



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Ricerca Traslazionale
e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia
Via Savi, 10 - 56126 PISA
Tel. 050 2211828 – Fax 050 2210624

Valutazione dell'attività virucida di una formulazione disinfettante

(EN14476:2015)

Settembre 2020

Coordinatore dello Studio:

Prof. Mauro Pistello

Progetto ed Esecuzione dello Studio

Dott.ssa Paola Quaranta

Scopo dello Studio. Il presente report descrive uno studio eseguito per valutare l'attività virucida di una formulazione SaniJet Clean (DAMAMED s.r.l., Via Speranza 42, 40068 San Lazzaro di Savena, Bologna). Lo studio è stato condotto secondo la procedura descritta di seguito, valutando l'attività antivirale nei confronti di Coronavirus SARS-COV2.

Formulazione disinfettante in esame. La formulazione disinfettante SaniJet Clean saggiata nel presente studio è stata fornita direttamente dal distributore (DAMAMED s.r.l., Via Speranza 42, 40068 San Lazzaro di Savena, Bologna) in forma solida confezioni singole da 5 gr. Sulla base della dichiarazione del produttore, il principio attivo della formulazione è perossimonosolfato di potassio. La formulazione disinfettante è stata saggiata alle diluizioni: 1%, 0,5% e 0,1%. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo il prodotto in H₂O dura.

Condizioni dello Studio

Lo studio è stato condotto in condizioni di pulito (concentrazione finale nel saggio: 0,3gr di siero albumina bovina (BSA) per litro d'acqua).

In breve, il metodo di valutazione eseguito nel presente studio è stato il seguente. Un'aliquota della sospensione virale è stata aggiunta al prodotto valutato in condizioni di pulito. La miscela virus-formulazione disinfettante è stata mantenuta a 20C° (±1) per i tempi di incubazione selezionati. Dopo incubazione, un'aliquota è stata immediatamente raccolta e sono state preparate delle diluizioni in ragione di 10 (fino a 10⁻⁷) in DMEM che sono state trasferite in una micropiastre da 96 pozzetti in cui precedentemente sono state seminate le cellule in 100 µl di terreno di coltura (DMEM).

Il titolo infettante è stato successivamente calcolato mediante valutazione della ID₅₀ (diluizione della sospensione virale che è capace di indurre effetto citopatico nel 50%dei pozzetti). In sintesi, sono state adottate le seguenti condizioni sperimentali:

- Concentrazione SaniJet Clean testate 1%, 0,5% e 0,1%.
- Test in condizioni di pulito
- Temperatura: 20°C
- Tempi di contatto 45 sec, 60 sec 10 min e 20 min



Colture cellulari e sospensione virale stock. Nel presente studio è stato utilizzato l'isolato clinico SARS-COV-2 P-MI-0520 che presenta elevata attività citocida in vitro e contro svariati tipi cellulari. Gli stock di sospensione virale sono stati ottenuti infettando monostrati cellulari di Vero E6 confluenti all'80% coltivate in presenza di D-MEM supplementato con 5% di FCS. In presenza di effetto citopatico maggiore dell'80%, cellule e supernatanti sono stati raccolti e sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento e successiva centrifugazione a 400 g x 15 min per scartare i detriti cellulari. Il titolo virale è stato determinato mediante metodo della diluizione limite eseguito su cellule Vero E6 seminate in piastre da 96 pozzetti. Brevemente, le cellule confluenti sono state infettate in ottuplicato con 50 µl di diluizioni seriali 1/10 della sospensione virale le cellule sono state mantenute in incubazione per quattro giorni a 37 C° in incubatore a CO₂. Alla fine del tempo di incubazione è stato valutato l'effetto citopatico ed il titolo virale è stato determinato mediante il metodo di Spearman-Karber.

Validazione della procedura. Effetto citotossico della formulazione disinfettante e della capacità del virus a replicare in cellule trattate vs cellule non trattate.

Per la validazione dello studio, 1 parte di acqua dura sterile, 1 parte di soluzione di albumina sierica bovina [BSA] (0,3 gr/l) sono state aggiunte a 8 parti di formulazione in esame. Successivamente, sono state preparate diluizioni in ragione 10 in DMEM che sono state inoculate in monostrati di Vero E6. Ogni modifica microscopica ad ogni diluizione è stata registrata e successivamente valutata. Infine, i titoli virali sono stati valutati comparativamente in cellule precedentemente trattate con la prima diluizione non citotossica della formulazione o non trattate.

Test inattivazione del virus con sostanza di riferimento. Come controllo del test è stata utilizzata formaldeide. Nel saggio di controllo 10 parti di formaldeide (1,4%V/V) sono state mescolate con 2 parti della sospensione virale e 8 parti di phosphate buffered saline (PBS).

