

ISO 21702:2019

MISURA DELL'ATTIVITÀ ANTIVIRALE SU MATERIE PLASTICHE E ALTRE SUPERFICI NON POROSE

ID Accettazione: 20.512718.0001

Descrizione campione: *Campione 1: B TITANIA SILVER - PIASTRINE "GRES PORCELLANATO"
TRATTATE E NON TRATTATE
Campione 2: B-ZERO PULITORE MULTIUSO - PIASTRINE "GRES
PORCELLANATO" DA TRATTARE*

Rif. AR: AR 2020/128/C cap. 1

Data inizio: 07/05/2020

Data emissione report: 15/06/2020

Preparato da: *Federica Licitra*

INDICE

1	Abstract dei risultati	3
2	Scopo del metodo.....	3
3	Materiali ed attrezzature	3
3.1	Materiali	3
3.2	Attrezzature	4
4	Campioni da testare	4
5	Condizioni sperimentali	5
6	Procedura	5
6.1	Preparazione del campione da analizzare	5
6.2	Procedura del test	6
6.3	Titolazione del virus	6
6.4	Verifica del metodo.....	6
6.5	Calcolo dell'attività antivirale	7
6.6	Controlli	7
7	Risultati.....	8
8	Conclusioni	9

1 ABSTRACT DEI RISULTATI

I campioni trattati rispettivamente con i prodotti "B TITANIA SILVER" e il pulitore multiuso "B-ZERO" sono stati analizzati secondo la norma ISO 21702:2019 per verificarne l'effetto antivirale contro il vacciniavirus (virus surrogato per virus con envelope, ad es. coronavirus SARS-CoV-2).

Nelle condizioni di prova applicate, entrambi i campioni trattati rispettivamente con "B TITANIA SILVER" e il pulitore multiuso "B-ZERO" hanno avuto un effetto antivirale contro il vacciniavirus dopo 24 ore di contatto, come riportato nello schema seguente:

CAMPIONE	Tempo di contatto	Riduzione	Risultato
NON TRATTATO	0 min	/	/
	24 ore	/	/
TRATTATO CON B TITANIA SILVER	24 ore	1.75	PRESENZA DI EFFETTO ANTIVIRALE (riduzione virale 98%)
TRATTATO CON B ZERO	24 ore	1.00	PRESENZA DI EFFETTO ANTIVIRALE (riduzione virale 90%)

2 SCOPO DEL METODO

Lo scopo di questo studio è quello di verificare l'attività antivirale di un campione di "gres porcellanato" trattato rispettivamente con i prodotti "TITANIA SILVER" o con il pulitore multiuso "B-ZERO".

L'analisi viene eseguita secondo il metodo ISO 21702:2019 "Misurazione dell'attività antivirale su plastica e altre superfici non porose".

In breve, il vacciniavirus viene addizionato al campione trattato e non trattato. Il vacciniavirus viene utilizzato come virus surrogato per dimostrare l'efficacia contro i virus con envelope (ad es. coronavirus SARS-CoV-2, responsabile di COVID19).

Dopo un tempo di contatto di 24 ore, l'infettività residua del virus viene valutata applicando il metodo di Spearman-Kärber. La riduzione del titolo virale viene calcolata mediante confronto tra il campione trattato con i prodotti "TITANIA SILVER" o il pulitore multiuso "B-ZERO" e il campione non trattato.

