

Metode Uji Standar untuk Menentukan Efektivitas Eliminasi Virus pada Agen *Handwash* dan *Handrub* higienis Menggunakan Ujung Jari Orang Dewasa

Standard Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults

(ASTM E1838-17, IDT)



Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
1 Ruang Lingkup.....	2
2 Acuan normatif.....	4
3 Istilah dan Definisi.....	4
4 Ringkasan metode uji.....	6
5 Signifikansi dan Penggunaan.....	6
6 Peralatan dan Perlengkapan.....	8
7 Reagen dan bahan	8
8 Pengujian Virus dan Kultur sel	12
9 Subjek.....	12
10 Prosedur	12
11 Pengulangan dan Evaluasi Statistik	18
12 Presisi dan Bias	18
13 Kata kunci.....	18
Lampiran_(Informasi tidak wajib)	20
Bibliografi.....	22

Prakata

SNI 8893:2024, *Metode Uji Standar untuk Menentukan Efektivitas Eliminasi Virus pada Agen Handwash dan Handrub higienis Menggunakan Ujung Jari Orang Dewasa*, merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ASTM E1838-17, *Standard Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults*, dengan metode adopsi terjemahan dua bahasa dan ditetapkan oleh BSN pada tahun 2024.

Standar ini menggantikan SNI 8893:2020, *Metode Uji Standar untuk Menentukan Efektivitas Eliminasi Virus pada Agen Handwash dan Handrub higienis Menggunakan Ujung Jari Orang Dewasa*, yang disusun dengan metode adopsi *republication-reprint* dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2020.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 11-11, Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 29 April 2024 di Jakarta, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. SNI ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 14 Juni 2024 sampai dengan 28 Juni 2024 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya, yaitu ASTM E1838-17, dan/atau dokumen terkait lain yang menyertainya.

Untuk menghindari kesalahan dalam penggunaan Standar ini, disarankan bagi pengguna standar menggunakan dokumen SNI yang dicetak dengan tinta berwarna (dapat mencantumkan kode tingkat warna Red Green Blue (RGB), atau kode tingkat warna Cyan Magenta Yellow Black (CMYK), atau kode tingkat warna lain jika diperlukan untuk cetak gambar dengan warna yang lebih akurat).”

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

“Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.”

Pendahuluan

Tangan memberikan peran penting dalam penyebaran banyak virus. Dengan demikian, menjaga kebersihan tangan yang tepat dan teratur sangat penting dalam mencegah penyebaran virus, terutama di tempat perawatan kesehatan, pusat penitipan anak, dan tempat penanganan makanan. Banyak virus yang diketahui menyebar melalui tangan yang terkontaminasi dapat tetap menular selama beberapa jam di tangan manusia, dan juga mungkin lebih resisten daripada bakteri yang umum digunakan untuk mengevaluasi aktivitas mikrobisida agen *handwash* dan *handrub* (**1, 2, 3, 4**).¹ Tangan yang terkontaminasi juga dapat dengan mudah mentransfer virus infeksius ke permukaan lain (**1, 2, 3**). Antiseptik tangan telah terbukti menghambat penyebaran infeksi virus (**5, 6, 7, 8, 9**). Metode pengujian ini adalah untuk menilai potensi eliminasi virus dari agen *handwash* dan *handrub in vivo*.

¹ Angka yang dicetak tebal dalam tanda kurung mengacu pada daftar referensi di akhir standar ini.

INTRODUCTION

Hands play an important role in the spread of many viruses. Thus, proper and regular hand hygiene is crucial in preventing such spread, particularly in health-care settings, day-care centers, and food-handling establishments. Many viruses that are known to spread through contaminated hands can remain infectious for several hours on human hands, and also may be more resistant than the bacteria commonly used to evaluate the microbicidal activity of handwash and handrub agents (1, 2, 3, 4).¹ Contaminated hands also can readily transfer infectious virus to other surfaces (1, 2, 3). Hand antisepsis has been shown to interrupt the spread of viral infections (5, 6, 7, 8, 9). This test method is to assess the virus-eliminating potential of handwash and handrub agents *in vivo*.

¹ The boldface numbers in parentheses refer to the list of references at the end of this standard.

“Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.”

Metode Uji Standar untuk Menentukan Efektivitas Eliminasi Virus pada Agen *Handwash* dan *Handrub* Higienis Menggunakan Ujung Jari Orang Dewasa²⁾

1 Ruang Lingkup

1.1 Kulit manusia tidak diketahui membawa virus sebagai bagian dari mikrobiota residennya kecuali virus papiloma (10). Namun, tangan yang terkontaminasi virus dapat menjadi sumber penyebaran berbagai jenis infeksi virus. Kebersihan tangan dimaksudkan untuk mengurangi jumlah virus dan mikroorganisme lainnya di tangan, sehingga dapat mengurangi risiko penularan penyakit. Pengurangan jumlah virus mungkin disebabkan oleh kombinasi inaktivasi virus dan penghilangan virus infeksius dari kulit secara mekanis.

1.2 Metode uji ini didesain untuk menentukan perbandingan efektivitas eliminasi virus dari formulasi mikrobisida dan non-mikrobisida. Metode pengujian ini tidak dimaksudkan digunakan pada *hand scrubs* untuk bedah atau preparat kulit sebelum operasi.

CATATAN 1 Metode pengujian ini sebaiknya dilakukan oleh orang yang sudah terlatih dalam virologi, di fasilitas yang didesain dan sudah dilengkapi untuk bekerja dengan agen infeksius pada *biosafety* level 2 (11).

1.3 Nilai-nilai yang dinyatakan dalam satuan SI dianggap sebagai standar. Tidak ada satuan pengukuran lain yang digunakan dalam standar ini.

1.4 Standar ini tidak ditujukan untuk menangani semua masalah terkait keamanan yang berhubungan dengan penggunaannya. Pengguna standar ini bertanggung jawab untuk menetapkan praktik keselamatan dan kesehatan yang sesuai dan menentukan batasan regulasi yang dapat diterapkan sebelum digunakan.

1.5 Standar ini dikembangkan sesuai dengan prinsip-prinsip yang diakui secara internasional tentang standardisasi yang ditetapkan, dalam prinsip Pengembangan Standar Internasional, Panduan dan Rekomendasi yang dikeluarkan oleh Komite Hambatan Teknis Perdagangan Organisasi Perdagangan Dunia (*World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee*).

²⁾ Metode pengujian ini berada di bawah yurisdiksi Komite ASTM E35 tentang Pestisida, antimikroba, dan Agen Pengendalian Alternatif dan merupakan tanggung jawab langsung Sub-komite E35.15 tentang Agen Antimikroba. Edisi ini disetujui pada 1 April 2017. Diterbitkan Juni 2017. Awalnya disetujui pada 1996. Edisi sebelumnya terakhir disetujui pada 2010 sebagai E1828 - 10, DOI: 10.1520 / E1838-17.

Standard Test Method for Determining the Virus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults²

1. Scope

1.1 Human skin is not known to carry viruses as a part of its resident microbiota, with the notable exception of papilloma viruses (10). Hands transiently contaminated with viruses can, however, act as vehicles for the spread of many types of viral infections. Hand hygiene is meant to reduce the load of viruses and other transient microorganisms on hands, thereby reducing the risk of disease transmission. Such reductions in the virus load may be due to a combination of virus inactivation and mechanical removal of infectious virus from the skin.

1.2 This test method is designed to determine the comparative virus-eliminating effectiveness of microbicidal or non microbicidal formulations. This test method is not meant for use with surgical hand scrubs or preoperative skin preps.

NOTE 1—The test method should be performed by persons with training in virology in facilities designed and equipped for work with infectious agents at biosafety level 2 (11).

