PK Benelux BV

Sprawozdanie

BTS 1407/19

Wersja 04

Badanie modelu in vitro skuteczności trzech produktów przeciwgrzybiczych przeciwko dermatofitom

Dla

PK Benelux BV

Uden

Holandia

Przez



BioTeSys

BioTeSys GmbH • Schelztorstrasse 54-56 • D-73728 Esslingen

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Wygenerowano: | Nr proj.: | Nr wersji | Data |
|  | D.Dressler | BTS1407/19 | 04 | 6.2.2020 |

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

2/11

Dziękujemy za zainteresowanie. W załączeniu znajdziecie Państwo ofertę w odpowiedzi na wiadomość e-mail z dnia 18 lipca 2019 r.

**Kontakt:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **BioTeSys GmbH**  Schelztorstr. 54-56  73728 Esslingen |  | **Dr Karin Engelhart-Jentzsch**  Tel.: +49 (0)711 310 57 144  Faks: +49 (0)711 31057 151 e-Mail: [k.engelhart@biotesys.de](file:///C:\Users\m.retmaniak\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Outlook\1PWII03L\quot;mailto:k.engelhart@biotesys.de&quot) |
| **PK Benelux BV**  Vluchtoord 17 5406 XP Uden  Holandia |  | **Anne Claire Sparla**  Tel: +31 (0)413 253337  Faks:  E-Mail: [ac.sparla@pkbenelux.com](file:///C:\Users\m.retmaniak\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Outlook\1PWII03L\quot;mailto:ac.sparla@pkbenelux.com&quot) |

Spis treści

1. [Wprowadzenie 3](#bookmark12)
2. Metody 4
   1. [Produkty badane 4](#bookmark14)
   2. [Dermatofity 5](#bookmark16)
   3. [Badanie in vitro skuteczności przeciwgrzybiczej 6](#bookmark18)
3. Wyniki 7
4. [Wnioski 11](#bookmark20)

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

3/11

1 Wprowadzenie

Celem badania było udowodnienie skuteczności trzech różnych produktów, przeznaczonych do leczenia grzybicy stóp lub innych chorób grzybiczych skóry.

Grzybica stóp (tinea pedis) to zakażenie skóry, powodowane przez trzy różne gatunki grzybów.  
Trichophyton i Epidermophyton ara to najpowszechniej występujące gatunki grzybów, powodujące infekcje skóry stóp. Do objawów należy najczęściej swędzenie, łuszczenie, pękanie i zaczerwienienie skóry.

Wiele innych infekcji grzybiczych powoduje Candida - odmiana drożdży, które znajdują się na większości powierzchni błony śluzowej, głównie w układzie pokarmowym, a także na skórze.

Skuteczność produktów badanych zweryfikowano w odniesieniu do tych popularnych odmian grzybów.

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

4/11

**2 Metody**

2.1 Produkty badane

Badano skuteczność w walce z grzybicą następujących trzech produktów:

* Antifungal/ Athlete's Foot Cream / Spray
* Antifungal Spray (nowe wskazanie)
* Fungal Nail

Produkty badane dostarczone przez sponsora:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Nr wewnętrzny |  | Otrzymano |
| 1 | Lucovitaal kalknagelbehandling/ Fungal nail (1 OmL) | 191130573 | 50 x 10mL  Partia: 1901048  Okr. trwałości: 2021-07 | 02.10.2019 |
| 2 | Lucovitaal voetschimmelspray/ Athletefootspray (25mL) | 191130574 | 20 x 20mL  Partia: 1802762  Okr. trwałości: 2022-02 | 02.10.2019 |
| 3 | Lucovitaal voetschimmel/ Athletefootgel (30mL) | 191130575 | 20 x 30mL  Partia: 12719  Okr. trwałości: 2022-02 | 02.10.2019 |
| 4 | NALOC TUBE | 191103576 | 20 x 10mL  Partia: 801905  Okr. trwałości: 08 2020 | 02.10.2019 |
| 5 | LAMISIL SPRAY 1% 10mg TERBINAF | 191130577 | 15 x 15mL  Partia: H00663  Okr. trwałości: 03 2022 | 02.10.2019 |
| 6 | LAMISIL CREME 10mg TERBINAFINE | 191130578 | 15 x 15gr.  Partia: YL8D  Okr. trwałości: 12/2021 | 02.10.2019 |