I tempi di contatto sono stati 30 e 60 minuti. Al termine dell'incubazione 0,2 ml della miscela sono stati pipettati in un tubo contenente 1,8 ml di DMEM freddo + 5% FCS con successive diluizioni fino a 10^{-7} .

Saggio dell'attività virucida. Dopo preparazione del prodotto in esame e della sostanza interferente, 1 parte della sospensione virale è stata aggiunta a 1 parte di sostanza interferente e 8 parti del prodotto in esame. Immediatamente al termine del tempo di contatto, sono state preparate diluizioni fino a 10^{-7} e l'infettività virale è stata valutata come descritto precedentemente mediante calcolo della ID_{50} per ml.

Verifica della metodologia. Il test è stato considerato valido se venivano rispettati i seguenti criteri:

- La sospensione virale utilizzata ha un titolo $\geq 10^8$ ID_{50}/ml o possiede una concentrazione che consente di valutare di una caduta di titolo di $4 \log_{10}$;
- La riduzione di titolo rilevabile è di almeno $4 \log_{10}$;
- La differenza di titolo tra controllo virale e sistema inattivante di riferimento è tra $10^{-0,5}$ e $10^{-2,5}$ dopo 30 minuti e 10^{-2} e $10^{-4,5}$ dopo 60 minuti;
- La citotossicità del prodotto non influisce sulla morfologia cellulare e sulla replicazione virale alla diluizione necessaria per ottenere una diminuzione di $4 \log_{10}$ del titolo virale;
- La differenza di titolo virale tra le cellule trattate con le sole diluizioni della formulazione o con tampone fosfato salino è inferiore a $1 \log_{10}$.

Risultati dello Studio

Le sospensioni virali stock utilizzate sono costituite dall'isolato clinico P-MI-0520 SARS-CoV-2 alla concentrazione 10^8 $TCID_{50}/ml$. Per valutare la più alta concentrazione della formulazione in esame non tossica per le cellule, questa è stata saggiata in diluizioni con fattore 10 dalla concentrazione d'uso alla diluizione 10^{-11} seminate in monostrati cellulari confluenti all'80%. Tale concentrazione è risultata essere 10^{-1} ossia pari a 0,1% peso/volume.

Il saggio per misurare l'attività antivirale è stato allestito utilizzando il preparato alla concentrazione di 0,125%. La concentrazione leggermente superiore iniziale tiene conto che la preparazione è poi ulteriormente diluita del 20% prima dell'infezione del monostrato cellulare. Il test è stato approntato nel rispetto di parametri e condizioni elencati nel paragrafo "Verifica della Metodologia".

L'attività della formulazione in esame è stata valutata in condizioni di pulito (concentrazione finale nel saggio: 0,3 gr di siero albumina bovina (BSA) per litro d'acqua). I tempi di contatto virus-preparazione sono stati: 45 sec, 60 sec, 10 min e 20 min. I test sono stati eseguiti a 20 C° .

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti in termini di titolo virale dopo trattamento con la formulazione in esame alla concentrazione di 0,1%

MP

PA

SaniJet Clean 1% condizioni di pulito

| Tempo di contatto | Titolo SARS-CoV-2 | Decremento del titolo virale |
|-------------------|-------------------|------------------------------|
| 0 sec | 6,74 | == |
| 45 sec | 0,50 | 6,24 |
| 60 sec | 0,50 | 6,24 |
| 10 min | 0 | 6,74 |
| 20 min | 0 | 6,74 |

*logaritmo TCID₅₀

SaniJet Clean 0,1% condizioni di pulito

| Tempo di contatto | Titolo SARS-CoV-2 | Decremento del titolo virale |
|-------------------|-------------------|------------------------------|
| 0 sec | 7,00 | == |
| 45 sec | 3,50 | 3,50 |
| 60 sec | 3,00 | 4,00 |
| 10 min | 3,00 | 4,00 |
| 20 min | 3,00 | 4,00 |

*logaritmo TCID₅₀

SaniJet Clean 0,001% condizioni di pulito

| Tempo di contatto | Titolo SARS-CoV-2 | Decremento del titolo virale |
|-------------------|-------------------|------------------------------|
| 0 sec | 6,60 | == |
| 45 sec | 4,00 | 2,60 |
| 60 sec | 4,00 | 2,60 |
| 10 min | 4,00 | 2,60 |
| 20 min | 4,00 | 2,60 |

*logaritmo TCID₅₀

Come mostrato in tabella, la formulazione a base di perossimonosolfato di potassio fornita da SaniJet Clean e disciolta in acqua dura è in grado di abbattere l'infettività virale di SARS-CoV-2 di 4 log quando saggiata alla diluizione dello 0,1% in condizioni di pulito e per un tempo di incubazione ≥ 60 secondi.

Conclusioni

Il prodotto SaniJet Clean fornito da DAMAMED e testato in condizioni di pulito soddisfa i requisiti della norma ISO EN14476:2015.

Data 31/10/2020

Firma


Pado Querante