1.3 The values stated in SI units are to be regarded as standard. No other units of measurement are included in this standard.

1.4 This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.

1.5 This international standard was developed in accordance with internationally recognized principles on standardization established in the Decision on Principles for the Development of International Standards, Guides and Recommendations issued by the World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee.

²⁾ This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee E35 on Pesticides, Antimicrobials, and Alternative Control Agents and is the direct responsibility of Subcommittee E35.15 on Antimicrobial Agents.
Current edition approved April 1, 2017. Published June 2017. Originally approved in 1996. Last previous

2 Acuan normatif

2.1 Standar ASTM:³⁾

E2011, *Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand*

E2276, *Test Method for Determining the Bacteria Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults*

E2613, *Test Method for Determining Fungus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using Fingerpads of Adults*

3 Istilah dan Definisi

3.1 Definisi Istilah Spesifik dalam Standar ini:

3.1.1 Personel layanan Kesehatan, petugas kesehatan yang berkaitan langsung dengan penyedia layanan kesehatan. Termasuk petugas yang dibayar dan tidak dibayar pada layanan kesehatan, seperti dokter, perawat, asisten perawat, terapis, teknisi, personel layanan darurat medis, personel dental, farmasis, personel laboratorium, personel otopsi, pelajar, peserta pelatihan, dan pegawai kontrak, dll., yang berpotensi terpapar pasien dan materi infeksius.

3.1.2 agen *handwash* higienis (untuk personel layanan kesehatan), bahan yang umumnya digunakan untuk mencuci tangan personel di rumah sakit, fasilitas layanan kesehatan lain, pusat penitipan anak, panti jompo, dan tempat penanganan makanan sebaiknya aman untuk digunakan berulang kali, tidak menimbulkan iritasi, beraksi cepat dan efisien dalam menghilangkan mikroorganisme pada permukaan kulit.

3.1.3 sabun non medis, sabun atau detergen yang lembut di kulit, tidak mengandung bahan kimia mikrobisida.

3.1.4 beban tanah (organik), larutan satu atau lebih bahan organik dan / atau anorganik yang ditambahkan ke suspensi organisme uji untuk mensimulasikan adanya sekresi tubuh, ekskresi, atau bahan asing lainnya.

3.1.5 agen eliminasi virus (membunuh / menghilangkan), setiap agen yang membersihkan tangan yang mengandung virus dengan cara membunuh virus yang ada di permukaan kulit atau melepaskannya saat pembersihan berikutnya.

3.1.6 agen inaktivasi virus, setiap agen yang tidak menimbulkan penularan virus.

³⁾ Untuk standar ASTM yang dirujuk, kunjungi situs ASTM, www.astm.org. Atau hubungi Layanan Pelanggan ASTM di service@astm.org. Untuk informasi terbitan Buku Tahunan standar ASTM, lihat halaman Ringkasan Dokumen standar di situs ASTM.

2. Referenced Documents

2.1 ASTM Standards:³⁾

E2011 Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand

E2276 Test Method for Determining the Bacteria Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using the Fingerpads of Adults

E2613 Test Method for Determining Fungus-Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents Using Fingerpads of Adults

3. Terminology

3.1 Definitions of Terms Specific to This Standard:

3.1.1 Health-care personnel (HCP), n—persons who are directly related to provision of health care services. It includes all paid and unpaid persons working in health-care settings, such as physicians, nurses, nursing assistants, therapists, technicians, emergency medical service personnel, dental personnel, pharmacists, laboratory personnel, autopsy personnel, students, trainees, and contractual staff, etc., who have the potential to get themselves exposed to patients and infectious materials.

3.1.2 hygienic (health-care personnel) handwash agents, n—agents generally used for handwashing by personnel in hospitals, other health-care facilities, day-care centers, nursing homes, and food-handling establishments should be safe for repeated use, nonirritating, fast-acting, and efficient in eliminating transient microorganisms from intact skin.

3.1.3 nonmedicated soap, n—a soap or detergent that is mild to the skin and does not contain any microbicidal chemicals.

3.1.4 soil(organic) load, n—a solution of one or more organic and/or inorganic substances added to the suspension of the test organism to simulate the presence of body secretions, excretions or other extraneous substances.

3.1.5 virus-eliminating (killing/removing) agent, n—any agent that rids hands of viruses by either killing them on the skin or by dislodging them for subsequent wash-off.

3.1.6 virus inactivating agent, n—any agent that renders a virus noninfectious.

³⁾ For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, www.astm.org, or contact ASTM Customer Service at service@astm.org. For Annual Book of ASTM Standards volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

4 Ringkasan metode uji

4.1 Metode pengujian ini dilakukan pada sekelompok subjek dewasa, yang telah memberikan persetujuan dengan kriteria kulit tangan bebas dari kerusakan kulit. Subjek dilarang menggunakan produk apa pun yang mengandung agen antimikroba setidaknya selama satu minggu sebelum pengujian. Volume suspensi virus uji yang diketahui ditempatkan pada area yang diberi batas pada setiap jari dan inokulum dibiarkan mengering. Area yang terkontaminasi kemudian dipaparkan ke agen yang diuji atau agen kontrol atau agen pembawa (*vehicle*) (misalnya, air sadah standar), lalu air digosok dengan telapak tangan dan jari secara acak dari tangan yang berlawanan, ditunggu beberapa waktu. Virus yang tetap berada di jari tangan dielus dan eluatnya dititras untuk virus infeksius bersama kontrol yang diperlukan. Unit infeksius dari dua ujung ibu jari atau sepasang ujung jari yang terlibat dalam penanganan tunggal akan dirata-ratakan. Persentase atau reduksi log₁₀, atau keduanya, pada level virus infeksius setelah penanganan dengan agen uji atau kontrol ditentukan. Jika dua formulasi berbeda dibandingkan dalam pengujian yang sama, salah satunya dapat ditetapkan sebagai acuan. Jika diinginkan, salah satunya juga dapat menggunakan air keran secara paralel dengan kontrol air sadah untuk menentukan pengaruh kesadahan air pada aktivitas eliminasi virus dari produk uji.

5 Signifikansi dan Penggunaan

5.1 Prosedur *in vivo* ini dirancang untuk menguji kemampuan agen *handwash* dan *handrub* higienis untuk mengurangi tingkat virus infeksius tertentu dari ujung jari orang dewasa yang terkontaminasi secara eksperimental. Karena dua ujung ibu jari dan delapan ujung jari dapat terkontaminasi dengan virus dan digunakan dalam tes tertentu, hal ini memungkinkan penggabungan kontrol masukan inokulum basah, kontrol pemulihan virus yang dikeringkan, dan hingga tiga ulangan untuk menilai efisiensi reduksi virus dari agen pengujian atau pengontrol, agen pembawa. Tidak lebih dari 100 µL suspensi virus diperlukan untuk menyelesaikan satu uji.

5.2 Metode pengujian ini didesain untuk dilakukan oleh petugas terlatih, yang bertanggung jawab untuk menentukan sistem inang yang sesuai untuk virus uji, dan menerapkan teknik pengujian dan pemeliharaan inang dan sampel induk virus. Untuk teks acuan, lihat Lennette et al (12).

5.3 Jika metode yang dijelaskan di sini berkaitan dengan pengujian dengan virus yang berasal dari manusia, metode ini dapat dengan mudah disesuaikan untuk bekerja dengan virus patogen hewan serta bakteriofag. Metode standar untuk pengujian standar dengan bakteri (Metode Uji E2276) dan jamur (Metode Uji E2613) juga tersedia.

