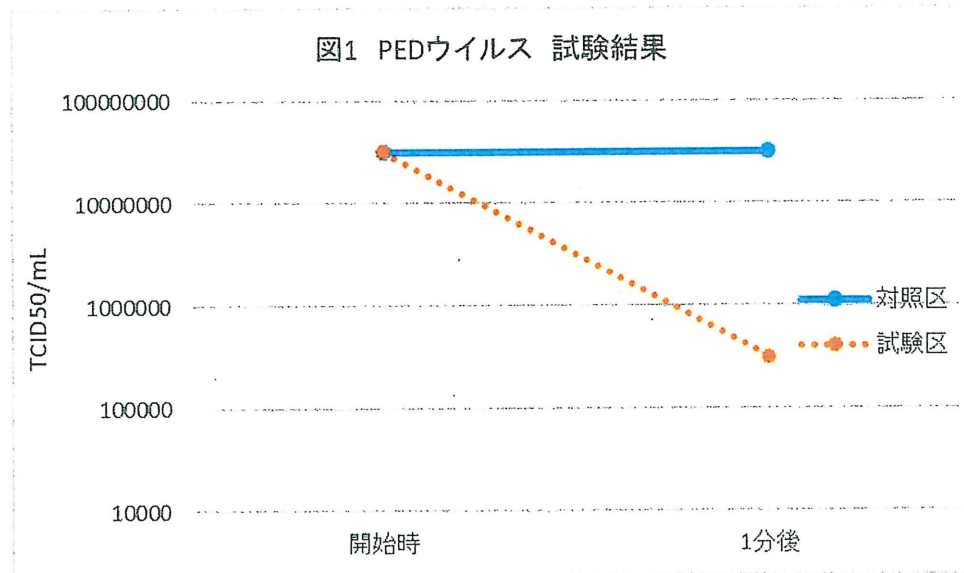
PED ウイルスに対する試験結果を表 1 及び図 1 に示した。

対照区では試験開始後から、試験開始後 1 分までの間にウイルス量の変化は見られなかった( $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL)。

試験区では開始後 1 分で $<10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL (検出限界未満 : 99.0%以上減少) となった。

表 1 PED ウイルス試験結果(TCID<sub>50</sub>/mL)

区	試験開始時	開始後 1 分
対照区	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$ (32000000)
試験区		$<10^{5.5}$ ( $<320000$ )



11. Kết quả

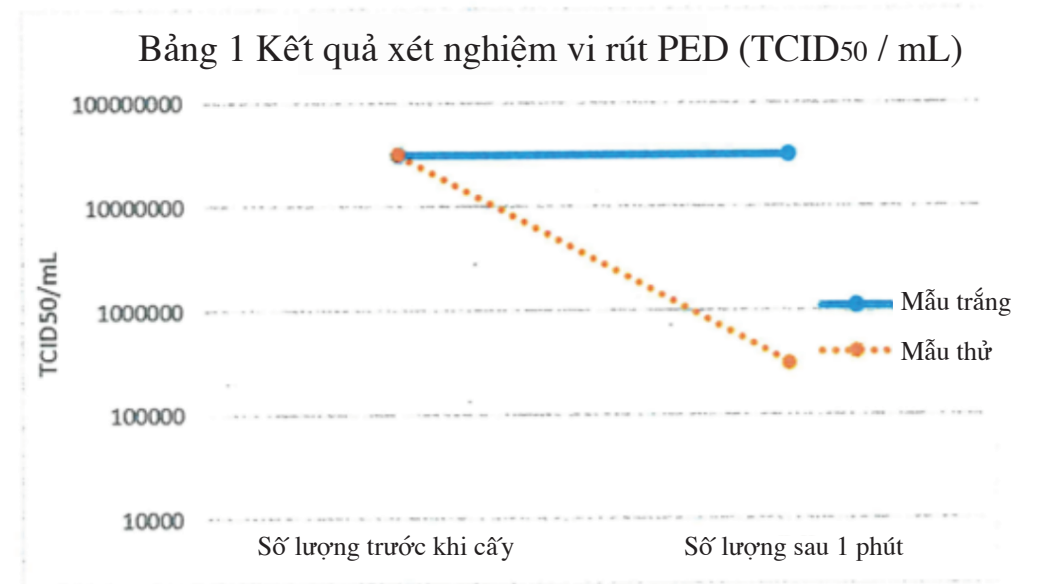
Kết quả của thử nghiệm chống lại vi rút PED được thể hiện trong Bảng 1 và Hình 1.

Trong mẫu trắng, không có sự thay đổi về lượng virus ( $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> / ml) từ khi bắt đầu thử nghiệm đến 1 phút sau khi bắt đầu thử nghiệm.

Trong mẫu thử nghiệm, số lượng virus là  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> / mL (dưới giới hạn phát hiện: giảm > 99,0%) vào 1 phút sau khi bắt đầu thử nghiệm.

Bảng 1 Kết quả xét nghiệm vi rút PED (TCID<sub>50</sub> / mL)

Mẫu thử nghiệm	Số lượng trước khi cấy	Số lượng sau 1 phút
Mẫu trắng	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$ (32000000)
Mẫu thử		$<10^{5.5}$ ( $<320000$ )



12. 考察

今回、試験資材の PED ウイルス (豚感染コロナウイルス) に対する不活化効果試験を実施した。

その結果、1 分の接触で、PED ウイルスに対し 99.0%以上の不活化効果があることが判明した。

12. **Cân nhắc**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thử nghiệm tác dụng bất hoạt đối với virus PED (coronavirus lây nhiễm ở lợn) của mẫu thử.

Kết quả là người ta thấy rằng hiệu quả bất hoạt đối với virus PED là hơn **99,0%** sau 1 phút tiếp xúc.