

Số: 162/CD-VR

V/v: Báo cáo thử nghiệm chất sát
trùng Greenscept

Hà Nội, ngày 12 tháng 8 năm 2020

**BÁO CÁO PHÂN TÍCH KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG CỦA
CHẤT SÁT TRÙNG GREENSCEPT
ĐỐI VỚI VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI**

1. Nội dung:

Đánh giá tác dụng của chất sát trùng GREENSCEPT, sản xuất và phân phối bởi Công ty TNHH Công nghệ sinh học Tenabio Việt Đức (TENABIO LLC), trong việc tiêu diệt virus gây bệnh Dịch tả lợn Châu Phi để áp dụng trong phòng chống dịch bệnh. Chất sát trùng sử dụng ở nồng độ 100 ppm với thời gian tiếp xúc 5 phút, 15 phút; 30 phút và tỷ lệ thể tích tiếp xúc 5 phần sát trùng/ 1 phần virus.

2. Nguyên vật liệu:

- Chất sát trùng GREENSCEPT với nồng độ 100 ppm. Thành phần chính của chất sát trùng là HClO.
- Tế bào PAM (Tế bào đại thực bào phổi lợn).
- Hỗn dịch chứa virus gây bệnh Dịch tả lợn Châu Phi có nồng độ virus đạt 10^5 HAD₅₀/ml.

3. Phương pháp thử nghiệm:

- Chất sát trùng thử nghiệm được cung cấp ở nồng độ 100 ppm
- Trộn dung dịch sát trùng với hỗn dịch virus ASF theo tỷ lệ thể tích 5 phần dung dịch sát trùng/1 phần hỗn dịch virus (ví dụ: 500 ul dung dịch sát trùng / 100 ul hỗn dịch virus), cho tác dụng trong thời gian 5 phút, 15 phút và 30 phút rồi chuyển toàn bộ vào giếng nuôi tế bào PAM (Đã có sẵn 1.4 ml MEM). Nồng độ chất sát trùng khi tiếp xúc với virus ASF là 100 ppm và khi tiếp xúc với tế bào PAM là 25 ppm.
- Bổ sung hồng cầu lợn theo quy trình thực hiện phản ứng HAD (hấp phụ hồng cầu lợn).
- Nuôi cấy tế bào trong 7 ngày tiếp theo ở 37°C trong tủ ẩm CO₂. Kiểm tra đĩa nuôi hàng ngày để phát hiện HAD trong các giếng.
- Thu hoạch dịch nuôi ngay sau khi gây nhiễm và ngày thứ 7 sau gây nhiễm để xét nghiệm định lượng virus ASF bằng Realtime PCR.

4. Tiêu chí đánh giá:

- Đánh giá khả năng nhân lên của virus sau khi chịu tác dụng của chất sát trùng ở các nồng độ trong các khoảng thời gian thông qua việc xuất hiện bệnh tích đặc trưng (HAD – hấp phụ hồng cầu)

- Đánh giá tác dụng của chất sát trùng qua so sánh nồng độ DNA của virus trong giếng trước và sau khi nuôi cấy (phản ứng Realtime PCR xác chắn).

5. Kết quả thử nghiệm.

a. Tác động của chất sát trùng lên tế bào PAM:

Sau 7 ngày nuôi cấy, tế bào PAM và tế bào hồng cầu trong các giếng đối chứng có chất sát trùng vẫn ở trạng thái bình thường. Điều này cho thấy chất sát trùng ở nồng độ 25 ppm khi tiếp xúc với tế bào không làm ảnh hưởng đến tế bào.

b. Tác động của chất sát trùng lên sự phát triển của virus ASF:

Bảng 1: Kết quả nuôi cấy tế bào:

	Tiếp xúc 5 phút	Tiếp xúc 15 phút	Tiếp xúc 30 phút
ST + VR	Âm tính	Âm tính	Âm tính
Đối chứng ST	TB bình thường	TB bình thường	TB bình thường
Đối chứng VR	Dương tính		

(ST = chất sát trùng; VR = virus)

- Sau 7 ngày nuôi cấy, các giếng chứa hỗn hợp chất sát trùng – virus không xuất hiện bệnh tích tế bào đặc trưng của virus Dịch tả lợn Châu Phi. Trong khi giếng đối chứng virus có bệnh tích hấp phụ hồng cầu đặc trưng, chứng tỏ virus nhân lên tốt trong các giếng không có chất sát trùng.

Bảng 2: Kết quả định lượng virus bằng Realtime PCR:

	Tiếp xúc 5 phút	Tiếp xúc 15 phút	Tiếp xúc 30 phút
ST+VR ngày 0	26.85	27.00	27.46
ST+VR ngày 7	32.47	31.31	33.12
Đối chứng VR ngày 0	26.98		
Đối chứng VR ngày 7	18.94		


(ST = chất sát trùng; VR = virus)

- Kết quả định lượng virus ASF bằng phản ứng Realtime PCR cho thấy ở ngày 0 (ngày sau khi nhiễm virus) giá trị Ct của các mẫu hỗn hợp sát trùng – virus tương đương với mẫu virus đối chứng ở cùng thời điểm. Điều này chứng tỏ chất sát trùng không có tác dụng phá hủy DNA của virus ASF.
- Sau 7 ngày nuôi cấy, hàm lượng DNA trong các giếng sát trùng – virus không tăng lên mà còn giảm đi (giá trị Ct trong khoảng 31 – 33), cho thấy virus không thể nhân lên được trong các giếng này. Trong khi đó, giá trị Ct của mẫu đối chứng virus giảm xuống còn 18.94, tức là lượng virus đã tăng lên khoảng 2^8 lần so với ban đầu.
- So sánh giữa các khoảng thời gian tiếp xúc, giá trị Ct tương đương nhau ở cả 2 thời điểm lấy mẫu. Điều này cho thấy chất sát trùng có khả năng vô hoạt virus ở mức độ như nhau khi tiếp xúc với virus trong 5 phút, 15 phút

hoặc 30 phút. Hay nói cách khác, 5 phút là thời gian tiếp xúc tối thiểu để chất sát trùng có thể vô hoạt virus ASF.

6. Kết luận:

- Chất sát trùng Greenscept có khả năng vô hoạt virus ASF khi sử dụng ở nồng độ 100 ppm với tỷ lệ tiếp xúc 5 phần sát trùng / 1 phần virus.
- Chất sát trùng Greenscept không gây ảnh hưởng lên tế bào PAM và tế bào hồng cầu lợn khi tiếp xúc với các loại tế bào này ở nồng độ 25 ppm.
- Chất sát trùng Greenscept có thể vô hoạt virus ASF trong thời gian tiếp xúc tối thiểu là 5 phút.
- Chất sát trùng Greenscept không thể hiện khả năng phá hủy DNA của virus ASF.

QUYÊN GIÁM ĐỐC

Ngô Văn Bắc


BỘ NÔNG NGHIỆP
TR. CH

CỤC THỦ Y
TRUNG TÂM CHẨN ĐOÁN
THỦ Y TRUNG ƯƠNG

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: 508/CD-XN

Hà Nội, ngày 12 tháng 8 năm 2020

S201662A

PHIẾU TRẢ LỜI KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM
(Kết quả chỉ có giá trị với mẫu xét nghiệm)

Kính gửi: Công ty TNHH Công nghệ sinh học Tenabio Việt Đức

I. Thông tin chung:

- Loại mẫu: Dung dịch chất sát trùng; Dịch nuôi tế bào
- Số lượng mẫu: 10 mẫu làm Realtime PCR; 10 mẫu phân lập virus
- Loại bệnh phẩm: Dung dịch chất sát trùng; Dịch nuôi tế bào
- Loại vaccin đã dùng:
- Ngày lấy mẫu: 03 – 10/8/2020
- Ngày nhận mẫu: 03 – 10/8/2020
- Nơi gửi mẫu: Công ty TNHH Công nghệ sinh học Tenabio Việt Đức
- Nơi lấy mẫu: Trung tâm lấy mẫu
- Tình trạng bệnh phẩm: Đạt yêu cầu xét nghiệm

II. Chỉ tiêu và phương pháp xét nghiệm:

- Chỉ tiêu xét nghiệm: Phân lập virus (10 mẫu); Phát hiện virus ASF (10 mẫu)
- Phương pháp xét nghiệm: Phân lập virus trên tế bào; Phát hiện virus ASF bằng phương pháp Realtime PCR
- Ngày xét nghiệm: 03 - 10/8/2020

KẾT QUẢ

(4.1.1) Phát hiện virus ASF bằng phương pháp Realtime PCR: Dương tính 10/10 mẫu xét nghiệm

(4.1.18): Phân lập virus ASF trên tế bào: Dương tính 03/10 mẫu xét nghiệm

III. Kết luận: (Chi tiết xem Báo cáo phân tích kết quả đính kèm)

Nơi nhận:

- Như trên;
- Lưu TH.

Q. GIÁM ĐỐC



Q. GIÁM ĐỐC

Ngô Văn Bắc

Trụ sở chính: Thôn Tân Trung Chùa - xã Hiền Ninh - Sóc Sơn - Hà Nội. Tel: 0243.2012.481

Văn phòng giao dịch: Số 11-Ngõ 78-Giải Phóng-Đống Đa-Hà - Nội. Tel: (024) 38686083

Hotline: 0866650255; Fax: (024) 3868 6813; Email: tiepnhanmau@gmail.com hoặc benhlykysinhrung@gmail.com

**NATIONAL CENTER FOR
VETERINARY DIAGNOSIS**

No. : 162 /CD-VR

Ref.: *Efficacy of disinfectant on
ASF virus.*

SOCIAL REPUBLIC OF VIETNAM

Independence – Freedom - Happiness

Ha Noi, August 2020

**REPORT ON EFFICACY TEST OF GREENSCEPT DISINFECTANT
AGAINST AFRICAN SWINE FEVER VIRUS**

1. Content:

- Evaluation of the disinfectant efficacy (named as GREENSCEPT) in inactivating African Swine Fever Virus for application in disease prevention. Disinfectants used at concentration of 100 ppm.
- Evaluation of the efficacy of disinfectant when exposed to virus for 5 minutes, 15 minutes and 30 minutes at 25°C. The treated mixture followed the volumetric ratio of 5 part of disinfection and 1 part of virus suspension.