5.4 Mikroorganisme infeksius yang tertinggal di tangan setelah pencucian dapat dikurangi dengan mengeringkan tangan yang telah dicuci dengan kertas, kain, atau udara hangat (13). Oleh karena itu, langkah untuk mengeringkan telapak tangan dan jari setelah terpapar produk kontrol atau uji, tidak disertakan agar proses penghilangan virus dapat terjadi melalui proses pengeringan secara alamiah atau kering sendiri.

5.5 Metode uji ini tidak dimaksudkan untuk digunakan dengan *hand scrub* suntuk bedah atau preparat kulit sebelum operasi.

5.6 Tingkat virus yang dapat hidup dalam inokula kering pada telapak tangan dan jari sebagai kontrol tidak boleh kurang dari 10⁴ unit infeksius, yang akan memungkinkan deteksi hingga 4 log₁₀ pengurangan tingkat infeksi virus oleh produk uji dalam kondisi pengujian dengan cara metode ini.

4. Summary of Test Method

4.1 This test method is conducted on a group of adult subjects who have provided informed consent and the skin of whose hands has been determined to be free from any apparent damage. The subjects are to refrain from using any products containing antimicrobial agents for at least one week prior to the test. A known volume of the test virus suspension is placed on a demarcated area on each fingerpad and the inoculum allowed to dry. The contaminated area then is exposed to test or control agent or a vehicle (for example, standard hard water), and rubbed with a randomly chosen fingerpad from the opposite hand for the desired contact time. Virus remaining on the fingerpads is then eluted and the eluates titrated for infectious virus along with the required controls. The infectious units from the two thumbpads or the pair of the fingerpads that were involved in a single treatment will be averaged. Percent or log₁₀ reductions, or both, in the levels of infectious virus after treatment with the test or control agents are then determined. If two different formulations are being compared in the same test, one of them may be designated as a reference. If desired, one also may use tap water in parallel with the hard water control to determine the influence of water hardness on the test product's virus-eliminating activity.

5. Significance and Use

5.1 This in vivo procedure is designed to test the ability of hygienic handwash and handrub agents to reduce levels of selected infectious viruses from experimentally contaminated fingerpads of adults. Since the two thumbpads and all eight fingerpads can be contaminated with virus and used in a given test, it allows for the incorporation of a wet inoculum input control, dried virus recovery control, and up to three replicates to assess the virus-eliminating efficiency of a test or control agent, or a vehicle material. No more than 100 µL of the virus suspension are required to complete one test.

5.2 This test method is designed to be performed by a trained individual, who is responsible for choosing the appropriate host system for the test virus and applying the techniques necessary for propagation and maintenance of host and test virus. For a reference text, refer to Lennette et al (12).

5.3 Whereas the method described here relates to testing with viruses of human origin, it can be readily adapted to work with animal pathogenic viruses as well as bacteriophages. Standard methods for working with bacteria (Test Method E2276) and fungi (Test Method E2613) are also available.

5.4 Infectious microorganisms left on hands after washing can be reduced further by drying the washed hands with paper, cloth, or warm air (13). A step for the drying of fingerpads after exposure to the control or test product, therefore, has not been included to avoid virus removal by the drying process itself.

5.5 This test method is not meant for use with surgical hand scrubs or preoperative skin preps.

5.6 The level of viable virus in the dried inocula the control fingerpads should not be less than 10⁴ infectious units which would permit the detection of up to a 4 log₁₀ reduction in the infectivity titer of the virus by the test product under the conditions of this test method.

6 Peralatan dan Perlengkapan

6.1 *Laminar Flow Cabinet – Biological safety cabinet class II* diperlukan untuk pengujian virus. Prosedur untuk perawatan yang tepat dan penggunaan cabinet semacam itu diberikan di Referensi (11).

6.2 *Inkubator* — Inkubator pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ diperlukan untuk menumbuhkan sel inang dan untuk inkubasi kultur yang terinfeksi virus. Jika sistem terbuka digunakan untuk kultur sel, diperlukan inkubator CO_2 .

6.3 *Pipet pemindahan positif* - pipet dan ujung pipet harus dapat secara akurat menentukan volume yang tepat 10- μL .

6.4 *Sterilizer* – setiap alat sterilisasi uap yang sesuai untuk memproses media kultur sel dan reagen dapat digunakan. Uap yang disuplai ke alat sterilisasi harus bebas dari aditif yang beracun bagi kultur sel.

6.5 *Sistem Sterilisasi Filter* — Sistem filtrasi membran atau kartrid (diameter pori 0,22 μm) dipersyaratkan untuk mensterilkan media dan larutan yang sensitif terhadap panas.

6.6 *Lemari pembeku* — *lemari pembeku* pada suhu $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ diperlukan untuk penyimpanan serum biakan janin sapi dan aditif lainnya untuk media kultur sel. Freezer dengan suhu -70°C atau lebih rendah diperlukan untuk menyimpan virus.

6.7 *Lemari pendingin* — lemari pendingin dengan suhu $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ untuk penyimpanan media kultur sel dan reagen.

6.8 *Timer* - setiap *stopwatch* yang dapat digunakan untuk membaca dalam menit dan detik.

6.9 *Wastafel* - wastafel dengan ukuran yang cukup untuk memungkinkan, untuk melakukan cuci tangan tanpa menyentuh tangan ke permukaan wastafel.

6.9.1 Keran Air, ditempatkan di atas bak cuci dengan ketinggian yang memungkinkan, tangan dipegang lebih tinggi dari siku selama pencucian. Keran dengan sensor elektronik atau yang dioperasikan dengan pergelangan tangan, siku, lutut, atau kaki leboh disukai untuk menghindari kontaminasi ulang pada tangan yang telah dicuci.

6.9.2 Pengatur Suhu Air Keran dan Pemantau Suhu, untuk memantau dan mengatur suhu air pada 40°C sampai 62°C .

6.10 Penyimpan Nitrogen Cair untuk Sel - wadah untuk menyimpan nitrogen cair dan nitrogen cair yang sesuai untuk *kriopreservasi* stok *cell lines*.

6.11 Mikroskop Terbalik — mikroskop terbalik dengan lensa mata $10\times$ dan objektif $5\times$, $10\times$, dan $40\times$.

7 Reagen dan bahan

7.1 Pipet Serologis — Pipet steril yang dapat digunakan kembali atau sekali pakai dengan kapasitas 10,0, 5,0, dan 1,0-mL.

6. Equipment and Apparatus

- 6.1** *Laminar Flow Cabinet*—A Class II biological safety cabinet is required for virus work. The procedures for the proper maintenance and use of such cabinets are given in Ref (11).
- 6.2** *Incubator*—An incubator at 36.6 ± 0.1 °C is needed for growing host cells and for incubating virus-infected cultures. If an open system is used for cell culture, a CO₂ incubator will be required.
- 6.3** *Positive Displacement Pipette*—A pipette and pipette tips that accurately can dispense 10-µL volumes.
- 6.4** *Sterilizer*—Any steam sterilizer suitable for processing cell culture media and reagents is acceptable. The steam supplied to the sterilizer must be free from additives toxic to cell cultures.
- 6.5** *Filter Sterilization System*—A membrane or cartridge filtration system (0.22-µm pore diameter) is required for sterilizing heat-sensitive media and solutions.
- 6.6** *Freezers*—A freezer at – 206.2 °C is required for the storage of fetal bovine serum and other additives for cell culture media. A second freezer at – 70 °C or lower is required to store viruses
- 6.7** *Refrigerator*—A refrigerator at 4 ± 2 °C for storage of prepared cell culture media and reagents.
- 6.8** *Timer*—Any stopwatch that can be read in minutes and seconds.
- 6.9** *Handwashing Sink*—A sink of sufficient size to permit subjects to wash hands without touching hands to sink surface
- 6.9.1** *Water Faucet(s)*, to be located above the sink at a height that permits the hands to be held higher than the elbow during the washing procedure. Faucets with electronic sensors or those that are wrist-, elbow-, knee-, or foot-operated are preferred to avoid recontamination of the washed hands.
- 6.9.2** *Tap Water Temperature Regulator and Temperature Monitor*, to monitor and regulate water temperature at 40 ± 2 °C.
- 6.10** *Liquid Nitrogen Storage for Cells*—A proper liquid nitrogen container and liquid nitrogen for cryopreservation of the stocks of cell lines.
- 6.11** *Inverted Microscope*—An inverted microscope with 10× eye pieces and 5×, 10×, and 40× objectives.

