

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

VIRUCIDINIO EFEKTYVUMO ATASKAITA

Kiekybinis tyrimas suspensijoje, siekiant įvertinti virucidinį aktyvumą
prieš SARS-CoV-2 virusą

GAMINYS:

JONIX CUBE
oro valymo prietaisas

KLIENTAS

Jonix S.r.l.. Adresas: Viale Spagna, 31/33 - 35020 Tribano (PD)
PVM ir mokesčių mokėtojo kodas 04754080283

MOKSLINIS VADOVAS:

Prof. Andrea Crisanti

Moksliniai asistentai: dr. Claudia Del Vecchio, dr. Manuela Sciro, dr. Di Pietra Giuseppe

Ataskaitos data: 2020-09-22

TURINYS

1. TIKSLAS	3
2. SĄVOKOS IR APIBRĖŽTYS	3
3. ĮVADAS	3
4. MĖGINIO APIBŪDINIMAS	4
5. TYRIMO SĄLYGOS	4
6. MEDŽIAGOS IR REAGENTAI	4
7. ĮRANGA	5
8. PRELIMINARŪS BANDYMAI	6
9. INAKTYVACIJOS PATIKRINIMAS. BANDYMAS SU FORMALDEHIDU	7
10. PRIETAISŲ VIRUCIDINIO POVEIKIO PATIKRINIMAS	8
11. REZULTATŲ IŠREIŠKIMO SKAIČIAVIMAI	8
12. VIRUCIDINIS EFEKTYVUMAS	9
13. REZULTATAI IR VIRUCIDINIS POVEIKIS	9
15. IŠVADOS	9
16. NUORODOS	10

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

1. TIKSLAS

Šios ataskaitos tikslas yra aiškiai ir išsamiai apibūdinti taikytus tyrimo metodus ir rezultatus, vertinant prietaiso, naudojančio šaltosios plazmos (ne terminės plazmos) technologiją, emituojančią oksiduojančias medžiagas, virucinį poveikį ant paviršių.

2. SAŲOKOS IR APIBRĖŽTYS

Virucidinis ar antivirusinis poveikis: gaminio gebėjimas sumažinti infekuojančių virusinių dalelių skaičių atliekant bandymus tiksliais ir apibrėžtomis sąlygomis.

Plokšteles formuojantys vienetai (PFU): infekuojančių virusinių dalelių skaičius mililitre.

ID₅₀: virusinės suspensijos arba praskiestos virusinės suspensijos dozė, kuri ląstelių kultūrose sukelia 50% virusinį citotoksinį poveikį (CPE).

Virusinis citotoksinis poveikis (CPE - citopatologinis poveikis): morfologinis ląstelių pakitimas ir (arba) sunaikinimas po viruso dauginimosi.

Virusų inaktyvavimas: gaminio sukiamas viruso užkrečiamumo sumažėjimas.

3. ĮVADAS

Siekiant užtikrinti maksimalų tikslumą, tyrimas buvo atliktas laikantis standarto EN 14476:2019 „Cheminiai dezinfekantai ir antiseptikai. Kiekybinis suspensijos tyrimas virucidiniam aktyvumui medicinos srityje įvertinti. Tyrimo metodas ir reikalavimai (2 fazė, 1 pakopa)“ ir standarto EN 17272:2020 „Cheminiai dezinfekantai ir antiseptikai. Automatizuoto patalpų dezinfekavimo oru pernešama priemone metodai. Baktericidinio, mikobaktericidinio, sporicidinio, fungicidinio, virucidinio, fagocidinio ir mielių naikinimo aktyvumo nustatymas“ (apribojant iki aprašytų naudojamų metalinių pagrindų).

Virucidinis poveikis buvo išbandytas naudojant SARS-CoV-2 virusą. Visi eksperimentai buvo atlikti 3 lygio biologinės saugos laboratorijoje (BSL3).

4. MĖGINIO APIBŪDINIMAS

Gaminys: „Jonix Cube“ ne terminės plazmos prietaisas (toliau tekste – „Jonix Cube“)

Gaminio aprašymas: „Jonix CUBE“ yra oro valymo prietaisas, kuriame bakterijoms, pelėsiams, virusams, teršalams ir kvapams šalinti naudojama pažangi technologija, vadinama šalta plazma

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

Laikymo sąlygos: kambario temperatūroje

Prietaiso instrukcija: žr. pridėtą failą

5. BANDYMŲ SĄLYGOS

Bandymų temperatūra: bandymai atlikti + 20 °C ± 1 °C temperatūroje.

