UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
E CLINICHE "LUIGI SACCO"

PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOCIDA DI MICRO OXIgerm NEI CONFRONTI DI SARS-CoV-2

	NOME	FUNZIONE	FIRMA	DATA
Redatto da	D. Mileto	Principal Investigator		16/10/20
Revisionato da	A. Marin	Committente (WOW)		19/10/20
Approvato da	M.R. Gismondo	Supervisore		20/10/20

Sommario

1 SCOPO 2
2 MATERIALI E METODI 2
2.1 Materiali 2
2.2 Condizioni prescelte di test in sospensione 2
2.3 Definizione della sospensione virale da saggiare 2
2.4 Titolazione virale: Unità Formanti Placche/ mL (PFU/mL) 4
2.5 Test di valutazione dell'attività biocida di MICRO OXIgerm 4
2.6 Modalità di neutralizzazione dell'attività biocida di MICRO OXIgerm 5
2.7 Verifica dell'effetto citotossico del prodotto 5
2.8 Verifica dell'efficacia del metodo neutralizzazione dell'attività del prodotto 5
3 CRITERI DI ACCETTAZIONE 6
4 SEZIONE SPERIMENTALE 6
5 ESITO SPERIMENTAZIONE 6
5.1 Valutazione attività biocida di MICRO OXIgerm del prodotto 6
5.2 Valutazione attività biocida di MICRO OXIgerm del prodotto 7
5.3 Citotossicità del prodotto 7
6 CONCLUSIONI 8
7 BIBLIOGRAFIA 8

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
E CLINICHE "LUIGI SACCO"

1 Scopo

Protocollo di studio finalizzato alla valutazione dell'attività virucida del prodotto MICRO OXIgerm prodotto da WOW KEMICAL SRL (C.F./P.I. 04999220280) nei confronti di SARS-CoV-2.

2 Materiali e Metodi

2.1 Materiali

- Prodotto MICRO OXIgerm concentrato 6X
- Diluizioni MICRO OXIgerm (2X – 1X – 0.5 X) eseguite in acqua dura. Per la produzione di acqua dura si faccia riferimento alla EN14476:2013
- Cellule VERO E6 (ATCC® CRL-1586™)
- Terreno di coltura cellulare: Dulbecco's Modified Eagle Medium with l-glutamine (DMEM, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Siero Fetale Bovino (FBS, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Penicillin-Streptomycin [5,000 U/mL] (Pen-Strep, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- SARS-CoV-2 in sospensione a titolo maggiore o uguale di 10^6 PFU/ml
- Bagno termostatico a 37°C ± 1°C
- Incubatore a CO_2
- Piastre per colture cellulari da t75 cm^2
- Piastre per colture cellulari a 24 pozzetti
- Enzima Catalasi
- Soluzione tampone di NaOH
- Cristalvioletto
- Carbossimetilcellulosa (CMC)
- Tampone Fosfato Salino (PBS)
- Micropipette: 10 µl; 200 µl; 1000 µl
- Puntali sterili con filtro
- Pipettatore automatico
- Pipette sierologiche

2.2 Condizioni prescelte per il test in sospensione.

Temperatura 25°C ± 1°C
Tempo di contatto 2 min ± 5 secondi
Tempo di contatto 5 min ± 5 secondi

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

Tutte le operazioni saranno condotte in un laboratorio con livello di sicurezza biologica minino 3 (BSL-3 o BSL-4).

2.3 Definizione della sospensione virale da saggiare

Il SARS-CoV-2 si trova in sospensione in terreno di mantenimento della coltura cellulare utilizzata per l'amplificazione virale.

Nello specifico: al tempo 0 (T0) in una fiasca per coltura cellulare t75 cm^2 (confluenza di circa 80%) si inocula 1mL di SARS-CoV-2 (GenBank accession number: MW000351) in sospensione e 7 mL di DMEM al 2% FBS ad 1% PenStep e si lascia ad incubare a 37°C al 5% di CO_2. Post 72h dall'infezione (T3) il surnatante raccolto dalla coltura rappresenterà la sospensione di SARS-CoV-2 da testare.

La definizione del titolo virale viene eseguita mediante valutazione delle Unità Formanti Placche/mL (PFU/mL). La sospensione da utilizzare per le prove di valutazione dell'attività virucida dovrà avere un titolo $\geq 10^6$ PFU/mL.