Tabela nr 1: Produkty badane

Utworzono zawiesinę produktów w wodzie normalizowanej (80%, 8% i 0,8%) oraz dodano do zawiesiny zarodników dermatofitów. Stężenie końcowe produktu badanego w zawiesinie dermatofitów wyniosło 64%, 6,4% i 0,64%. Po zakończeniu czasu obróbki/ inkubacji (1h lub 24h przy 36° C) roztwór został

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

5/11

pobrany, a dermatofity usunięto z zawiesiny metodą filtrowania (0,45 μm) lub zawiesinę zneutralizowano (poprzez dodanie mieszaniny polisorbatu, lecytyny, histydyny, tiosiarczanu sodu, saponiny w PBS). W każdej z próbek policzono zdolne do życia dermatofity po sporulacji (zróżnicowany czas trwania przy 30°C). Do liczby kolonii utworzonych z pojedynczej komórki przypisano jednostkę tworzenia kolonii (CFU).

2.2 Dermatofity

Produkty będą badane pod kątem skuteczności w zwalczaniu następujących dermatofitów:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Produkt dostarczony** | **Produkt planowany** | **Dermatofity** |
| Lucovitaal voetschimmel/ Athletefootgel  LAMISIL CREME 10mg  TERBINAFINE  Lucovitaal voetschimmelspray/ Athletefootspray  LAMISIL SPRAY 1% 10mg TERBINAF | Antifungal/ Athlete's Foot Cream / Spray | Trichophyton rubrum T. mentagrophytes Epidermophyton floccosum |
| Lucovitaal voetschimmelspray/ Athletefootspray  Lucovitaal kalknagelbehandling/ Fungal nail  NALOC TUBE | Fungal Nail | Trichophyton rubrum  Candida |

Tabela nr 2: Przypisanie produktów badanych i szczepów badanych

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19 Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą 6/ 11

1. Badanie in vitro skuteczności przeciwgrzybiczej

Skuteczność przeciwgrzybiczą badanych produktów weryfikowano za pomocą testów zawiesiny w następujących warunkach:

* 2 lub 3 dermatofity wg tabeli 1 (Trichophyton rubrum, Trichophyton  
  mentagrophytes, Epidermophyton floccosum, Candida)
* 3 stężenia każdego produktu Stężenia produktów dobrano ze względów technicznych. Konieczne było doprowadzenie produktów do stanu ciepłego.
* Hodowla dermatofitów i kwantyfikacja w celu uzyskania dawki początkowej (wartość końcowa 106 -  
  108/ml)
* Test zawiesiny: inkubacja mieszaniny produktu/ dermatofitów przez 2 okresy inkubacji (1 h i 24 h)
* Represja skuteczności produktów przez sterylną filtrację lub neutralizację.
* Kwantyfikacja poprzez posiew i liczenie dla różnych rozcieńczeń

Odseparowanie kremu Lamisil od mikroorganizmów poddawanych jego działaniu jest trudne z powodu wysokiej lepkości zawiesiny, która je zawiera. Próby zneutralizowania produktu okazały się nieskuteczne, a składnik aktywny przedostał się do kultury, w której grzyby, które przetrwały, powinny rozwijać się w celu ich policzenia. Dlatego wyniki dotyczące kremu Lamisil nie zostały poddane walidacji w takim zakresie, jak wyniki uzyskane dla pozostałych produktów.

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

7/11

**3 Wyniki**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Zastosowane stężenia** | **CFU (jednostki tworzące kolonię) startowe** | **CFU końcowe po 1 h** | **CFU końcowe po 24 h** |
| **ujemna próba kontrolna** |  | 46000 | 40000 | 40000 |
| **ujemna próba kontrolna - żel na grzybicę stóp** |  | 73000 | 37000 | 38000 |
| **Ujemna próba kontrolna - krem Lamisil** |  | 110000 | 95000 | 32000 |
| **Lucovitaal fungal nail 191130573** | 64% | 46000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 46000 | 200 | <1 |
| 0,64% | 46000 | 10000 | 78 |
| **Lucovitaal athlete foot spray 191130574** | 64% | 46000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 46000 | <1 | <1 |
| 0,64% | 46000 | 35000 | 22000 |
| **Lucovitaal athlete foot gel 191130575** | 64% | 73000 | <10 | <10 |
| 6,4% | 73000 | <10 | <10 |
| 0,64% | 73000 | 21000 | 12000 |
| **Naloc Tube 191130576** | 64% | 46000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 46000 | 22000 | 1400 |
| 0,64% | 46000 | 22000 | 36000 |
| **Lamsiil Spray 191130577** | 64% | 46000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 46000 | 14000 | 27000 |
| 0,64% | 46000 | 24000 | 36000 |
| **Lamisil Creme** | 64% | 110000 | <10 | <10 |
| 6,4% | 110000 | 40000 | 30000 |
| 0,64% | 110000 | 64000 | 44000 |

Tabela nr 3: CFU po zastosowaniu produktu na T. rubrum.