Kontakto laikas: 30'-60'-120'-240'

Analizės laikotarpis: bandymų pradžios data 2020-08-01 ÷ bandymų pabaigos data 2020-09-01

6. MEDŽIAGOS IR REAGENTAI

Bandymų mikroorganizmai:

SARS-CoV-2

Ląstelių kultūra:

VERO E 6 (ATCC CCL-81) *

* ATCC (American Type Culture Collections)

Virusų suspensija

Kiekviena virusų suspensija buvo paruošta ir jos koncentracija dideliu mastu padidinta vienasluoksnėse ląstelių kultūrose. Po užkrėtimo virusu ir jo pasidauginimo ląstelių liekanos buvo pašalintos du kartus centrifuguojant mažomis apsuksomis (2500 aps./min. 10 min.), o supernatantas su virusais paimtas titrui nustatyti. Jis buvo padalintas į alikvotines 2 ml žinomo titro dalis Eppendorfe ir laikomas -80 °C temperatūroje šaldiklyje.

Ląstelių kultūros

VERO E6 ląstelės, epitelio kilmės ląstelės paimtos iš beždžionės inksto (viena kultūra).

Pagrindai

Buvo naudojami iš anksto autoklave sterilizuoti 35 mm skersmens AISI 316 nerūdijančiojo plieno diskai.

KULTŪROS TERPĖS IR REAGENTAI

Reagentai turi būti švarūs analizei ir (arba) tinkami mikrobiologiniam naudojimui.

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

Ląstelių kultūros terpė

Kiekviena ląstelių kultūra laikoma termostate 37 °C temperatūroje 5 % (pagal tūrį) CO2 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) terpėje, papildytoje 10 % (pagal tūrį) galvijų vaisiaus serumo (FBS) ir 1 % (masė tūryje) penicilino - streptomicino (pen-strep).

Fosfatinis buferinis druskos tirpalas (PBS)

Tirpalas, kurio sudėtis: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,89 g Na₂HPO₄ 12 H₂O, 0,20 g KH₂PO₄ esančių 1000 ml distiliuoto H₂O.

7. ĮRANGA

- Invertuotas mikroskopas ląstelių kultūrų stebėjimui
- Chronometras
- Sūkurinis maišytuvas
- Centrifuga
- CO2 inkubatorius (5 % pagal tūrį), galintis palaikyti 37 °C ± 1 °C temperatūrą
- „BioHazard“ II klasės vertikalaus laminarinio srauto gaubtas
- Šaldikliai

8. PRELIMINARŪS BANDYMAI

VIRUSINĖS SUSPENSIJOS PARUOŠIMAS, VIRUSŲ TITRAS

Buvo sumaišyta 0,2 ml virusinė suspensijos (pradinis tirpalas) + 1,8 ml DMEM be serumo ir paruošta nuo 10⁻² iki 10⁻⁹ (1:10 skiedimai) tirpalų serija.

Po 250 μl kiekvieno tirpalo buvo perkelta į 24 duobučių plokšteles su ląstelių monosluoksniu (> 90 %) po auginimo terpės išsiurbimo. Kiekvienas virusinės suspensijos tirpalas buvo panaudotas šešiose duobutėse. 12 duobučių palikta neužsėtos (kontrolinė ląstelių kultūra). Po 1 valandos inkubavimo 37 °C temperatūroje (viruso adsorbcijos laikas) inokulatas buvo pašalintas, nuplautas su PBS ir pridėta 500 μl DMEM su 2 % (pagal tūrį) FBS ir 0,75% (pagal tūrį) karboksimetilceliuliozės.

Inkubavimo termostate sąlygos

Infekcijos buvo inkubuojamos su 5 % (pagal tūrį) CO2 37 °C ± 1 °C temperatūroje ir stebimos invertuotu mikroskopu, siekiant aptikti virusų suspensijos citopatinio poveikio (CPE) sukiamą plokštelių formavimąsi.