7. Materials and Reagents

- 7.1** *Serological Pipettes*—Sterile reusable or single-use pipettes of 10.0, 5.0, and 1.0-mL capacity.

7.2 Labu Kultur Sel — Labu plastik dengan kapasitas 25 atau 75 cm² untuk membiakkan sel dan untuk menyiapkan kumpulan sel virus.

CATATAN 2 — Setiap labu untuk menumbuhkan sel lapisan tunggal dapat digunakan kembali sepuluh kali atau lebih sebelum dibuang.

CATATAN 3 — Peralatan kultur sel plastik dapat dibeli di penyedia alat - alat laboratorium.

7.3 Pelat Kultur Sel - 2.0 ml tiap sumur eluen (*well eluent*) (lihat 7.8) harus ditambahkan. Ini digunakan untuk elusi virus dari setiap ujung ibu jari ujung ibu jari dan jari tangan.

CATATAN 4 — alternatif, piring kecil (misalnya, diameter 35mm) dapat digunakan untuk pengenceran elusi virus.

7.4 Media Kultur Sel dan Suplemen - Media kultur, serta jenis dan rasio suplemen, akan bervariasi tergantung pada *Cell lines*. *Eagle's minimal essential medium* (EMEM) dengan 5% sampai 10% serum janin sapi (*fetal jan serum*) (telah diuji virus dan mikoplasma), digunakan untuk menumbuhkan berbagai macam sel (lihat Catatan 5).

CATATAN 5 — Bahan dan reagen untuk kultur sel dapat dibeli melalui penyedia *biological*.

7.5 *Beban tanah*:

7.5.1 Serum sapi, dengan konsentrasi akhir 5% dalam inokulum virus (lihat Catatan 6).

7.5.2 Ekstrak *yeast/BSA/Mucin* tripartit, sebagai alternatif pengganti serum. Tambahkan 0,5 g ekstrak ragi ke 10 mL *buffer* fosfat. Tambahkan 0,5 g albumin serum sapi (BSA) ke dalam 10 mL *buffer* fosfat. Tambahkan 0,04 g mucin sapi ke 10 mL *buffer* fosfat. Siapkan larutan stok secara terpisah dan sterilkan dengan menggunakan saringan membran dengan diameter pori 0,22 ul alikuot dan simpan pada suhu 4°C ± 2°C atau -20°C ± 2°C. Untuk mendapatkan pengenceran 500 µL dari inokulum uji, tambahkan 340 µL suspensi mikroba 25 µL BSA, 100 µL *mucin* dan 35 µL larutan stok ekstrak ragi. Campuran ini mengandung sekitar 2 g total protein / L, yang kira-kira setara dengan kandungan protein larutan 5% serum janin sapi (*fetal bovine serum*)

CATATAN 6 - Serum sapi tidak cocok digunakan sebagai bahan organik saat bekerja dengan rotavirus karena aktivitas penghambatan rotavirus dan *trypsin-neutralizing*.

7.6 Air Sadah Standar—Air sadah standar yang dibuat sesuai dengan AOAC 960.09 E dan F (14) dengan kesadahan 200 ppm karena penggunaan kalsium karbonat untuk pengenceran pengujian zat, sebagai larutan kontrol untuk menentukan tingkat dasar (*baseline level*) eliminasi virus, dan untuk membilas ujung jari setelah terpapar produk uji. Air sadah standar dan air keran (jika digunakan) dapat diuji terlebih dahulu untuk memastikan bahwa air tersebut tidak memiliki aktivitas virus terhadap virus yang diuji.

CATATAN 7—Kualitas dan sisa disinfektan (misalnya, klorin) dalam air keran dapat bervariasi dari satu lokasi ke lokasi lain dan pada waktu yang berbeda di lokasi yang sama. Oleh karena itu, penggunaan air sadah standar disarankan untuk menghindari variasi hasil karena perbedaan kualitas air keran.

7.7 Produk uji—Dua lot produk uji dari produsen terpisah dapat diuji. Untuk produk pencuci tangan yang digunakan dengan air, siapkan larutan 25% dengan menambahkan 1 bagian produk menjadi 3 bagian air sadah standar. Pengenceran ini diperlukan karena air digunakan saat produk diaplikasikan.

7.2 Cell Culture Flasks—Plastic flasks of 25 or 75-cm² capacity for culturing cells and for preparing virus pools

NOTE 2—Each flask for growing cell monolayers can be reused ten or more times before being discarded.

NOTE 3—Plastic cell culture ware may be purchased from most laboratory supply houses.

7.3 Cell Culture Plates, 6-well—2.0 mL per well eluent (see 7.8) shall be added. This is used for virus elution from each thumbpad and fingerpad.

NOTE 4—Alternatively, small dishes (for example, 35mm diameter) may be used for virus elution.

7.4 Cell Culture Media and Supplements—Culture media and the types and ratios of supplements will vary depending on the cell line. Eagle's minimal essential medium (EMEM) with 5 to 10 % fetal bovine serum (virus- and mycoplasma-tested) is used for growing a wide variety of cells (see Note 5).

NOTE 5—Materials and reagents for cell culture may be purchased from biological supply houses.

7.5 Soil Load:

7.5.1 Bovine Serum, at a final concentration of 5 % in the virus inoculum (see Note 6).

7.5.2 A Yeast extract/BSA/Mucin tripartite soil load, as an alternative to serum. Add 0.5 g of yeast extract to 10 mL of phosphate buffer. Add 0.5 g of bovine serum albumin (BSA) to 10 mL of phosphate buffer. Add 0.04 g of bovine mucin to 10 mL of phosphate buffer. Prepare the stock solutions separately and sterilize by passage through a 0.22 µm pore diameter membrane filter, aliquot and store at either 4 ± 2°C or -20 ± 2°C. To obtain a 500-µL inoculum of the test inoculum, add to 340 µL of the microbial suspension 25 µL BSA, 100 µL mucin and 35 µL of yeast extract stock solutions. This mixture contains approximately 2 g of total protein/L, which is approximately equivalent to the protein content of a 5 % solution of fetal bovine serum.

NOTE 6—Bovine serum is unsuitable for use as an organic load when working with rotaviruses because of its rotavirus inhibitory and trypsin neutralizing activity.

7.6 Standard Hard Water—Standard hard water prepared in accordance with AOAC 960.09 E and F (14) at a hardness of 200 ppm as calcium carbonate is used for dilution of test substance, as the control solution to determine the baseline level of virus elimination, and to rinse the fingerpads after exposure to the test product. The standard hard water and tap water (if used) must first be tested to ensure that they do not have any virucidal activity against the test virus(es).

NOTE 7—The quality and disinfectant (for example, chlorine) residual in tap water can vary from site to site and at different times at the same site. The use of standard hard water, therefore, is recommended here to avoid variations in results due to differences in tap water quality.

7.7 Test product—Two separate manufacturer's lots of the test product may be tested. For handwash products that are used with water, prepare a 25 % solution by adding 1 part product to 3 parts standard hard water. This dilution is necessary because water is used when the product is applied.