Dla produktu wykazano uzależniony od dawki spadek zdolności do rozwoju po zastosowaniu produktu.

Wszystkie trzy produkty Lucovitaaal dają spadek liczby jednostek tworzących kolonie w większym stopniu niż Naloc Tube i Lamisil w sprayu lub w żelu po 1 h, jak również po 24 h przy stężeniu 64% lub 6,4%. Przy najniższym stężeniu 0,64%, różnica jest mniej widoczna. Liczba rozwijających się grzybów spada również w próbie kontrolnej w związku z

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

8/11

obróbką i stratą w wyniku filtracji. Jednakże spadek przy zastosowaniu badanych produktów jest większy.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Zastosowane stężenia** | **CFU (jednostki tworzące kolonię) startowe** | **CFU końcowe po 1 h** | **CFU końcowe po 24 h** |
| **ujemna próba kontrolna** |  | 3 800 000 | 1 300 000 | 340 000 |
| **ujemna próba kontrolna - żel na grzybicę stóp** |  | 3 800 000 | 4 000 000 | 900 000 |
| **Ujemna próba kontrolna - krem Lamisil** |  | 4 300 000 | 4 700 000 | 1 700 000 |
| **Lucovitaal fungal nail 191130573** | 64% | 3 800 000 | <10 | <10 |
| 6,4% | 3 800 000 | 160 000 | 380 |
| 0,64% | 3 800 000 | 1 100 000 | 81 000 |
| **Lucovitaal athlete foot spray 191130574** | 64% | 3 800 000 | 360 | <10 |
| 6,4% | 3 800 000 | 600 | <10 |
| 0,64% | 3 800 000 | 1 500 000 | 300 000 |
| **Lucovitaal athlete foot gel 191130575** | 64% | 3 800 000 | <100 | <100 |
| 6,4% | 3 800 000 | 300 | <100 |
| 0,64% | 3 800 000 | 4 100 000 | 950 000 |
| **Naloc Tube 191130576** | 64% | 3 800 000 | 90 | <10 |
| 6,4% | 3 800 000 | 1 300 000 | 100 000 |
| 0,64% | 3 800 000 | 1 200 000 | 320 000 |
| **Lamsiil Spray 191130577** | 64% | 3 800 000 | 90 | <10 |
| 6,4% | 3 800 000 | 820 000 | 8 600 |
| 0,64% | 3 800 000 | 3 000 000 | 70 000 |
| **Lamisil Creme** | 64% | 4 300 000 | 900 000 | 1 500 000 |
| 6,4% | 4 300 000 | 3 200 000 | 1 200 000 |
| 0,64% | 4 300 000 | 4 200 000 | 1 200 000 |

Tabela nr 4: CFU po zastosowaniu produktu na T. mentagrophytes.

Dla produktu wykazano niemal idealny, uzależniony od dawki spadek zdolności do rozwoju po zastosowaniu produktu.

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

9/11

Wszystkie trzy produkty Lucovitaaal dają spadek liczby jednostek tworzących kolonie w większym stopniu niż Naloc Tube i Lamisil w sprayu lub w żelu po 1 h, jak również po 24 h przy stężeniu 64% lub 6,4%. Przy najniższym stężeniu 0,64%, różnica jest mniej widoczna. Liczba rozwijających się grzybów spada również w próbie kontrolnej w związku z obróbką i stratą w wyniku filtracji. Jednak spadek po zastosowaniu produktów badanych jest większy z wyjątkiem roztworów o ich najniższym stężeniu.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Zastosowane stężenia** | **CFU (jednostki tworzące kolonię) startowe** | **CFU końcowe po 1 h** | **CFU końcowe po 24 h** |
| **ujemna próba kontrolna** |  | 70 000 | 14 000 | 38 000 |
| **ujemna próba kontrolna - żel na grzybicę stóp i krem Lamisil** |  | 70 000 | 16 000 | 52 000 |
| **Lucovitaal fungal nail 191130573** | 64% | 70 000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 70 000 | 49 | <1 |
| 0,64% | 70 000 | 23 000 | 4 800 |
| **Lucovitaal athlete foot spray 191130574** | 64% | 70 000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 70 000 | <1 | <1 |
| 0,64% | 70 000 | 21 000 | 17 000 |
| **Lucovitaal athlete foot gel 191130575** | 64% | 70 000 | <10 | <10 |
| 6,4% | 70 000 | 150 | <10 |
| 0,64% | 70 000 | 52 000 | 22 000 |
| **Naloc Tube 191130576** | 64% | 70 000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 70 000 | 14 000 | <1 |
| 0,64% | 70 000 | 50 000 | 16 000 |
| **Lamsiil Spray 191130577** | 64% | 70 000 | <1 | <1 |
| 6,4% | 70 000 | 19 000 | 1 200 |
| 0,64% | 70 000 | 21 000 | 10 000 |
| **Lamisil Creme 191130578** | 64% | 70 000 | <10 | <10 |
| 6,4% | 70 000 | 100 000 | 20 000 |
| 0,64% | 70 000 | 69 000 | 58 000 |

