

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

REPORT ATTIVITA' VIRUCIDA

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

PRODOTTO:

**Dispositivo per la sanificazione ambientale
Linea SANITEC – Modello: SANI TABLE PLUS**

COMMITTENTE

NANOPROJECT Srl

Sede legale:

Via Guelfa 5

40138 Bologna

Sede operativa:

Via Statale 264/A

44047 Sant'Agostino (FE)

Tel. 0532/84.86.16

CF/P.IVA: 03652931209

SDI: W7YVJK9

Data Report: 21/06/2021

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 DELDISPOSITIVO.....	8
11. RISULTATI.....	9
12. CONCLUSIONI.....	10
13. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	

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

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

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.

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. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE

Prodotto: **linea SANITEC – modello: SANI TABLE PLUS**

Descrizione del prodotto: Dispositivo elettronico per la sanificazione ambientale dotato di tecnologia trivalente brevettata (Fotocatalizzatore - Led UVC – Plasma Freddo).

4. CONDIZIONI SPERIMENTALI

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

Tempo di contatto: secondo le indicazioni del committente (1 ora di esposizione)

Periodo di Analisi: Data inizio test: 11/05/2021 ÷ Data fine test: 11/06/2021

5. MATERIALI E REAGENTI

Microorganismi 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.

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

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

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.

6. 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

7. 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 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.

Condizioni di incubazione in termostato

Le infezioni sono state poste in incubatore con il 5% (v/v) di CO₂ a 37°C ± 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.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo della conta delle placche (pfu/ml).

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. 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 µl 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 µl 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 ± 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.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo della conta delle placche (pfu/ml).

Citotossicità della soluzione test della formaldeide

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

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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sono stati aggiunti 100 μl di DMEM + 10% FBS e la coltura cellulare è stata posta in incubatore a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 5% di CO_2 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 DEL DISPOSITIVO

PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE VIRALE

Per la preparazione della sospensione test vedi paragrafo 7 - PROVE PRELIMINARI.

FASE DI ESPOSIZIONE

Preparazione dei carriers

I carriers, prima dell'utilizzo, sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 min. I carriers sono stati posizionati all'interno di piastre Petri vuote. Sia nei carriers di controllo che quelli esposti all'azione del dispositivo SANITEC SANITABLE PLUS sono stati posti 50 μl di sospensione virale (pari a 1×10^7 pfu/ml), 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 mantenuti al buio con il coperchio della piastra Petri chiuso.

Carriers esposti al dispositivo SANITEC - SANITABLE PLUS

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

I carriers da esporre al dispositivo **SANITEC - SANI TABLE PLUS** sono stati posti all'interno di una teca, in posizione opposta rispetto alla localizzazione del dispositivo test.

FASE DI RECUPERO

Recupero dei carriers

Tutti i carriers (esposti e controllo) sono stati eluiti con 199 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 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.

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

11. RISULTATI

Le prove sono state effettuate seguendo le indicazioni fornite dal committente. (NANOPROJECT Srl)

I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1.

TITOLO VIRALE INIZIALE (pfu/ml)	TITOLO VIRALE CONTROLLI (pfu/ml)	REPLICHE	TITOLO VIRALE DOPO IL TRATTAMENTO (pfu/ml)	% RIDUZIONE
1x10 ⁷	1x10 ⁷	PROVA I	<10 ¹	99,99
	1x10 ⁷	PROVA II	<10 ¹	99,99
	1x10 ⁷	PROVA III	<10 ¹	99,99

*Tabella 1 - Effetti del trattamento con il dispositivo **SANITEC – SANI TABLE PLUS***

12. CONCLUSIONE

I test condotti hanno evidenziato che il dispositivo **SANITEC – SANI TABLE PLUS** presenta, dopo un'ora di trattamento, un'efficacia virucida pari al 99,99% nei confronti di SARS-CoV-2.

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

13. 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
- Si ricorda che:
- 1. Il sigillo istituzionale dell'Università è di proprietà esclusiva dell'Università di Padova.
- 2. Ai sensi dell'art.12 del Regolamento per le attività eseguite dall'Università degli Studi di Padova a fronte di contratti o di accordi con soggetti pubblici o privati, l'eventuale utilizzo del nome o dei segni distintivi dell'Università da parte di terzi deve essere oggetto di specifici accordi approvati dal Consiglio di amministrazione e dal Senato Accademico compatibili con la tutela dell'immagine dell'Ateneo.
- 3. Qualora il Committente, intenda immettere in commercio o comunque utilizzare a scopi commerciali, i risultati o parte di essi, il Committente medesimo dovrà intendersi come unico responsabile degli eventuali danni, diretti o indiretti, a qualunque titolo derivanti dalle attività connesse alla immissione in commercio o, comunque, all'utilizzazione commerciale da parte di terzi dei suddetti Risultati, senza che alcuna pretesa possa essere avanzata nei confronti dell'Università.

Il Responsabile Scientifico

(dott.ssa Claudia Del Vecchio)



Il Direttore del Dipartimento

(Prof Andrea Crisanti)