7.8 Eluen untuk Pemulihan Virus dari Fingerpad—Minimum Medium Esensial (MEM) + 2% Serum Sapi Janin (FBS), atau larutan garam seimbang Earle (EBSS) dengan pH 7,2 – 7,4, atau setara.

7.9 Pengencer untuk Titration Virus—Sama dengan Eluen untuk Pemulihan Virus dari Fingerpads.

7.10 Botol Plastik—Botol 2,0 mL bertutup ulir steril dengan diameter dalam sekitar 8 mm diperlukan untuk demarkasi (*demarcation*) ujung jari dan untuk memegang berbagai larutan uji.

7.11 Peralatan Laboratorium Lain-Lain—Pipet otomatis, ujung pipet, botol plastik untuk menyimpan stok sel dan virus, tabung pengenceran, pelat kluster, atau labu untuk titrasi virus.

8 Pengujian Virus dan Kultur sel

8.1 Lihat Lampiran X1 untuk virus yang direkomendasikan dan sel inangnya.

9 Subjek

9.1 Rekrut dengan jumlah yang memadai, subyek pengujian yaitu manusia sehat yang tidak memiliki bukti klinis penyakit kulit, luka terbuka, atau kelainan kulit lainnya (lihat 4.1). Jumlah subjek yang diperlukan untuk suatu percobaan bergantung pada jumlah perlakuan dalam suatu penelitian.

9.2 Pengguna metode pengujian ini bertanggung jawab untuk mengatur izin yang diperlukan untuk penggunaan subyek manusia dewasa dalam pengujian dan mendapatkan persetujuan tertulis serta informasi dari mereka yang dipilih untuk penelitian sebelum memulai pengujian

10 Prosedur

10.1 Subjek akan mencuci tangannya dengan sabun non medis (*nonmedicated soap*) setidaknya selama 10 detik, bilas, dan kemudian keringkan secara menyeluruh dengan kertas bersih atau handuk kain.

CATATAN 8 — Prosedur ini mengurangi variabilitas hasil pengujian dengan menghilangkan akumulasi minyak dan kotoran dari tangan.

10.2 Tempatkan sekitar 5 mL etanol 70% (v / v) di telapak tangan salah satu tangan yang sudah dicuci dan instruksikan subjek untuk menggosokkannya dengan baik ke seluruh permukaan kedua tangan sampai alkohol dan air menguap sepenuhnya.

10.3 Tekan ujung ibu jari atau ujung jari di atas mulut botol plastik kosong (lihat 7.9) untuk membatasi area untuk penerimaan inokulum virus uji.

10.4 Dengan menggunakan pipet perpindahan positif, masukkan 10 µL suspensi virus, dengan atau tanpa muatan tanah, di tengah setiap area batas-batas dari kedua ujung ibu jari dan delapan ujung jari.

10.5 Gunakan *ujung ibu jari* untuk menentukan tingkat virus menular yang ditempatkan di setiap area yang dibatasi (Kontrol Input Inokulum Basah). Setelah ujung ibu jari terkontaminasi, jangan biarkan inokula di atasnya mengering dan segera elusi sesuai dengan 10.10.

7.8 Eluent for Virus Recovery from Fingerpads—Minimum Essential Medium (MEM) + 2 % Fetal Bovine Serum (FBS), or Earle’s balanced salt solution (EBSS) with a pH of 7.2 – 7.4, or equivalent.

7.9 Diluent for Virus Titration—Same as the Eluent for Virus Recovery from Fingerpads.

7.10 Plastic Vials—Sterile screw-capped 2.0-mL vials with an inside diameter of about 8 mm are required for demarcation of the fingerpads and to hold various test solutions.

7.11 Miscellaneous Laboratory Ware—Automatic pipettes, pipette tips, plastic vials for storing cell and virus stocks, dilution tubes, cluster plates, or flasks for virus titration.

8. Test Viruses and Cell Cultures

8.1 See Appendix X1 for recommended viruses and their host cells.

9. Subjects

9.1 Recruit a sufficient number of healthy human subjects who have no clinical evidence of dermatoses, open wounds, or other skin disorders (see 4.1). The number of subjects required for a trial is dependent on the number of treatments within a study.

9.2 It is the responsibility of the user of this test method to arrange the necessary clearance for the use of adult subjects for testing and to obtain informed and written consent from those selected for the study before starting the tests.

10. Procedure

10.1 The subject will wash his/her hands with a nonmedicated soap for at least 10 s, rinse, and then dry them thoroughly with a clean paper or cloth towel.

NOTE 8—This procedure reduces variability in the test results by removing accumulated oil and dirt from the hands.

10.2 Place about 5 mL of 70 % (v/v) ethanol in the palm of one of the washed hands and instruct the subject to rub it well over the entire surface of both hands until the alcohol and water have evaporated completely.

10.3 Press a thumbpad or fingerpad over the mouth of an empty plastic vial (see 7.9) to demarcate the area to receive the test virus inoculum.

10.4 Using a positive displacement pipette, deposit 10 μ L of the virus suspension, with or without a soil load, at the center of each demarcated area of both thumbpads and all eight fingerpads.

10.5 Use thumbpads to determine the level of infectious virus placed in each demarcated area (Wet Inoculum Input Control). Once thumbpads have been contaminated, do not allow the inocula on them to dry and immediately elute them in accordance with 10.10.

10.6 Biarkan inokulum pada semua ujung jari menjadi tampak kering dalam kondisi ruangan. Ini biasanya membutuhkan waktu 15 sampai 30 menit.

10.7 Untuk menentukan tingkat virus yang bertahan hidup setelah periode pengeringan ini, elusi virus secara bersamaan terhadap perlakuan pada dua ujung jari kelingking sesuai dengan 10.11. Ini adalah Kontrol Pemulihan Virus Kering.

CATATAN 9 — Menggunakan ujung jari kelingking untuk Kontrol Pemulihan Virus Kering berfungsi sebagai skenario terburuk

10.8 Pilih secara acak satu ujung jari yang tersisa, dari satu tangan, untuk perlakuan produk uji, di mana 20 µL produk uji ditambahkan ke area yang terkontaminasi virus, diikuti dengan menggosok dengan ujung jari yang dipilih secara acak (selain jari kelingking) dari tangan yang berlawanan untuk durasi waktu kontak.

Perhatian sebaiknya diberikan untuk menutupi semua inokula virus kering dengan produk uji selama perlakuan, dan untuk meminimalkan tumpahan produk uji.

10.8.1 Untuk mensimulasikan pembilasan air pasca-perlakuan saat menguji bahan pencuci tangan, paparkan setiap ujung jari yang telah diberi perlakuan ke 1,0 mL air sadah standar dalam vial selama 5-10 detik; kemudian elusi virus berikut 10.10.

10.8.2 Saat menguji *Handrub*, lewati Langkah 10.8.1 dan lanjutkan langsung ke 10.10.

10.9 Dua ujung jari lainnya yang tersisa dari satu tangan dapat digunakan untuk perlakuan lot kedua produk uji, produk referensi (kontrol), atau kontrol agen pembawa (air sadah standar), atau keduanya.

10.10 Untuk elusi virus, tekan setiap ujung ibu jari atau ujung jari ke dalam salah satu sumur pada pelat 6 lubang atau cawan 35 mm, yang berisi eluen 2,0 mL (=penetral), dan goyangkan secara sinambung selama 1 menit. Setelah pencampuran, angkat jari dan gesekkan ujung jari pada tepi bagian dalam sumur atau cawan untuk memasukkan cairan sebanyak mungkin ke dalam wadah. Gunakan sumur atau cawan terpisah untuk setiap jari. Nilai perolehan kembali dari 2 ujung ibu jari atau sepasang ujung jari yang terlibat dalam perlakuan yang sama akan dirata-ratakan.

10.11 Subjek harus disarankan untuk menghindari menyentuh apa pun atau siapa pun (termasuk diri mereka sendiri) dengan tangan mereka sebelum dekontaminasi.

10.12 Segera setelah pemulihan, untuk semua virus kecuali virus hepatitis A (HAV), dekontaminasi ibu jari / jari dengan menekannya selama 2 hingga 3 menit di atas kertas tisu atau handuk kertas yang dibasahi dengan etanol 70% (v / v); untuk HAV, gunakan larutan pemutih rumah tangga 1:10 (tersedia sekitar 5000 ppm klorin) dalam air keran.

10.13 Instruksikan kepada subjek untuk mendekontaminasi tangan mereka lebih lanjut (10.12) dengan mencuci tangan secara menyeluruh dengan sabun dan air, kemudian mengeringkannya dengan baik sebelum meninggalkan area pengujian.

10.14 Titrasi seluat dan kontrol untuk virus yang menular menggunakan minimal tiga lapisan tunggal untuk setiap pengenceran yang diuji. Jika titrasi tidak dapat dilakukan dalam waktu 3 sampai 4 jam setelah pengambilan sampel, maka sampel dapat disimpan semalaman pada suhu 6°C ± 2°C. Penyimpanan yang lebih lama sebaiknya pada -70° C atau lebih rendah.

10.6 Allow the inoculum on all fingerpads to become visibly dry under ambient conditions. This will generally take 15 to 30 min.

10.7 To determine the level of virus remaining viable after this drying period, elute the virus simultaneously from the two little fingerpads in accordance with 10.11. This is the Dried Virus Recovery Control.

NOTE 9—Using the little fingerpads for the Dried Virus Recovery Control serves as a worst-case scenario

10.8 Randomly select one remaining fingerpad, from one hand, for test product treatment, wherein 20 μL of test product is added to the viral contaminated area, followed by rubbing with a randomly chosen fingerpad (other than the little finger) from the opposite hand for the duration of the contact time. Care should be taken to cover all dried virus inocula with test product during the treatment, and to minimize spillover of the test product.

10.8.1 To simulate the post-treatment water rinse when testing handwash agents, expose each treated fingerpad to 1.0 mL of standard hard water in a vial for 5-10 seconds; then elute virus following 10.10.

10.8.2 When testing handrubs, skip Step 10.8.1 and proceed directly to 10.10.

10.9 The other two remaining fingerpads from one hand may be used for treatment by the 2nd lot of test product, a reference (control) product, or a vehicle (standard hard water) control, or both.

10.10 For virus elution, press each thumbpad or fingerpad into one well of a 6-well plate or a 35mm-dish, which contains 2.0 mL eluent (= neutralizer), and rubbing continuously for 1 minute. After the rubbing, lift the finger and scrape the pad against the inside rim of the well or dish to recover as much of the fluid as possible into the vessel. Use a separate well or dish for each finger. Recovery values from the 2 thumbpads or the pair of the fingerpads that are involved in the same treatment will be averaged.

10.11 Subjects must be advised to avoid touching anything or anyone (including themselves) with their hands prior to decontamination.

10.12 Immediately following recovery, for all viruses except hepatitis A virus (HAV), decontaminate the thumb-/ fingerpads by pressing them for 2 to 3 min over tissue paper or paper towel soaked in 70 % (v/v) ethanol; for HAV, use a 1:10 dilution of domestic bleach (about 5000 ppm available chlorine) in tap water.

10.13 Instruct the subjects to further decontaminate their hands (10.12) by washing them thoroughly with soap and water and drying them well before leaving the test area.

10.14 Titrate the eluates and controls for infectious virus using a minimum of three monolayers for each dilution tested. If titrations cannot be carried out within 3 to 4 h of collection, store samples overnight at $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Longer storage should be at -70°C or lower.

10.15 Kontrol:

10.15.1 Pengendalian Viabilitas Sel — Untuk memastikan bahwa sel inang tidak terkontaminasi bakteri, jamur, atau virus sitopatogenik apa pun selain yang digunakan dalam pengujian, biarkan setidaknya dua lapisan tunggal sel inang tidak diberi perlakuan di setiap pengujian untuk diperiksa terlebih dahulu di akhir dari masa inkubasi. Kontaminasi atau degenerasi apapun yang nyata pada lapisan tunggal tersebut akan membatalkan titrasi virus.

10.15.2 Pengendalian Titer Stok Virus — Lakukan pengenceran sepuluh kali lipat secara berurutan pada satu alikot virus stok untuk titrasi mengikuti 10.14. Kurangnya efek sitopatik yang disebabkan oleh virus yang khas pada lapisan tunggal tersebut juga membuat pengujian ini tidak valid. kontrol ini juga akan mengkonfirmasi titer virus stok dan kesesuaiannya dalam pengujian.

10.15.3 Pengendalian Sitotoksitas - Pengendalian ini untuk (1) menentukan pengenceran produk uji yang tidak menyebabkan degenerasi (sitotoksitas) yang jelas dari sel inang yang akan digunakan untuk mengukur infektivitas virus dan (2) menilai apakah penetral dengan cara apapun mengurangi atau meningkatkan sitotoksitas tersebut. Lakukan pengenceran 1:20 awal dan pengenceran sepuluh kali lipat lebih lanjut dari pengenceran penggunaan produk uji dalam EBSS dengan dan tanpa penetral. Hapus media kultur dari lapisan tunggal sel inang dan masukkan ke dalam setiap lapisan tunggal uji secara terpisah dengan volume inokulum yang sama seperti yang digunakan dalam titrasi virus; lapisan tunggal kontrol hanya menerima volume EBSS yang setara (tanpa penetral apa pun). Simpan kultur selama 30 hingga 60 menit pada suhu ruang dan periksa di bawah mikroskop inverted untuk melihat adanya degenerasi atau kerusakan sel. Dalam kasus sitotoksitas, penetral yang berbeda atau pendekatan alternatif untuk menghilangkan/mengurangi sitotoksitas mungkin diperlukan. Jika tidak ada sitotoksitas yang diamati pada salah satu pengenceran, produk uji dan penetral harus dilakukan uji interferensi.

10.15.4 *Pengendalian Efektivitas Netralisasi dan Interferensi terhadap Inektivitas Virus* – Tingkat produk uji yang tidak menunjukkan sitotoksitas yang jelas masih dapat mengurangi atau meningkatkan kemampuan virusantang untuk menginfeksi atau bereplikasi dalam sel inang, sehingga mengganggu estimasi aktivitas virusidalnya. Oleh karena itu, pengendalian interferensi harus disertakan untuk mengesampingkan kemungkinan tersebut. Keluarkan media kultur dari sel inang dan inokulasi masing-masing lapisan tunggal uji dengan volume inokulum yang sama seperti yang digunakan dalam titrasi virus dengan pengenceran 1:20 produk uji dalam EBSS dengan dan tanpa penetral. Kontrol menerima EBSS sendiri (tanpa penetral)

Simpan lapisan Tunggal pada suhu ruang selama 30 hingga 60 menit dan inokulasikan masing-masing lapisan dengan sejumlah kecil unit infeksi virusantang. Inkubasi lapisan tunggal untuk adsorpsi virus, menempatkan media pemeliharaan dalam kultur, menginkubasinya selama waktu yang diperlukan untuk replikasi virus dan memeriksanya untuk mengetahui sitopatologi atau fokus infeksi virus. Perbedaan signifikan dalam titer infektivitas virus menunjukkan kemampuan produk uji atau penetral dalam mempengaruhi kerentanan virus pada sel inang. Dalam kasus seperti ini, mungkin diperlukan penetral yang berbeda atau pendekatan alternatif untuk menghilangkan residu produk uji dalam sampel yang akan dititrasi untuk mengetahui infektivitas virus.

10.15 Controls:

10.15.1 Cell Viability Control—To ensure that the host cells are not contaminated with bacteria, fungi or any cytopathogenic viruses other than those used in the test, leave at least two host cell monolayers untreated in each test to be examined first at the end of the incubation period. Any obvious contamination or degeneration in such monolayers would invalidate the virus titration.

10.15.2 Virus Stock Titer Control—Perform serial ten-fold dilutions on an aliquot of the stock virus for titration following

10.14. A lack of obvious and typical virus-induced cytopathic effects in such monolayers would also invalidate the test. This control will also confirm the titer of the stock virus and its suitability in testing.

10.15.3 Cytotoxicity Control—This control is to (1) determine the dilution of the test product at which it causes no apparent degeneration (cytotoxicity) of the host cells to be used for measuring virus infectivity and (2) assess if the neutralizer in any way reduces or enhances such cytotoxicity. Make an initial 1:20 dilution and one further ten-fold dilution of the use-dilution of the test product in EBSS with and without the neutralizer. Remove the culture medium from the monolayers of the host cell monolayers and put into each test monolayer separately the same volume of inoculum as used in virus titration; control monolayers receive an equivalent volume of EBSS (without any neutralizer) only. Hold the cultures for 30 to 60 min at room temperature and examine them under an inverted microscope for any cell degeneration or destruction. In case of cytotoxicity, a different neutralizer or alternative approaches to the removal/reduction of cytotoxicity may be needed. If no cytotoxicity is observed at either one of the dilutions, the test product and the neutralizer should be subjected to the following interference test.

10.15.4 Control for Neutralization Effectiveness and Interference with Viral Infectivity—Levels of the test product which show no obvious cytotoxicity could still reduce or enhance the ability of the challenge virus to infect or replicate in host cells, thus interfering with the estimation of its virucidal activity. An interference control must, therefore, be included to rule out such a possibility. Remove the culture medium from the host cells and inoculate each one of the test monolayers with the same volume of inoculum as used in virus titration with a 1:20 dilution of the test product in EBSS with and without neutralizer. Controls receive EBSS alone (without the neutralizer).

Hold the monolayers at room temperature for 30 to 60 min and inoculate each with a low number of infective units of the challenge virus. Incubate the monolayers for virus adsorption, place maintenance medium in the cultures, incubate them for the time required for virus replication and examine them for cytopathology or foci of virus infection. Any significant difference in virus infectivity titer is indicative of the test product's or the neutralizer's ability to affect the virus susceptibility of the host cells. In such a case, a different neutralizer or alternative approaches to the removal of the residues of the test product in the samples to be titrated for virus infectivity may be needed.

11 Pengulangan dan Evaluasi Statistik

11.1 Metode pengujian ini sebaiknya dilakukan setidaknya sekali dengan tidak kurang dari tiga subjek.

11.2 Metode pengujian ini didesain untuk mencakup kedua ujung ibu jari untuk menentukan tingkat virus hidup yang ditempatkan pada ujung jari (Kontrol Input Inokulum Basah), dua ujung jari kelingking untuk menilai tingkat virus hidup yang tersisa setelah pengeringan inokulum (Kontrol Pemulihan Virus Kering), dua *ujung jari* untuk menentukan sejauh mana eliminasi virus setelah perlakuan dengan produk uji (termasuk pembilasan pasca perlakuan dengan air sadah standar, jika produk uji adalah *handwash*), dan empat ujung jari untuk menilai tingkat eliminasi virus setelah perlakuan oleh lot ke-2 dari produk uji, atau bahan referensi (kontrol), atau agen pembawa (misalnya, air sadah standar) saja.

11.3 Perbedaan tingkat virus menular pada Kontrol Input Inokulum Basah dan Kontrol Pemulihan Virus Kering menunjukkan hilangnya infektivitas virus karena pengeringan inokulum pada fingerpads. Jumlah virus menular yang tersisa setelah pengeringan inokulum harus digunakan sebagai dasar (*baseline*) untuk menentukan tingkat eliminasi virus setelah perlakuan dengan produk uji atau kontrol.

12 Presisi dan Bias

12.1 Pernyataan presisi dan bias tidak dapat dibuat untuk metode pengujian ini saat ini.

13 Kata kunci

13.1 Adenovirus; kultur sel; sitotoksisitas; eluen; ujung jari; virus hepatitis A; cuci tangan higienis; agen *Handrub* higienis; pengendalian infeksi; virus influenza; pengujian in vivo; sabun mikrobisida; rhinovirus; rotavirus; mikrobiota kulit; beban tanah; air sadah standar ; virus; pengenceran virus.

11. Repetitions and Statistical Evaluations

11.1 This test method should be performed at least once with no less than three subjects.

11.2 This test method is designed to include the two thumbpads to determine the level of viable virus placed on the fingerpads (Wet Inoculum Input Control), two little fingerpads to assess the level of viable virus remaining after the drying of the inoculum (Dried Virus Recovery Control), two fingerpads to determine the extent of virus elimination after treatment with the test product (including the post-treatment rinse with the standard hard water, if the test product is a handwash), and four fingerpads to assess the level of virus eliminated after treatments by the 2nd lot of the test product, or a reference (control) agent, or the vehicle (for example, standard hard water) alone.

11.3 The difference in the level of infectious virus in the Wet Inoculum Input Control and the Dried Virus Recovery Control represents the loss in virus infectivity due to the drying of the inoculum on the fingerpads. The amount of infectious virus remaining after the drying of the inoculum shall be used as the baseline to determine the extent of virus elimination after treatment with the test or the control product.

12. Precision and Bias

12.1 A precision and bias statement cannot be made for this test method at this time.

13. Keywords

13.1 adenovirus; cell culture; cytotoxicity; eluent; fingerpads; hepatitis A virus; hygienic handwashing; hygienic handrub agent; infection control; influenza virus; in vivo testing; microbicidal soap; rhinovirus; rotavirus; skin microbiota; soil load; standard hard water; virus; virus elution

Lampiran (Informasi tidak wajib)

X1.1 Virus dan sel inangnya direkomendasikan untuk digunakan di metode ini; Nomor ATCC, jika tersedia, ada dalam tanda kurung.

X1.2 Pemilihan virus uji berikut didasarkan pada mereka (1) keamanan relatif terhadap subjek dan juga pelaku eksperimen, (2) kemampuan untuk tumbuh hingga titer yang cukup tinggi untuk pengujian, (3) properti untuk menghasilkan efek sitopatik atau plak, atau keduanya, di kultur sel, (4) berpotensi menyebar melalui kontaminasi tangan, dan (5) resistensi relatif terhadap bahan yang digunakan di tangan kebersihan. Strain atau jenis virus lain dapat diganti asalkan memenuhi kriteria sebelumnya.

CATATAN X1.1—Tidak ada cukup informasi mengenai apakah bagian tersebut sejarah, kondisi budaya, dan perbedaan strain virus dapat mempengaruhi efisiensi eliminasi mereka dengan agen kebersihan tangan. Perhatian harus Namun, hal ini harus dilakukan ketika mengganti virus karena hal ini dapat menyebabkan variasi hasil dari satu laboratorium ke laboratorium lainnya.

X1.2.1 *Human Adenovirus*—Tipe 2 (VR-846) atau Tipe 5 (VR-5): Opsi *cell lines*: Karsinoma Paru-Paru Manusia (A549) (CCL-185), Hep-2 (CCL-23), dan Vero (CCL-81).

X1.2.2 Virus Hepatitis A Strain HM-175 (VR-1402):— *Cell lines* yang direkomendasikan FRhK-4 (CRL-1688).

X1.2.3 Rotavirus Manusia Wa (VR-2018)—Direkomendasikan *cell lines*: CV-1 (CCL-70) atau MA-104 (CRL-2378). Sebelum inokulasi rotavirus, lapisan sel tunggal harus dicuci setidaknya tiga kali dengan EBSS untuk menghilangkan serum dari pertumbuhan sedang. Semua pengencer, media pemeliharaan, dan lapisan agar juga harus bebas serum. Kebanyakan rotavirus juga memerlukan adanya trypsin dalam medium pertumbuhan dan pembentukan plak.

X1.2.4 *Human Rhinovirus* Tipe 37 (VR-1147) atau Rhinovirus 14 (VR-284)— *Cell lines* yang direkomendasikan: MRC-5 (*Human Rhinovirus* ATCC CCL- 171), sel WI-38 (CCL-75) atau HeLa T4+.

X1.2.5 Murine Norovirus Tipe 1—Pengganti *human norovirus*; *cell lines* yang direkomendasikan: RAW 264.7 (TIB-71).

X1.2.6 Feline calicivirus—Pengganti *human norovirus*; *cell lines* yang direkomendasikan: CrFK (CCL-94).

APPENDIX (Nonmandatory Information)

X1. TEST VIRUSES AND CELL CULTURES

X1.1 Viruses and their host cells recommended for use in this method; ATCC numbers, where available, are in parenthesis.

X1.2 The selection of the following test viruses is based on their (1) relative safety to subjects as well as experimenters, (2) ability to grow to titers sufficiently high for testing, (3) property to produce cytopathic effects or plaques, or both, in cell cultures, (4) potential to spread through contaminated hands, and (5) relative resistance to agents used in hand hygiene. Other strains or types of viruses may be substituted provided they meet the preceding criteria.

NOTE X1.1—There is insufficient information on whether the passage history, culture conditions, and strain differences of viruses can influence the efficiency of their elimination by hand hygiene agents. Caution must be exercised, however, when substituting viruses as this may lead to variations in results from one laboratory to another.

X1.2.1 Human Adenovirus—Type 2 (VR-846) or Type (VR-5): Cell line options: Human Lung Carcinoma (A549) (CCL- 185), Hep-2 (CCL-23), and Vero (CCL-81).

X1.2.2 Hepatitis A Virus Strain HM-175 (VR-1402):— Recommended cell line FRhK-4 (CRL-1688).

X1.2.3 Human Rotavirus Wa (VR-2018)—Recommended cell line: CV-1 (CCL-70) or MA-104 (CRL-2378). Prior to rotavirus inoculation, cell monolayers must be washed at least three times with EBSS to remove the serum from the growth medium. All diluents, maintenance media, and agar overlays also must be free from serum. Most rotaviruses also require the presence of trypsin in the medium for growth and plaques formation.

X1.2.4 Human Rhinovirus Type 37 (VR-1147) or Rhinovirus 14 (VR-284)—Recommended cell line: MRC-5 (ATCC CCL- 171), WI-38 (CCL-75) or HeLa T4+ cells.

X1.2.5 Murine Norovirus Type 1—A surrogate for human noroviruses; recommended cell line: RAW 264.7 (TIB-71)

X1.2.6 Feline calicivirus—A surrogate for human noroviruses; recommended cell line: CrFK (CCL-94).

Bibliografi

- [1] Sattar, S. A. and Ansari, S. A., "The fingerpad protocol to assess hygienic hand antiseptics against viruses," *J. Virol. Methods*, Vol 103,2002, pp. 171–181.
- [2] Ansari, S. A., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Wells, G. A., and Tostowaryk, W., "Rotavirus Survival on Human Hands and Transfer of Infectious Virus Animate and Nonporous Inanimate Surfaces," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 26, 1988, pp. 1513–1518.
- [3] Mbithi, J. N., Springthorpe, V. S., Boulet, J., and Sattar, S. A., "Survival of hepatitis A Virus on Human Hands and Its Transfer on Contact with Animate and Inanimate Surfaces," *Journal of Clinical Microbiology* , Vol 30, 1992, pp. 757–763.
- [4] Sattar, S.A., Abebe, M., Bueti, A., Jampani, H. & Newman, J. "Determination of the activity of an alcohol-based hand gel against human adeno-, rhino-, and rotaviruses using the fingerpad method," *Infection Control & Hospital Epidemiology*, Vol. 21, 2000, pp. 516–519.
- [5] Gwaltney, J. M., Moskalski, P. B., and Hendley, J. O., " Interruption of Experimental Rhinovirus Transmission," *Journal of Infectious Diseases*, Vol 142, 1980, pp. 811–815.
- [6] Mbithi, J. N., Springthorpe, V. S., and Sattar, S. A., "Comparative In Vivo Efficiency of Hand-Washing Agents Against Hepatitis A (HM- 175) and Poliovirus Type 1 (Sabin)," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 59, 1993, pp. 3463–3469.
- [7] Ansari, S. A., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Wells, G. A., and Tostowaryk, W., "In Vivo Protocol for Testing Efficacy of HandWashing Agents Against Viruses and Bacteria: Experiments With Rotavirus and Escherichia coli," *Applied and Environmental Microbiology* , Vol 55, 1989, pp. 3113–3118.
- [8] Steinmann, J., Nehrkorn, R., Meyer, A., and Becker, K. "Two In-Vivo Protocols for Testing Virucidal Efficacy of Handwashing and Hand Disinfection," *Zentra/blatt für Hygiene*, Vol 196, 1995, pp. 425–436.
- [9] Patnayak D.P., Prasad M., Yashpal S. Malik, M. A. Ramakrishnan and Goyal S. M. "Efficacy of Disinfectants and Hand Sanitizers against Avian Respiratory Viruses", *Avian Diseases*, Vol. 52, No. 2 (Jun.,2008), pp. 199-202
- [10] Galloway DA, Laimins LA. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Curr Opin Virol*. 2015Oct;14:87-92.
- [11] CDC-NIH, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 4th ed., U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, 1999.
- [12] Lennette, E.H., Lennette, D. A., and Evelyne T. Lennette, E. T. eds., *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, Seventh Edition, American Public Health Association, Washington, DC, 1995.
- [13] Ansari, S. A., Springthorpe, V. S., and Sattar, S. A., "Comparison of Cloth-, Paper- and Warm Air-Drying in Eliminating Viruses and Bacteria from Washed Hands," *American Journal of Infection Control*, Vol 19, 1991, pp. 243–249.
- [14] AOAC International, *Official Methods of Analysis of the AOAC*, Arlington, VA, 1990

Informasi pendukung terkait perumus standar

[1] Komite Teknis Perumus SNI

Komite Teknis 11-11 Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis perumus SNI

Ketua : Beluh Mabasa Ginting
Wakil Ketua : Augustine Zaini
Sekretaris : Ihza Ihtimamul Umam
Anggota : 1. Rini Sugiyati
2. Ira Setiawati
3. Fikrah Mawardya
4. Tono Eka Prayitno
5. Cahyani Retno Ariati
6. Rahmana Emran Kartasasimita
7. Pascha Wijaya
8. Merryani Girsang
9. Aprisunadi
10. Toto Waluyadi
11. Dewi Ria Agustin
12. Lisa Amelia
13. Anggiat Yonathan Amazia

[3] Konseptor rancangan SNI

Gugus kerja di Sekretariat Komite Teknis 11-11 Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga

Tim Kerja Kesehatan – Direktorat Pengembangan Standar Agro, Kimia, Kesehatan, dan Penilaian Kesesuaian, Badan Standardisasi Nasional

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis perumus SNI

Direktorat Pengembangan Standar Agro, Kimia, Kesehatan, dan Penilaian Kesesuaian Badan Standardisasi Nasional