Tabela nr 5: CFU po zastosowaniu produktu na Epidermophyton floccosum.

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

10/11

Dla produktu wykazano uzależniony od dawki spadek zdolności do rozwoju po zastosowaniu produktu.  
Wszystkie trzy produkty Lucovitaaal dają spadek liczby jednostek tworzących kolonie w większym stopniu niż Lamisil w sprayu lub w żelu po 1 h, jak również po 24 h przy stężeniu 64% lub 6,4%. Spadek ten jest nieco większy w porównaniu z produktem Naloc Tube. Przy najniższym stężeniu 0,64%, różnice są mniej widoczne. Liczba rozwijających się grzybów spada również w próbie kontrolnej w związku z obróbką i stratą w wyniku filtracji. Jednakże spadek przy zastosowaniu badanych produktów jest większy.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Zastosowane stężenia** | **CFU (jednostki tworzące kolonię) startowe** | **CFU końcowe po 1 h** | **CFU końcowe po 24 h** |
| **ujemna próba kontrolna** |  | 10 000 000 | 5 100 000 | 8 600 000 |
| **Lucovitaal fungal nail 191130573** | 64% | 10 000 000 | 630 | 150 |
| 6,4% | 10 000 000 | 830 000 | 170 000 |
| 0,64% | 10 000 000 | 5 400 000 | 3 200 000 |
| **Lucovitaal athlete foot spray 191130574** | 64% | 10 000 000 | <10 | 10 |
| 6,4% | 10 000 000 | 20 | 20 |
| 0,64% | 10 000 000 | 6 800 000 | 11 000 000 |
| **Naloc Tube 191130576700** | 64% | 10 000 000 | <10 | <10 |
| 6,4% | 10 000 000 | 7 700 000 | 2 700 000 |
| 0,64% | 10 000 000 | 6 800 000 | 16 000 000 |
| **Lamsiil Spray 191130577** | 64% | 10 000 000 | <10 | 270 |
| 6,4% | 10 000 000 | 7 700 000 | 12 000 000 |
| 0,64% | 10 000 000 | 6 800 000 | 13 000 000 |

Tabela nr 6: CFU po zastosowaniu produktu na candida albicans.

W przypadku wszystkich produktów stwierdzono uzależniony od dawki spadek liczby Candida. Produkty Lucovitaal ograniczają liczbę jednostek tworzących kolonie w nieco większym stopniu w porównaniu z Naloc Tube i Lamisil Spray. Staje się to bardziej widoczne przy drugim rozcieńczeniu produktów (6,4%). Produkt „Athlete Foot Spray” jest najskuteczniejszym spośród czterech produktów w przypadku grzybów Candida.

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy

PK Benelux BV



BTS1407/19

Badanie in vitro skuteczności trzech produktów w walce z grzybicą

11/11

4 Wnioski

Produkty badane jednoznacznie wykazują skuteczność w zwalczaniu T. rubrum, T. mentagrophytes, Epidermophyton floccosum i Candida albicans. Ponadto, w przypadku produktów Lucovitaal skuteczność była wyższa w porównaniu z Naloc Tube, jak i produktami Lamisil w sprayu i w żelu, ponieważ osłabiały one rozwój grzybów także przy niższych stężeniach.

Raport sporządził/a:

Dr Dirk Dressler

Esslingen, 23.01.2020  
Wyniki dotyczące grzybów Candida dodano dnia 3 lutego 2020 r.  
Literówki poprawiono dnia 6 lutego 2020 r.

BioTeSys GmbH, Esslingen, Niemcy