2.4 Titolazione virale: Unità Formanti Placche/ mL (PFU/mL)

Dalla sospensione virale da saggiare si eseguono 8 diluizioni in base 10 (da 10^{-1} a 10^{-8}).

Le diluizione si ottengono miscelando la sospensione virale con DMEM a freddo.

Preparare 9 provette contenenti 900µl di DMEM e disporle in ghiaccio.

Eseguire le diluizioni seriali aliquotando 100ul di sospensione virale nella prima provetta contenente il DMEM (10^{-1}). Procedere con le diluizioni fino alla provetta 8 (10^{-1}) dalla quale, una volta eseguita la diluizione, scartare 100 µl di soluzione. La provetta 9, non ricevendo né virus né Biocida, sarà invece mantenuta chiusa per la prova di vitalità cellulare.

Una volta pronte le diluizioni procedere con l'eliminazione del terreno dalle piastre dove sono state precedentemente seminate e coltivate 10^5 cellule VERO E6 permissive per infezione da SARS-CoV-2 (confluenza attesa del monostrato cellulare pari ad 80% della superficie del pozzetto).

Per le provette dalla 1 alla 5 e della 9, trasferire 250 µl di soluzione in 3 pozzetti della piastra da 24, mentre dalla 6 alla 8, trasferire 250 µl di soluzione in 2 pozzetti della piastra da 24 (vedi figura 1).

Al termine delle 3 ore di incubazione a 37°C al 5% di CO_2, rimuovere i 250 µl di materiale ed aggiungere, in ciascun pozzetto, 500 µl di DMEM al 2% di FBS ed allo 0,76% di CMC.

Terminato il trasferimento del terreno contenente CMC, incubare per 72h a 37°C a 5% di CO_2.

Dopo le 72h di incubazione, rimuovere il contenuto di tutti i pozzetti e procedere alla fissazione e successiva colorazione con Cristalvioletto del substrato cellulare.

L'analisi del titolo viene determinata valutando la formazione delle placche sul monostrato cellulare dovute all'effetto citopatico tipico dell'infezione del SARS-CoV-2 su monostrato di VERO E6.

