



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:

**JONIX CUBE**  
un dispositivo di purificazione dell'aria

### COMMITTENTE

**Jonix S.r.l.** Indirizzo: Viale Spagna, 31/33 - 35020 Tribano (PD)  
P.Iva e C.F. 04754080283

### RESPONSABILE SCIENTIFICO:

Prof. Andrea Crisanti

**Collaboratori:** dott.ssa Claudia Del Vecchio, dott.ssa Manuela Sciro, dott. Di Pietra Giuseppe

Data Report: 22/09/2020

## 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. EFFICACIA VIRUCIDA .....	9
13. RISULTATI ED ATTIVITA' VIRUCIDA .....	9
15. CONCLUSIONE .....	9
16. 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 la tecnologia del plasma freddo (Non Thermal Plasma) emettendo specie ossidanti.

## 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.

**ID<sub>50</sub>:** 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

Al fine di garantire la massima precisione e accuratezza il test è stato eseguito in conformità alla norma EN 14476:2019 "Disinfettanti chimici e antisettici- prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica- Metodo di prova e requisiti (Fase2/Stadio1)" e alla norma EN 17272:2020 "Disinfettati chimici e antisettici: metodi di disinfezione dell'aria indoor attraverso processi automatizzati – Determinazione delle attività battericida, micobattericida, sporicida, fungicida, lievicida , virucida e fagocita" (limitatamente all'utilizzo dei supporti metallici descritti).

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).

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

#### 4. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE

Prodotto: Dispositivo Non thermal Plasma Jonix Cube (di seguito denominata Jonix Cube)

Descrizione del prodotto: Jonix CUBE è un dispositivo di purificazione dell'aria; di design che sfrutta una tecnologia avanzata chiamata a plasma freddo per eliminare batteri, muffe, virus, 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: 30'-60'-120'-240'

Periodo di Analisi: data inizio del test: 01-08-2020 ÷ Data fine test 01-09-2020

#### 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*

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

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**

Ogni linea cellulare è mantenuta in un termostato a 37°C con il 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> 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 - streptomina (pen- strep).

#### **Phosphate Buffered Saline (PBS)**

Soluzione contenente: 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 2,89 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O, 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml di H<sub>2</sub>O distillata.

## **7. APPARECCHIATURE**

- Microscopio invertito per l'osservazione delle colture cellulari
- Cronometro
- Agitatore Vortex

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

- Centrifuga
- Incubatore a CO<sub>2</sub> (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<sup>-2</sup> a 10<sup>-9</sup> (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 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 CO<sub>2</sub> 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.

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 ID<sub>50</sub>).

## 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 CO<sub>2</sub> 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 ID<sub>50</sub>).

### 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 aggiunto la miscela (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora a 37°C  $\pm$  1°C sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di DMEM + 10% FBS e la coltura cellulare è stata posta in incubatore a 37°C  $\pm$  1°C, 5% di CO<sub>2</sub> 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.

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

## 10. VERIFICA DELL'ATTIVITÀ VIRUCIDA DEI DISPOSITIVI

Il test virucida è stato eseguito a 20°C.

50 µl di sospensione virale sono stati inoculati su ogni carrier e lasciati asciugare sotto cappa a flusso laminare. I dischi così inoculati sono stati impiegati per la verifica dell'attività virucida esponendoli all'azione della strumentazione Jonix Cube, oppure lasciati all'interno di capsule petri usandoli come dischi di controllo. I dischi trattati sono stati collocati all'interno di un apposito box contenente il dispositivo Jonix ed esposti alla sua azione per un tempo pari a 30'-60'-120'-240'. Successivamente, i dischetti (trattati e di controllo) sono stati eluiti con 1 ml di terreno di coltura e preparate diluizioni seriali da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-9</sup> (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 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 (ID<sub>50</sub>).**

L'attività infettante è stata determinata con il metodo Spearman - Kärber, che utilizza la seguente formula per il calcolo del valore ID<sub>50</sub>:

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

Dove:

$x_0$  = log<sub>10</sub> della diluizione più bassa con il 100% di reazione positiva

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

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

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:  $ID_{50} = 10^7 / \text{mL}$ .

## 12. EFFICACIA VIRUCIDA

Il prodotto in esame è considerato **VIRUCIDA** quando a 20°C, dopo il tempo di contatto preso in esame, dimostra una **riduzione della vitalità di almeno  $10^4$** , corrispondenti a una riduzione pari 4 logaritmi (99,99%) nei confronti del ceppo virale test (EN 14476:2019 e EN 17272:2020).

## 13. RISULTATI ED ATTIVITA' VIRUCIDA

I risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella

*Tabella 1 – Effetti del trattamento con Jonix CUBE. I valori di riduzione della carica virale sono espressi sia in termine di unità logaritmiche che in termini percentuali.*

Tempo di esposizione (minuti)	Controlli		Trattati		Riduzione	
	PFU/ml	log(PFU/ml)	PFU/ml	log(PFU/ml)	U <sub>logaritmiche</sub>	%
0	10.000.000	7	10.000.000	7	0	0
30	10.000.000	7	1,07	0,03	6,97	99,99999
60	10.000.000	7	1,02	0,01	6,99	99,99999
120	10.000.000	7	1,02	0,01	6,99	99,99999
240	10.000.000	7	1,02	0,01	6,99	99,99999

## 15. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti dimostrano che il dispositivo Jonix Cube (tecnologia Non Thermal Plasma (NTP)) presenta una **efficace attività antivirale nei confronti di SARS-CoV-2 con un abbattimento della carica virale pari al 99,99999% (circa 7 unità logaritmiche) dopo soli 30 minuti di esposizione; ciò lascia supporre che il raggiungimento del livello di abbattimento richiesto dalle norme tecniche (4 unità logaritmiche) possa occorrere anche per tempi considerevolmente minori.**

## 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