

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

REPORT EFFICACIA VIRUCIDA

Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida nei confronti del virus *SARS-CoV-2*

PRODOTTO:

dispositivo SANITY SYSTEM
di sanificazione degli ambienti (aria e superfici) con tecnologia ad Ozono

COMMITTENTE

Sanity System Italia Srl. Indirizzo: Via delle Industrie, 13/C – 35010 Limena (PD)
P.Iva e C.F. 04954700284

RESPONSABILE SCIENTIFICO

Prof. Andrea Crisanti

Collaboratori: dott.ssa Claudia Del Vecchio



Data Report: 02/11/2020

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

INDICE

1. SCOPO.....	3
2. TERMINI E DEFINIZIONI.....	3
3. INTRODUZIONE.....	3
4. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE.....	4
5. CONDIZIONI SPERIMENTALI.....	4
6. MATERIALI E REAGENTI.....	4
7. APPARECCHIATURE.....	5
8. PROVE PRELIMINARI.....	6
9. VERIFICA INATTIVAZIONE – PROVA CON FORMALDEIDE.....	7
10. VERIFICA DELL'ATTIVITA' VIRUCIDA DEI DISPOSITIVI.....	8
11. CALCOLO DELL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI.....	8
12. RISULTATI ED ATTIVITA' VIRUCIDA.....	9
13. CONCLUSIONE.....	9
14. RIFERIMENTI.....	10

1. SCOPO

Il seguente report ha la finalità di definire in modo chiaro e dettagliato le modalità di esecuzione e i risultati dello studio svolto per la verifica dell'attività virucida su superfici di strumentazione che utilizza l'ozono.

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Attività virucida o antivirale: capacità di un prodotto di produrre una riduzione del numero di particelle virali infettanti tramite procedure sperimentali che comprendono precise e definite condizioni di prova.

Unità Formanti Placche (PFU): numero di particelle virali infettanti per mL.

ID₅₀: dose infettante il 50% di sospensione virale o della diluizione della sospensione virale che induce nelle colture cellulare il 50% di effetto citotossico virale (CPE).

Effetto citotossico virale (CPE): alterazione morfologica delle cellule e/o la loro distruzione conseguente alla moltiplicazione del virus.

Inattivazione dei virus: riduzione dell'infettività di un virus nei confronti del prodotto in esame.

3. INTRODUZIONE

Il metodo di prova per verificare l'attività di inibizione virale (attività virucida) nei confronti del virus SARS-CoV-2 del dispositivo "Sanity System" (prodotto test) è stato eseguito presso il Dipartimento di Medicina Molecolare (Università di Padova). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in Laboratorio di Biosicurezza livello 3 (BSL3).

L'attività virucida è stata testata impiegando il ceppo di SARS-CoV-2. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in Laboratorio di Biosicurezza livello 3 (BSL3).

4. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE

Prodotto: Dispositivo "Sanity System"

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

Descrizione del prodotto: Sanity System, mod. SANYMED è un dispositivo di sanificazione professionale per eliminare batteri, muffe, virus, ed in genere la carica microbica oltre che inquinanti e odori

Condizioni di stoccaggio: temperatura ambiente

Istruzioni strumentazione: vedasi allegato

5. CONDIZIONI SPERIMENTALI

Temperatura test: è stato eseguito a $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tempo di contatto: secondo le indicazione del produttore

Periodo di Analisi: data inizio del test: 16-08-2020 ÷ Data fine test 30-09-2020

6. MATERIALI E REAGENTI

Microrganismi di prova:

SARS-CoV 2

Linea cellulare:

VERO E 6 (ATCC CCL-81)*

*ATCC (American Type Culture Collections)

Sospensione stock virale

Ogni sospensione virale è stata preparata e amplificata su larga scala in colture cellulari in monostrato. Dopo l'infezione e la moltiplicazione del virus, i detriti cellulari sono stati allontanati mediante doppia centrifugazione a bassa velocità (2500 rpm per 10 min), ed il surnatante, contenente il virus, è prelevato per determinare il titolo virale. È stato suddiviso in aliquote a titolo noto di 2 ml di volume in eppendorf e conservato alla temperatura di -80°C in congelatore.

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

Colture cellulari

Cellule VERO E6, cellule di origine epiteliale, provenienti da rene di scimmia (linea continua).

Supporti (carriers)

Sono stati impiegati dischi di acciaio INOX AISI 316 da 35 mm di diametro, preventivamente sterilizzati in autoclave.

MEZZI DI COLTURA E REAGENTI

I reagenti devono essere puri per analisi e/o adatti per applicazioni microbiologiche.

Terreno di coltura delle colture cellulari

Ogni linea cellulare è mantenuta in un termostato a 37°C con il 5% (v/v) di CO₂ in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionate con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) e 1% (p/v) di penicillina - streptomicina (pen- strep).

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Soluzione contenente: 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 2,89 g Na₂HPO₄ 12 H₂O, 0,20 g KH₂PO₄ in 1000 ml di H₂O distillata.

7. APPARECCHIATURE

- Microscopio invertito per l'osservazione delle colture cellulari
- Cronometro
- Agitatore Vortex
- Centrifuga
- Incubatore a CO₂ (5% v/v) in grado di mantenere la temperatura a 37°C ± 1°C.
- Cappa a flusso laminare verticale "BioHazard" classe II
- Congelatori

8. PROVE PRELIMINARI

PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE VIRALE - TITOLO VIRALE

0,2 ml di sospensione virale (soluzione madre) + 1,8 ml di DMEM serum-free sono stati miscelati e preparate diluizioni seriali da 10^{-2} a 10^{-9} (diluizioni 1:10).

250 μ l di ogni diluizione è stato trasferito in piastre a 24 pozzetti contenenti il monostrato cellulare a confluenza (>90%) dopo aspirazione del terreno di coltura. Ogni diluizione della sospensione virale è stata piastrata in sestuplo. Sono stati lasciati senza inoculo 12 pozzetti, (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (tempo di adsorbimento virale), l'inoculo è stato rimosso, effettuato un lavaggio con PBS e aggiunti 500 μ l di DMEM addizionati di 2% (v/v) FBS e 0,75% (v/v) di carbossimetilcellulosa.

Condizioni di incubazione in termostato

Le infezioni sono state poste in incubatore con il 5% (v/v) di CO₂ a 37°C \pm 1°C e osservate al microscopio invertito per rilevare la formazione di placche di lisi, causate dall'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. Sono state contate al microscopio invertito le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile dopo la fissazione con formaldeide e colorazione con una soluzione di cristalvioletto.

I risultati di CPE (prova quantitativa) di ogni diluizione sono espressi con la percentuale di risultati positivi compresa tra 100% e 0% e registrate come "0" per nessuna CPE e da "1" (25% CPE) a "4" (100% CPE) a seconda del grado di danno cellulare.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo Spaerman – Karber (valutazione ID₅₀).

9. VERIFICA INATTIVAZIONE – PROVA CON FORMALDEIDE

2 mL di sospensione virale sono stati miscelati con 8 mL di PBS e 10 mL di soluzione di formaldeide al 1,4 % (p/v) per controllare la validità del sistema. Immediatamente dopo un contatto di 30 min. e 60 minuti, 0,2 mL di questa soluzione sono stati miscelati a 1,8 mL di DMEM + 2% FBS in ghiaccio.

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

Sono state eseguite le diluizioni seriali da 10^{-2} a 10^{-6} (diluizioni 1:10) con PBS + 2% FBS. Per ogni diluizione sono stati distribuiti 250 μ l in 6 pozzetti della micropiastra da 24 pozzetti e poste incubatore a 37°C per 1 ora. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (tempo di adsorbimento virale), l'inoculo è stato rimosso, effettuato un lavaggio con PBS e aggiunti 500 μ l di DMEM addizionati di 2% (v/v) FBS e 0,75% (v/v) di carbossimetilcellulosa

La coltura cellulare è stata posta in incubatore al 5%(v/v) di CO₂ a 37°C \pm 1°C, e osservate al microscopio invertito per la rilevazione dell'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. Sono state contate le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile dopo la fissazione e la colorazione con la soluzione di cristalvioletto - metanolo. I risultati di CPE (prova quantitativa) di ogni diluizione sono espressi con la percentuale di risultati positivi compresa tra 100% e 0% e registrate come "0" per nessuna CPE e da "1" (25% CPE) a "4" (100% CPE) a seconda del grado di danno cellulare.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo Spaerman – Karber (valutazione ID₅₀).

Citotossicità della soluzione test della formaldeide

1 ml di formaldeide 1,4% (p/v) è stato aggiunto a 1 ml di PBS. Da questa diluizione sono state preparate le diluizioni seriali da 10^{-2} a 10^{-4} (diluizioni 1:10) prelevando 0.2 ml della miscela ottenuta + 1.8 ml DMEM serum-free.

0.1 ml di ogni diluizione è stata piastrata in sestuplo nelle colture cellulari in monostrato a confluenza (>90%). A 6 pozzetti non è stata aggiunta la miscela (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora a 37°C \pm 1°C sono stati aggiunti 100 μ l di DMEM + 10% FBS e la coltura cellulare è stata posta in incubatore a 37°C \pm 1°C, 5% di CO₂ ed osservata al microscopio invertito costantemente per i successivi 9 giorni per la rilevazione dell'effetto citopatico (CPE), causato dall'azione citotossica della soluzione di formaldeide.