3 MATERIALI ED ATTREZZATURE

3.1 Materiali

- PBS (Tampone fosfato salino)

- FCS (Siero di Vitello Fetale)
- SDCLP medium
- Terreno di coltura: EMEM (Eagle's minimal essential medium)
- Terreno per la crescita cellulare (for la replicazione cellulare): EMEM, 10% FCS, 2 mM di glutammina, 1 mM di piruvato di sodio and 1% di mix di penicillina e streptomina.
- Terreno per il mantenimento cellulare (per mantenere il metabolismo della coltura cellulare senza stimolazione della proliferazione cellulare): EMEM, 2% FCS
- MICROSPIN S400HR

3.2 Attrezzature

- Timer
- Pipette graduate di capacità nominale 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml
- Pipetta automatica 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl
- Incubatore CO₂ (37 °C 1°C, 95% umidità, 5% CO₂)
- Microscopio invertito
- Piastre da 96 pozzetti
- Contenitori: provette o fiasche di capacità adeguata
- Cappa biologica a flusso laminare

4 CAMPIONI DA TESTARE

Identificazione del campione 1

- Nome del prodotto: B TITANIA SILVER
- Lotto n°: n.d
- Data di produzione: n.d.
- Data di scadenza: n.d.
- Data di ricevimento: 29/04/2020
- Condizioni di conservazione: temperature ambiente al riparo dalla luce

Identificazione del campione 2

- Nome del prodotto: B-ZERO PULITORE MULTIUSO
- Lotto n°: L0919
- Data di produzione: n.d.
- Data di scadenza: n.d.
- Data di ricevimento: 29/04/2020
- Condizioni di conservazione: temperature ambiente al riparo dalla luce

5 CONDIZIONI SPERIMENTALI

- Virus da testare e numero di passaggi:
Vaccinia virus, ceppo Ankara, ATCC-VR-1508 (passaggi n° 4), virus surrogato per dimostrare l'efficacia contro i virus con envelope (ad. es. coronavirus SARS-nCOV-2 responsabile di COVID19)
- Linea cellulare e numero di passaggi:
BHK-21-cl 13, IZS-Brescia per la propagazione del *Vaccinia virus* (passaggi n° 93+2)
- Tipo e dimensione del campione: "gres porcellanato", dimensioni (50 ± 2) mm x (50 ± 2) mm, spessore 6 mm (fornito dal cliente)
- Rivestimento: Polietilene a bassa densità, spessore 0.10 mm, forma quadrata, dimensioni 40 x 40 mm
- Tempo di contatto: 24 ore
- Condizioni del test: temperatura 25 ± 1 °C, > 90 % Umidità
- Metodo di neutralizzazione: SDCLP brodo e filtrazione con colonnine MICROSPIN S400 HR
- Terreno di crescita: EMEM, 10% FCS, 1 mM L-Glutamina, 1 mM Piruvato di Sodio, 1% mix di Penicillina-streptomina
- Terreno di mantenimento: EMEM, 2% FCS
- Metodo di titolazione virale: Spearman-Karber
- Metodo di pulizia: immersione in etanolo al 70 % e asciugatura

6 PROCEDURA

6.1 Preparazione del campione da analizzare

Per eseguire la prova sono necessari 12 campioni non trattati e 9 campioni trattati rispettivamente con i prodotti "B TITANIA SILVER" o "B-ZERO".

Ogni campione è una superficie quadrata di dimensioni (50 ± 2) mm x (50 ± 2) mm.

I campioni trattati con "TITANIA SILVER" sono stati forniti dal cliente.

I campioni trattati con "B-ZERO" sono stati preparati in laboratorio, applicando il prodotto 10 volte sulla superficie del campione. L'applicazione ripetuta imita le condizioni d'uso quotidiane e permette di valutare anche l'effetto cumulativo del prodotto pulitore multiuso "B-ZERO". La procedura di applicazione è riportata di seguito:

- Inumidire il panno in microfibra (Vileda MicronQuick BSystems 134859 0373) con acqua
- Impregnare il panno in microfibra con il prodotto "B-ZERO".
- Rimuovere l'eccesso di prodotto
- Pulire delicatamente la superficie
- Asciugatura naturale all'aria per 30 minuti

Prima dell'uso, per eliminare qualsiasi contaminazione batterica, ogni campione è stato sterilizzato per immersione in etanolo al 70%.