2. Materials:

- Disinfectants manufactured and distributed by Viet Duc Tenabio Biotechnology Co. Ltd (TENABIO LLC), using at the concentration of 100 ppm. Main active ingredient of disinfectant is *Hypochlorous acid* (HClO)
- PAM cell (Porcine alveolar macrophages).
- The ASF virus suspension which was titrated at 10^5 HAD₅₀/ml.

3. Test methods:

- The disinfectant were used at the concentration of 100 ppm when exposure to ASF virus..
- ASF virus suspension was treated with the volumetric ratio of 5 part of disinfection solution and 1 part of virus suspension (500 ul and 100 ul, respectively), kept for exposure in different periods of 5 minutes; 15 minutes and 30 minutes at 25°C and then transferred all to PAM culture well-plate (with 1.4 ml MEM in well). The final concentration of disinfectant when exposed to PAM was 25 ppm.
- Pig red blood cells suspension was added to cells following HAD (Heamadsorption) procedure.
- Cell culture for next 7 days at 37°C in 5% CO₂ incubator. Check the culture plate daily for HAD in wells.
- Harvest MEM in wells at Day 0 (immediately after inoculation) and Day 7 to quantify the amount of ASF virus by Realtime PCR.

4. Evaluation criteria:

- Evaluation of the viral multiplying after being treated by the disinfectants as in protocol, through the appearance of specific cytopathic effects (HAD - Hemadsorption).
- Evaluation the effect of disinfectants by comparing the DNA concentration of ASF virus before and after culture (Realtime PCR method).

5. Test results:

a. The effect of disinfectant on PAM cells:

After 7 days of culture, in the well of disinfectant control, PAM and pig RBCs were normally. There was no phenomenon of abnormal dead cells or morphological changes due to the activeness of disinfectant. It meant that Greenscept disinfectant did not affect to cell culture when exposure with the final concentration of 25 ppm.

b. The effect of disinfectant on the ASF virus replication:

Table 1: Results of cell culture:

Result of cell culture	5 mins of exposure	15 mins of exposure	30 mins of exposure
Disinfectant + Virus	HAD negative	HAD negative	HAD negative
Disinfectant control	Cells grew normally	Cells grew normally	Cells grew normally
Virus control	HAD positive		

- After 7 days of incubation, no HAD was observed in wells which inoculated by treated virus, indicating that the virus did not replicate after exposure with the disinfectant. While the virus control (without treatment) formed the specific cytopathic effects of multiplied ASF virus.

Table 2: Results of virus quantitation by Realtime PCR:

Results of quantitative Realtime PCR (Ct value)	5 mins of exposure	15 mins of exposure	30 mins of exposure
Disinfectant + Virus (Day 0)	26.85	27.00	27.46
Disinfectant + Virus (Day 7)	32.47	31.31	33.12
Virus control (Day 0)	26.98		
Virus control (Day 7)	18.94		

- The result of virus quantitative by Realtime PCR showed that: At Day 0 (immediately after inoculation), the Ct value of the mixtures of virus – disinfectant was equivalent to the Ct value of virus control. This suggested that the disinfectant may not decompose the DNA of the virus. At 7 days after inoculation, the amount of viral DNA in disinfectant – virus wells did not increase (Ct values in range of 31-33). This demonstrated that the virus did not replicate in wells with disinfectant. In comparison to virus control, Ct value was 18.94, meant that the amount of virus increased about 2^8 times.

GHIE,
TRUNG T
HAN D
THU Y
NG UONG
THU Y

- Disinfection exposure time of 5 minutes or 15 minutes or 30 minutes gave the same results. That meant the minimum exposure time was 5 minutes (in this test) for disinfectant to inactivate the virus.

6. Conclusions:

- Greenscept disinfectant (used at 100 ppm) could inactivate ASF virus when mixed with the volumetric ratio of 5 part of disinfectant solution and 1 part of virus suspension.
- The disinfectant could not give the effectiveness to PAMs and pig RBCs when exposed to cells at final concentration of 25 ppm.
- The minimum exposure time (in this test) for disinfectant to inactivate the ASF virus was 5 minutes. The results were similar when the exposure time increased to 15 minutes or 30 minutes.
- The disinfectant could not decompose DNA of ASF virus.

DIRECTOR



Ngo Van Bac