10.VERIFICA DELL'ATTIVITA' VIRUCIDA DEI DISPOSITIVI

PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE VIRALE

Per la preparazione della sospensione test vedi paragrafo 8 - PROVE PRELIMINARI.

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

FASE DI ESPOSIZIONE

Preparazione dei carriers

I carriers, prima dell'utilizzo, sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 5 min. I carriers sono stati posizionati all'interno di piastre Petri vuote. Sia nei carriers di controllo che quelli esposti all'ozono sono stati posti 50 µl di sospensione virale, in seguito ben distribuita tramite l'utilizzo di un'ansa. La sospensione è stata posta ad asciugare sotto cappa a flusso laminare.

Carriers di controllo

I carriers di controllo sono stati tenuto in laboratorio con il coperchio della piastra Petri chiuso.

Carriers esposti all'ozono

I carriers da esporre all'ozono sono stati posti nella teca fornita, con il coperchio aperto, in posizione opposta rispetto alla localizzazione del dispositivo test, esponendoli all'azione della strumentazione Sanity System.

FASE DI RECUPERO

Recupero dei carriers

Tutti i carriers (esposti e controllo) sono stati eluiti con 1 mL di terreno di coltura. Successivamente i carriers sono stati sottoposti a scraping per 1 minuto. Sono state preparate le diluizioni seriali da 10^{-2} a 10^{-9} (diluizioni 1:10).

Plating e incubazione

250 µl di ogni diluizione è stato trasferito in piastre a 24 pozzetti contenenti il monostrato cellulare a confluenza (>90%) dopo aspirazione del terreno di coltura. Ogni diluizione della sospensione virale è stata piastrata in sestuplo. Sono stati lasciati senza inoculo 12 pozzetti (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (tempo di adsorbimento virale), l'inoculo è stato rimosso, effettuato

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

un lavaggio con PBS e aggiunti 500 µl di DMEM addizionati di 2% (v/v) FBS e 0,75% (v/v) di carbossimetilcellulosa.

11. CALCOLO DELL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Determinazione del titolo di infettività (ID₅₀).

L'attività infettante è stata determinata con il metodo Spaerman - Kärber, che utilizza la seguente formula per il calcolo del valore ID₅₀:

$$-\text{Log}_{10} \text{ID}_{50} = - (x_0) - \{ [R/100] - 0,5 \} \times \log_{10} \text{fattore di diluizione}$$

Dove:

x_0 = log₁₀ della diluizione più bassa con il 100% di reazione positiva

(CPE) R = sommatoria (%) delle colture positive

Il test dell'attività virucida è valido quando nelle prove preliminari si verifica tale condizione: la sospensione test virale deve presentare una concentrazione virale per determinare la riduzione di almeno 4 lg del titolo virale iniziale: **ID₅₀ = 10⁷ /mL.**

12. RISULTATI ED ATTIVITA' VIRUCIDA

Le prove sono state effettuate utilizzando i programmi P1 e P2. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1.

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

<i>Programma</i>	<i>Prova</i>	<i>Titolo virale iniziale*</i>	<i>Titolo virale dopo trattamento</i>	<i>% Riduzione</i>
P1	1	6.5	0.5	92.3
	2	6.6	0.4	93.9
P2	1	7.0	0.02	99.7
	2	7.0	0.01	99.9

Tabella 1 - Effetti del trattamento con Sanity System. I valori di riduzione della carica virale sono espressi sia in termine di unità logaritmiche che in termini percentuali; P1, programma 1, P2, programma 2.

Alla luce dei risultati ottenuti, le prove sono state ripetute nelle medesime condizioni impiegando esclusivamente il programma P2, i cui risultati sono riportati in Tabella 2.

<i>Programma</i>	<i>Prova</i>	<i>Titolo virale iniziale*</i>	<i>Titolo virale dopo trattamento</i>	<i>% Riduzione</i>
P2	3	7.0	0.01	99.9
	4	7.0	0.02	99.7
	5	7.0	0.05	99.3

Tabella 2 - Effetti del trattamento con Sanity System. I valori di riduzione della carica virale sono espressi sia in termine di unità logaritmiche che in termini percentuali.

*I dati esprimono il valore logaritmico delle unità formanti placca (PFU/ml) relative ad 1 mL di sospensione virale di prova

15. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti dimostrano che il dispositivo Sanity System (tecnologia basata sull'ozono) presenta una **efficace virucida nei confronti di SARS-CoV-2 con un abbattimento della carica virale superiore al 99% con il programma P2.**

16. RIFERIMENTI

- NORMA EUROPEA EN 17272:2020 Disinfettanti chimici e antisettici –Metodo per la disinfezione ambientale mediante processi automatici
- NORMA EUROPEA EN 14476:2019 Disinfettanti chimici e antisettici -Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica
- ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- ISO 15189:2012 Medical laboratories— Requirements for quality and competence