6.2 Procedura del test

3 campioni "trattati" e 6 campioni "non trattati" sono stati inoculati con 0,4 ml di sospensioni di virus (titolo virale TCID₅₀ 10⁷/ml). Successivamente, gli inoculi sono stati ricoperti con una pellicola di 40 x 40 mm e incubati per 24 ore a 25 °C e umidità relativa > 90%.

Subito dopo l'inoculo, 10 ml di brodo neutralizzante SCDLP sono stati aggiunti a 3 campioni "non trattati" ed è stata eseguita la titolazione per calcolare l'infettività residua del virus.

Al termine del tempo di contatto, la procedura sopra descritta è stata ripetuta per i campioni "trattati" e per i restanti campioni "non trattati".

6.3 Titolazione del virus

La titolazione è stata effettuata con il metodo Spearman-Kärber.

In dettaglio, per ogni trattamento sono state preparate diluizioni seriali fino a 10⁻¹⁰ in terreno di mantenimento.

100 µl di ogni diluizione sono stati trasferiti in otto pozzetti di una piastra a 96 pozzetti contenente un monostrato cellulare confluyente (> 90%) preparato il giorno precedente. Dopo 1 h di incubazione a 37 °C e 5% di CO₂, 100 µl di terreno di mantenimento sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e le piastre sono state poste in incubatore a 37 °C e 5 % di CO₂ per 7 giorni, tempo necessario per l'infezione virale.

Dopo l'incubazione, le cellule sono state osservate per valutare la presenza del virus e il titolo virale è stato calcolato con il metodo Spearman-Karber. E' stata applicata la seguente formula:

$TCID_{50} = \log \text{ della più alta concentrazione di virus utilizzata } - [(\log \text{ delle diluizioni}) \times (X-0.5)].$

Dove: X è la somma dei pozzetti infetti sul totale dei pozzetti di ogni diluizione.

6.3.1 Determinazione dell'infettività del virus

Per ogni campione, l'infettività del virus recuperato è stata ottenuta come segue:

$$N = (10 \times TCID_{50} \times V) / A$$

Dove:

N è l'infettività del virus recuperato per cm² di campione

V è il volume del brodo SCDLP aggiunto al campione, in ml

A è la superficie del film di copertura, in cm²

6.4 Verifica del metodo

Il test è valido se vengono soddisfatti i seguenti criteri:

- Il TCID₅₀ medio recuperato immediatamente dopo l'inoculo dai campioni non trattati deve essere compreso nell'intervallo di $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀/cm² e $1,2 \times 10^6$ TCID₅₀/cm²
- Il TCID₅₀ medio recuperato dai campioni non trattati dopo 24 ore di contatto non deve essere inferiore a $6,2 \times 10^2$ TCID₅₀/cm²
- L'efficienza soppressiva dell'attività del campione (neutralizzazione) deve essere confermata

6.5 Calcolo dell'attività antivirale

L'attività antivirale è calcolata come segue:

$$R = U_t - A_t$$

Dove:

R è l'attività antivirale

U_t è il log medio del TCID₅₀/cm² dei 3 campioni non trattati dopo 24 ore

A_t è il log medio del TCID₅₀/cm² dei 3 campioni trattati dopo 24 ore

6.6 Controlli

6.6.1 Verifica dell'effetto citotossico sulle cellule

10 ml di brodo neutralizzante SCDLP sono stati aggiunti a 3 campioni "trattati" e 3 "non trattati". Poi, la soluzione di lavaggio è stata aggiunta alle cellule per mimare la procedura di titolazione. Il campione deve essere non citotossico.

6.6.2 Verifica della sensibilità cellulare al virus e inattivazione dell'attività antivirale

10 ml di brodo neutralizzante SCDLP sono stati aggiunti a 3 campioni "trattati" e 3 "non trattati" (10 ml di brodo per ogni campione). Quindi, 5 ml di surnatante di ogni campione e 5 ml di brodo SCDLP da usare come controllo negativo, sono stati trasferiti in nuove provette. Poi ad ogni provetta sono stati aggiunti 50 µl di sospensione virale alla concentrazione TCID₅₀ 10⁴/ml. La miscela è stata incubata a 25 °C per 30 min. Infine, la soluzione è stata titolata come descritto sopra.

L'infettività è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$S = (10 \times P)$$

Dove:

S è l'infettività del virus per ml per sospensione di test

P è il titolo medio TCID₅₀

Criteri di accettabilità: $|S_n - S_u| \leq 0,5$ e $|S_n - S_t| \leq 0,5$

Dove:

Sn è il log medio dell'infettività del virus in TCID₅₀/ml per il controllo negativo

Su è il log medio dell'infettività del virus in TCID₅₀/ml per il campione non trattato

St è il log medio dell'infettività del virus in TCID₅₀/ml per il campione trattato

7 RISULTATI

I risultati sono riassunti nelle tabelle sotto n° 1 e 2.

Tabella 1: Risultati del test antivirale, ISO 21702:2019

Vacciniavirus							
Campione	Tempo di contatto	Media della titolazione del virus (Log TCID ₅₀)	Media della titolazione del virus (TCID ₅₀ /100 µl)	N (TCID ₅₀ /cm ²)	Riduzione (Ut – At)	Criteri di accettabilità	Risultati
NON TRATTATO	0 min	5.00	10 ⁵	6.25 x 10 ⁵	/	2.5 x 10 ⁵ - 1.2 x 10 ⁶ (TCID ₅₀ /cm ²)	PASS
	24 ore	4.625	10 ^{4.625}	2.64 x 10 ⁵	/	> 6.2 x 10 ² (TCID ₅₀ /cm ²)	PASS
TRATTATO CON B TITANIA SILVER	24 ore	2.875	10 ^{2.875}	4.69 x 10 ³	1.75	/	PRESENZA DI EFFETTO ANTIVIRALE (riduzione virale 98%)
TRATTATO CON B ZERO	24 ore	3.625	10 ^{3.625}	2.64 x 10 ⁴	1.00	/	PRESENZA DI EFFETTO ANTIVIRALE (riduzione virale 90%)

Tabella 2: Risultati dei controlli

Vacciniavirus					
Test di sensibilità	Media della titolazione del virus (Log TCID ₅₀)	Media della titolazione del virus (TCID ₅₀ /100 µl)	S (TCID ₅₀ /ml)	Criteri di accettabilità	Risultati
Controllo negativo	2.875	10 ^{2.875}	Sn = 10 ^{3.875}	/	/
NON TRATTATO	2.875	10 ^{2.875}	Su = 10 ^{3.875}	Sn - Su ≤ 0.5	0 (PASS)
TRATTATO CON B TITANIA SILVER	2.750	10 ^{2.750}	St = 10 ^{3.750}	Sn - St ≤ 0.5	0.125 (PASS)
TRATTATO CON B ZERO	2.625	10 ^{2.625}	St = 10 ^{3.625}	Sn - St ≤ 0.5	0.25 (PASS)

8 CONCLUSIONI

Secondo la norma ISO 21702:2019, nelle condizioni di prova applicate, entrambi i campioni trattati rispettivamente con "B TITANIA SILVER" e con il pulitore multiuso "B-ZERO" hanno un effetto antivirale dopo 24 ore di contatto contro il vacciniavirus (virus surrogato per virus con envelope, ad es. coronavirus SARS-CoV-2).

In dettaglio, il trattamento con "B TITANIA SILVER" determina una riduzione virale pari a 1,75 log, corrispondente ad una riduzione del 98 %.

Invece, il trattamento con il pulitore multiuso "B-ZERO" determina una riduzione virale di 1,00 log, corrispondente ad una riduzione del 90 %.