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

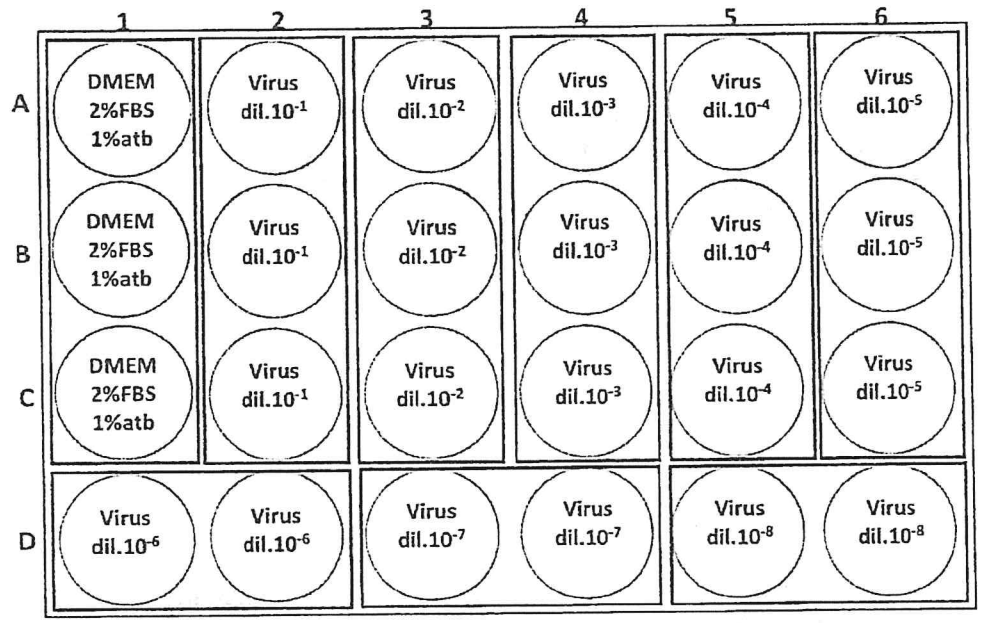

Figura 1: schema piastra da 24 pozzetti per titolazione virale in PFU/mL

2.5 Test di valutazione dell'attività biocida di MICRO OXIgerm

Il test verrà eseguito per contatto del BIOCIDA alle 3 diverse diluizioni identificate (2X, 1X e 0,5X) con la sospensione virale per i tempi definiti dal test e nelle condizioni di temperatura definite del test (prove 1 e 2). Il rapporto tra sospensione virale e MICRO OXIgerm sarà di 1:1; 0,5mL di virus verranno miscelati con 0,5 mL di MICRO OXIgerm. Partendo da MiCRO OXigerm 66 equivalente a 4X mi MICRO OXigerm, eseguire le diluizioni per una concentrazione finale 2X, 1X e 0,5X

Il piano sperimentale è quindi il seguente:

Prova 1
3 concentrazioni
Temperatura 25°C
Tempo di contatto 2 minuti

Prova 2
3 concentrazioni
Temperatura 25°C
Tempo di contatto 5 minuti

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

Allo scadere del tempo definito per ciascuna prova, l'azione del MICRO OXIgerm verrà neutralizzata come da paragrafo dedicato avvalendosi dell'enzima catalasi e l'acidità della soluzione sarà tamponata con NaOH.
Al termine di ciascuna prova verrà valutato l'effetto del biocida confrontando il titolo virale della sospensione trattata con MICRO OXIgerm con il titolo di un'aliquota della stessa soluzione virale non trattata.
Dal confronto dei titoli si determinerà l'efficacia del trattamento con MICRO OXIgerm.
Per la determinazione della titolazione si faccia riferimento al paragrafo dedicato.

2.6 Modalità di neutralizzazione dell'attività biocida di MICRO OXIgerm

Per la neutralizzazione dell'attività biocida di MICRO OXIgerm verrà utilizzato l'enzima catalasi: allo scadere del tempo di contatto stabilito per le diverse prove sperimentali, si aggiungeranno le unità di catalasi necessarie alla neutralizzazione del perossido contenuto nel biocida.
CONC 1X: per 0,5 ml servono 620 unità di enzima
CONC 0,5X: per 0,5 ml servono 310 unità di enzima
Conc 2X: per 0,5 ml servono 1240 unità di enzima.
Prima di aggiungere l'enzima sarà necessario correggere il pH (il prodotto MICRO OXIgerm ha un pH 2,4) utilizzando una soluzione di NaOH.
Lasciare agire per 2 minuti a 25°C

2.7 Verifica dell'effetto citotossico del prodotto

Ai fini della validità delle prove sperimentali sarà importante verificare che il prodotto MICRO OXIgerm neutralizzato non abbia un effetto citotossico sul substrato cellulare di VERO E6 utilizzate per lo studio. A tal fine si prepareranno diluizioni in base 10 di MICRO OXIgerm neutralizzato (addizionato con Catalasi ed NaOH) e DMEM (2% FBS ed 1 % PenStep) delle quali verrà aliquotato 1mL in doppio di ciascuna diluizione utilizzando una piastra da 24 pozzetti con monostrato cellulare di 10^5 E6. Nella stessa piastra saranno presenti 3 pozzetti di controllo in cui verrà aliquotato esclusivamente del terreno di mantenimento per il substrato cellulare:DMEM al 2% FBS ed 1% atb.

2.8 Verifica dell'efficacia del metodo di neutralizzazione dell'attività biocida del prodotto

Al fine di verificare l'effettiva neutralizzazione del biocida post trattamento enzimatico (vedi paragrafo dedicato), verranno miscelati in rapporto 1:1 il prodotto MICRO OXIgerm precedentemente neutralizzato ed una aliquota indipendente della medesima sospensione virale utilizzata per tutte le altre

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

prove sperimentali. Per la valutazione dell'efficacia verrà condotto test di titolazione in PFU/mL come da indicazione del paragrafo dedicato.

3 CRITERI DI ACCETTAZIONE

Affiche la sperimentazione possa essere ritenuta valida dovranno verificarsi i seguenti risultati:

- il biocida neutralizzato enzimaticamente e tamponato con soluzione basica non dovrà mostrare effetto citotossico sul substrato cellulare utilizzato per le prove sperimentali (2.7): il monostrato cellulare dovrà mostrare condizioni di crescita paragonabili in tutti i pozzetti della p24 (controlli vs trattati)
- dal risultato del test di verifica dell'efficacia del metodo neutralizzazione dell'attività del prodotto (2.8) si dovrà ottenere un titolo virale paragonabile a quello della sospensione virale non trattata: ≤0.5 log10 PFU/mL (NF EN 14476+A1 European Standard).