Po fiksavimo formaldehidu ir nudažymo kristaliniu violetiniu tirpalu atitinkamos koncentracijos duobutėse esančios plokštelės suskaičiuotos naudojant invertuotą mikroskopą.

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

Kiekvieno tirpalo CPE (kiekybinis bandymas) rezultatai išreikšti teigiamų rezultatų procentine dalimi nuo 100 % iki 0 %, ir užregistruoti kaip 0, jei CPE nėra, ir nuo 1 (25 % CPE) iki 4 (100 % CPE), priklausomai nuo ląstelių pažeidimo laipsnio.

Virusinis titras buvo apskaičiuotas taikant Spaermano-Karberio metodą (ID₅₀ įvertinimas).

9. INAKTYVACIJOS PATIKRINIMAS. BANDYMAS SU FORMALDEHIDU

Kad būtų galima patikrinti sistemos pagrįstumą, 2 ml virusinės suspensijos buvo sumaišyta su 8 ml PBS ir 10 ml 1,4% (masė tūryje) formaldehido tirpalo. Iškart po 30 minučių ir 60 minučių kontakto, 0,2 ml šio tirpalo lede sumaišyta su 1,8 ml DMEM + 2% FBS. Buvo atlikti serijiniai skiedimai nuo 10⁻² iki 10⁻⁶ (1:10 skiedimai) su PBS + 2% FBS. 250 μl iš kiekvieno skiedimo buvo paskirstyta į 6 duobutes 24 dubučių mikroplokštelėje ir 1 valandai padėta į 37 °C temperatūros inkubatorių. Po 1 valandos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje (viruso adsorbcijos laikas) inokulatas buvo pašalintas, nuplautas su PBS ir pridėta 500 μl DMEM su 2 % (pagal tūrį) FBS ir 0,75% (pagal tūrį) karboksimetilceliuliozės.

Ląstelių kultūros buvo patalpintos į inkubatorių su 5 % (pagal tūrį) CO₂ 37 °C ± 1 °C temperatūroje ir stebimos invertuotu mikroskopu, siekiant aptikti virusų suspensijos citopatinį poveikį (CPE).

Po fiksavimo ir nudažymo kristaliniu violetiniu metanolio tirpalu atitinkamos koncentracijos duobutėse esančios plokštelės suskaičiuotos. Kiekvieno tirpalo CPE (kiekybinis bandymas) rezultatai išreikšti teigiamų rezultatų procentine dalimi nuo 100 % iki 0 %, ir užregistruoti kaip 0, jei CPE nėra, ir nuo 1 (25 % CPE) iki 4 (100 % CPE), priklausomai nuo ląstelių pažeidimo laipsnio.

Virusinis titras buvo apskaičiuotas taikant Spaermano-Karberio metodą (ID₅₀ įvertinimas).

Bandomojo formaldehido tirpalo citotoksiškumas

Į 1 ml PBS buvo įpilta 1 ml 1,4% (masė tūryje) formaldehido. Iš šio tirpalo buvo paruošti serijiniai skiedimai nuo 10⁻² iki 10⁻⁴ (1:10 skiedimai), imant 0,2 ml gauto mišinio + 1,8 ml DMEM be serumo.

0,1 ml kiekvieno skiedimo buvo sulašinta į šešiose duobutėse esančias vienasluoksnes ląstelių kultūras (> 90 %). Į 6 duobutes mišinio neįlašinta (kontrolinė ląstelių kultūra). Praėjus 1 valandai 37 °C ± 1 °C temperatūroje, buvo pridėta 100 μl DMEM + 10 % FBS, tada ląstelių kultūra patalpinta į 37 °C ± 1 °C temperatūros inkubatorių su 5 % CO₂ ir nuolat stebima invertuotu mikroskopu 9 dienas, siekiant aptikti formaldehido tirpalo citotoksiškumo sukiamą citopatinį poveikį (CPE).

10. PRIETAISŲ VIRUCIDINIO POVEIKIO PATIKRINIMAS

Virucidinis bandymas buvo atliktas 20 °C temperatūroje.

50 µl virusinės suspensijos buvo inokuliuota ant kiekvieno pagrindo ir palikta išdžiūti po laminarinio srauto gaubtu. Inokuliuoti diskai buvo naudojami „Jonix Cube“ prietaiso virucidiniam poveikiui patikrinti arba palikti Petri lėkštelėse kaip kontroliniai diskai. Apdoroti diskai buvo patalpinti į specialią dėžę, kurioje buvo „Jonix“ prietaisas, ir jo veikiami 30, 60, 120 ir 240 min. Vėliau diskai (tiek apdoroti, tiek kontroliniai) buvo nuplauti 1 ml kultūros terpės ir paruošti nuoseklūs nuo 10⁻² iki 10⁻⁹ (1:10 skiedimai) skiedimai. Po 250 µl kiekvieno tirpalo buvo perkelta į 24 duobučių plokštes su ląstelių monosluoksniu (> 90 %) po kultūros terpės išsiurbimo. Kiekvienas virusinės suspensijos tirpalas buvo įlašintas į šešias duobutes. 12 duobučių palikta neužsėtos (kontrolinė ląstelių kultūra). Po 1 valandos inkubacijos 37 °C temperatūroje (viruso adsorbcijos laikas) inokulatas buvo pašalintas, nuplautas su PBS ir pridėta 500 µl DMEM su 2 % (pagal tūrį) FBS ir 0,75% (pagal tūrį) karboksimetilceliuliozės.

11. REZULTATŲ IŠREIŠKIMO SKAIČIAVIMAI

Infekcinio titro (ID₅₀) nustatymas.

Infekcinis aktyvumas buvo nustatytas naudojant Spaermano-Kärberio metodą, pagal kurį ID₅₀ vertei apskaičiuoti naudojama ši formulė:

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

Kur:

x_0 = log₁₀ mažiausias skiedimas su 100 % teigiamą reakcija
(CPE) R = teigiamų kultūrų suma (%)

Virucidinio poveikio bandymas galioja, kai atliekant preliminarius bandymus tenkinama ši sąlyga: bandomojoje virusinėje suspensijoje turi būti virusų koncentracija, leidžianti nustatyti mažiausiai 4 lg pradinio viruso titro sumažėjimą: **ID₅₀ = 10⁷/mL**.

12. VIRUCIDINIS EFEKTYVUMAS

Tirtas gaminy 20 °C temperatūroje, praėjus tirtam poveikio laikui, laikomas **VIRUCIDINIŲ**, jis sukelia **mažiausiai 10⁴ kartų virusų skaičiaus sumažėjimą**, tai atitinka 99,99% virusų išnaikinimą, lyginant su lyginamąja virusų kultūra (EN 14476: 2019 ir EN 17272: 2020).

13. REZULTATAI IR VIRUCIDINIS POVEIKIS

Gauti rezultatai parodyti toliau pateiktoje lentelėje

1 lentelė. Apdoravimo naudojant „Jonix CUBE“ poveikis. Virusinės apkrovos sumažėjimo vertės išreikštos tiek logaritminiais vienetais, tiek procentais.

Poveikio laikas (minutės)	Kontrolinis mėginys		Apdorotas mėginys		Sumažėjimas	
	PFU/ml	log(PFU/ml)	PFU/ml	log(PFU/ml)	Ulogaritminis	%
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

14. IŠVADA

Gauti rezultatai rodo, kad prietaisas „Jonix Cube“ (ne terminės plazmos technologija (NTP)) yra veiksmingas prieš SARS-CoV-2, jis vos per 30 minučių sumažina virusų koncentraciją 99,99999 % (maždaug 7 logaritminiai vienetai); tai rodo, kad techniniuose standartuose reikalaujamas sumažėjimas (4 logaritminių vienetų) gali būti pasiektas per gerokai trumpesnį laiką.

15. NUORODOS

- EUROPOS STANDARTAS EN 17272: 2020 Cheminiai dezinfekantai ir antiseptikai. Automatizuoto patalpų dezinfekavimo oru pernešama priemone metodai
- EUROPOS STANDARTAS EN 14476: 2019 Cheminiai dezinfekantai ir antiseptikai. Kiekybinis suspensijos tyrimas virucidiniam aktyvumui medicinos srityje įvertinti
- ISO / IEC 17025: 2017 Tyrimų, bandymų ir kalibravimo laboratorijų kompetencijai keliami bendrieji reikalavimai
- ISO 15189: 2012 Medicinos laboratorijos. Kokybės ir kompetencijos reikalavimai