Verificata la validità della sperimentazione, sarà ritenuta accettabile l'attività del biocida se si osserverà una differenza di almeno 10^3 PFU/mL (99.9%) tra la sospensione virale non trattata e quella trattata con il MICRO OXIgerm.

4 SEZIONE SPERIMENTALE

Prova eseguita in data 18/08/2020

Espansione virale del 15/08/2020 (7° ciclo di espansione virale)

Cellule per test in ottime condizioni morfologiche e confluenti (22° ciclo di replicazione)

5 ESITO SPERIMENTAZIONE

5.1 Valutazione attività biocida di MICRO OXIgerm del prodotto

I risultati delle prove sperimentali finalizzate alla valutazione dell'efficacia del prodotto nei confronti di SARS-CoV-2 sono riassunti in tabella 1.

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

SOLUZIONE	Molecole Attive	pH	Concentrazione H_2O_2 (% wt./wt.)	Tempo di contatto (min)	Titolo Virale (pfu mL^{-1})
Sospensione Virale	-	7.3	-	-	5×10^6
MICRO OXIgerm	H_2O_2	2.8	0.5	2	Assenza di Replicazione Virale
MICRO OXIgerm	H_2O_2	2.8	0.5	5	Assenza di Replicazione Virale
MICRO OXIgerm	H_2O_2	2.8	1X	2	Assenza di Replicazione Virale
MICRO OXIgerm	H_2O_2	2.8	1X	5	Assenza di Replicazione Virale
MICRO OXIgerm	H_2O_2	2.8	2X	2	Assenza di Replicazione Virale
MICRO OXIgerm	H_2O_2	2.8	2X	5	Assenza di Replicazione Virale

Tabella 1: schema dei risultati ottenuti con le prove sperimentali

La sospensione di SARS-CoV-2 utilizzata ha mostrato un titolo virale pari a 5×10^6 pfu/mL.
Le tre diluizioni di MICRO OXIgerm testate hanno mostrato un assoluto potere neutralizzante nei confronti della sospensione virale abbattendo completamente il titolo per ambedue i tempi di contatto valutati.

5.2 Efficacia della neutralizzazione dell' attività biocida di MICRO OXIgerm del prodotto

Il saggio di titolazione virale condotto sulla sospensione di SARS-CoV-2 trattata con il MICRO OXIgerm neutralizzato, secondo le indicazioni riportate nel paragrafo dedicato (2.8), ha mostrato una completa assenza di replicazione virale dimostrando che il MICRO OXIgerm ha mantenuto il suo potere neutralizzante nei confronti del virus.

5.3 Citotossicità del prodotto

Il prodotto neutralizzato come da paragrafo specifico (2.8) non ha mostrato effetto citotossico sulle cellule utilizzate nella sperimentazione.

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

6 CONCLUSIONI

A fronte dell'accordo stipulato tra Università Degli Studi di Milano e l'azienda WOW KEMICAL SRL (C.F./P.I. 04999220280) è stato condotto un protocollo di studio finalizzato alla valutazione dell'attività virucida del prodotto MICRO OXIgerm nei confronti di SARS-CoV-2.
Dai dati ottenuti è emersa la piena efficacia del prodotto nei confronti del virus per tutte le diluizioni testate. Sono necessari ulteriori studi di approfondimento per stabilire l'attività virucida del prodotto rispetto ai tempi di esposizione.

7 BIBLIOGRAFIA

1) EN14476:2013
2) N. Omidbakhsh, and S.A. Sattar, Broad-spectrum microbicidal activity, toxicologic assessment, and materials compatibility of a new generation of accelerated hydrogen peroxide-based environmental surface disinfectant. AJIC Am J Infect Control. 2006 Jun;34(5):251-7.
3) Kampf G1, Todt D2, Pfaender S2, Steinmann E2. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020 Feb 6.
4) ASTM E1053 - 11 Standard Test Method to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces.
5) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW000351
6) World Health Organization. Interim Guidance. Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19. Ref. no. WHO/2019-nCoV/Disinfection/2020.1

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy