

INFORME

EFICACIA DE LOS MODULOS DUST FREE CONTRA EL SARS-CoV-2

PRODUCTO CERTIFICADO

EFICAZ CONTRA EL SARS-CoV-2



Actúa las 24h en el aire y también sobre las superficies

Sistemas de sanitización

Activos



Lámparas UV + Fotocatálisis + Ionización

Eficaz contra bacterias, virus, mohos, alérgenos, olores, compuestos orgánicos y volátiles, polvos ultrafinos.

Sumario

1 INTRODUCCIÓN	2
2 MATERIALES Y METODOS	2
2.1 Materiales	2
2.2 Condiciones establecidas para los test en suspensión.	3
2.3 Definición de la suspensión viral para el ensayo	4
2.4 Titulación viral: Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50)	4
2.5 Test de valoración de la actividad virucida del dispositivo NEVOLA: fases experimentales..	5
3 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	6
4 SECCIÓN ESPERIMENTAL	6
5 EXITO ESPERIMENTACIÓN.....	6
6 CONCLUSIONES.....	7
7 BIBLIOGRAFIA.....	7

1. INTRODUCCIÓN

La cabina NEVOLA (nombre del prototipo) es un dispositivo diseñado para desinfectar la ropa; consta de tres módulos y tiene un volumen interno total de 2,13 m³.

La cabina utiliza dos tecnologías diferenciadas para el tratamiento de los materiales colocados en su interior: tecnología Dust-Free (FC UNIT 3 ") y nebulización.

- La tecnología Dust Free utiliza el dispositivo FC Unit 3 ", basado en el principio de fotocatalisis: la emisión de rayos UV provoca la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que tienen una acción oxidante sobre los microorganismos presentes en el aire expuesta al tratamiento. La tecnología PCO™ de los módulos FC UNIT aprovecha la acción combinada de los rayos de una lámpara UV especial con una estructura catalizadora que consiste en una aleación metálica con una matriz de panel, compuesta principalmente por TiO₂ (dióxido de titanio) y otros 3 metales nobles en menor medida. Los módulos FC UNIT, atravesados por el flujo de aire, dan lugar a una reacción foto catalítica capaz de producir radicales de hidroxilo (• OH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en cantidades mínimas. El peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) y los radicales de hidroxilo permiten higienizar tanto el flujo de aire como las superficies que tienen una acción letal sobre los microorganismos expuestos al tratamiento.
- La desinfección por nebulización se lleva a cabo, en cambio, con la ayuda de un generador de niebla seca capaz de vaporizar 0.4 mL/seg de una solución de cloruro de benzalconio al 4% colocada en su interior.

El propósito del estudio es la evaluación de la eficacia del tratamiento del SARS-CoV-2 mediante el dispositivo NEVOLA. Para ello, se evaluarán por separado las dos tecnologías de saneamiento, Dust Free y Nebulización, colocadas dentro de la cabina.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

- Dispositivo NEVOLA:
- Dust Free Technology Nº 2 dispositivos FC Unidad 3": cada uno compuesto por un catalizador penta-metálico a base de dióxido de titanio, una lámpara UVC y un ventilador con un caudal de aire útil de 35 m³/h con recirculación interna.
- Tecnología de nebulización: caldera con una potencia de 900W y una temperatura de funcionamiento de 180 °C (en la boquilla) combinada con una bomba de niebla seca de 18W con un caudal de 0,4 mL/seg.
- SARS-CoV-2 en suspensión con un título mayor o igual a TCID₅₀ 10⁷/mL
- Celulas VERO C1008 (ATCC® CRL-1586™)
- Medio de cultivo celular: Dulbecco's Modified Eagle Medium with L-glutamine (DMEM, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Penicillin-Streptomycin [5,000 U / mL] (Pen-Strep, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Baño termostático a 37 °C ± 1 °C
- Incubadora de CO₂
- Placas de cultivo celular t25 cm²
- Placas de cultivo celular t75 cm²
- Placas de cultivo celular de 96 pocillos
- Cristalvioleta
- Acetona 99%

- Metanol 99%
- Tampón de fosfato salino (PBS)
- Micropipetas: 10 µl; 200 µl; 1000 µl
- Puntales estériles con filtro
- Automatismo de pipetas
- Pipetas serológicas
- Texwipe™ paños secos no tejidos TechniCloth™ (45% PE / 55% celulosa)
- Placas de Petri
- Vortex
- Falcon 50 mL
- Sarsted 2 mL
- Capa de seguridad biológica de nivel II (BSCII)
- Dispositivos de protección individual dedicados

2.2 Condiciones elegidas para la prueba

Temperatura: 25 °C ± 1 ° C

Materiales tratados:

- suspensión viral liberada en una placa de Petri
- Paños Texwipe empapadas con suspensión viral

Volumen de suspensión viral utilizado para cada material tratado: 400µL

Tecnología Dust Free

- Pretratamiento de 30 minutos del dispositivo NEVOLA con tecnología Dust Free antes de cada tratamiento
- tratamiento 1: 20 minutos de exposición
- tratamiento 2: 30 minutos de exposición

Nebulización

- tratamiento 1: 45 segundos de nebulización y 20 minutos de exposición
- tratamiento 2: 90 segundos de nebulización y 20 minutos de exposición

Posicionamiento de los materiales a tratar

- Posición 1 (Texwipe) : 86 cm del techo y 30 cm de la puerta delantera
- Posición 2 (Texwipe) : 73 cm del techo y 34 cm de la puerta delantera
- Posición 3 (placa de Petri) : 28 cm desde el fondo y 90 cm desde la puerta delantera

Los controles tipo Texwipe y Petri, inoculados con las mismas concentraciones de SarsCov-2, se colocan dentro de la capa de seguridad biológica de nivel II (BSC II) del laboratorio BSL4

Todas las operaciones deben realizarse en un laboratorio con un nivel mínimo de seguridad biológica 3 (BSL-3 o BSL-4)

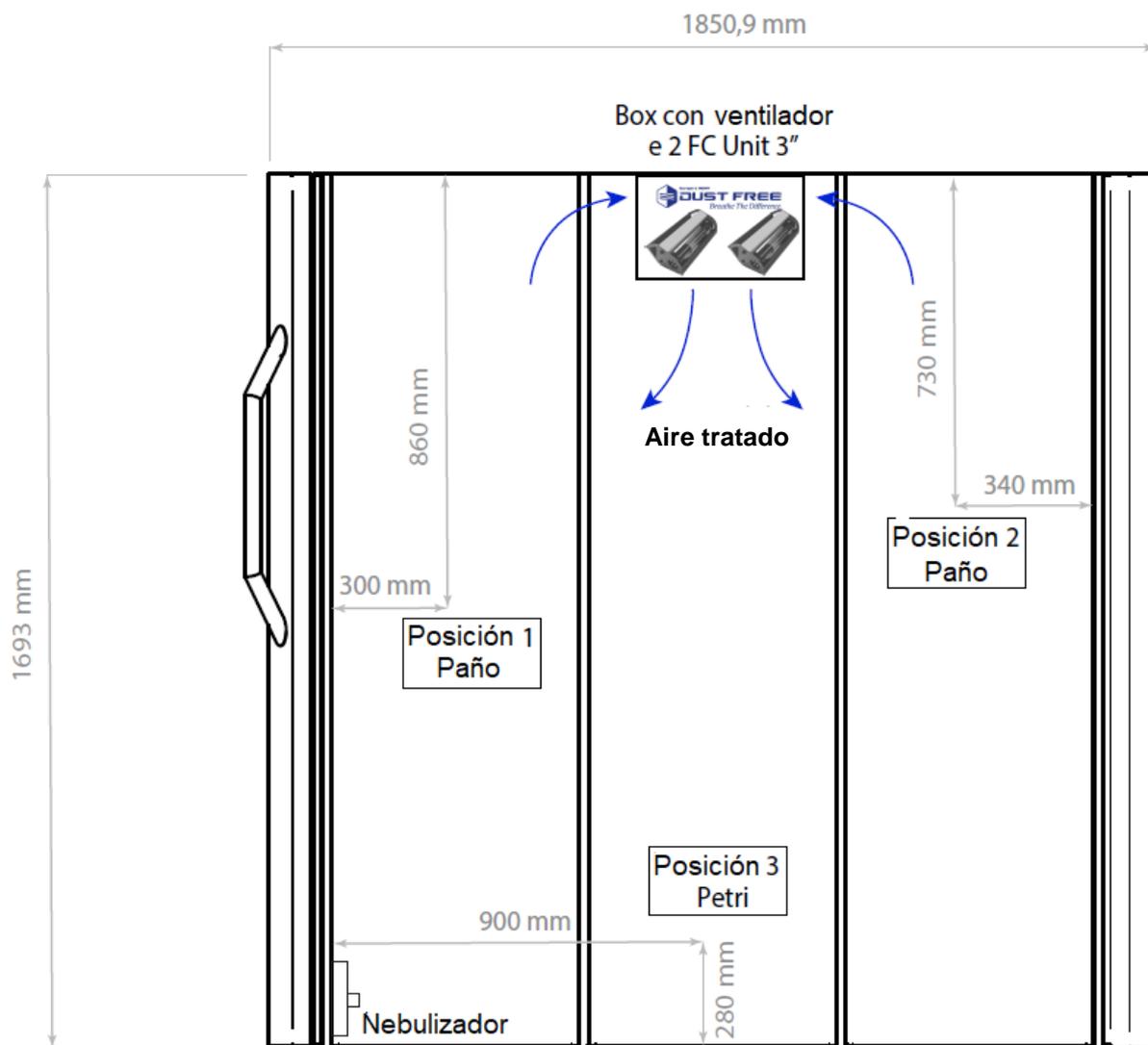


Fig.1 Esquema del dispositivo NEVOLA

2.3 Definición de la suspensión viral a ensayar

El SARS-CoV-2 se encuentra en suspensión en un medio de mantenimiento de cultivo celular utilizado para la amplificación viral.

Específicamente: en el tiempo 0 (T0) en una matriz de cultivo celular de 75 cm² (confluencia de aproximadamente 80%) se inyectan 1ml de SARS-CoV-2 y 9ml de DMEM al 2% FBS y 1% PenStep y se dejan a incubar a 37 °C al 5% de CO₂. Después de 72 h de la infección (T3), el residuo recogido del cultivo representa la suspensión de SARS-CoV2 que se va a analizar.

La definición del título viral se realiza mediante la evaluación del TCID50/ mL. La suspensión que se utilizará para las pruebas de evaluación de la actividad viricida debe tener un título \geq DICT50 10⁷ / ml.

2.4 Titulación viral: cultivo de tejidos, dosis infecciosa 50 (TCID50)

Utilizando la suspensión viral a analizar, realice 10 diluciones en base 10 (10^{-1} a 10^{-10}).

Las diluciones se obtienen mezclando la suspensión viral con DMEM en frío.

Prepare 10 pruebas que contengan 1080 μ l de DMEM al 2% y colóquelos en hielo.

Realice las diluciones en serie colocando alícuotas de 120 μ l de suspensión viral en la primera prueba que contiene el 2% de DMEM (10^{-1}). Proceder con las diluciones hasta la prueba $10(10^{-10})$ del que, una vez realizada la dilución, descartar 120 μ l de solución.

Una vez completadas las diluciones, proceder con la eliminación del medio de las placas de 96 pocillos en las que previamente se sembraron y cultivaron 25.000 células VERO E6/pocillo permisivas para la infección por SARS-CoV-2 (confluencia esperada de la monocapa celular igual a 80% de la superficie del pocillo).

En cada fila de pocillos de la placa de 96, agregue 100 μ l/pocillo a los primeros 10 pocillos de las ocho diluciones virales más altas (10^{-3} a 10^{-10}); en los dos últimos pocillos de cada fila, vayan proporcionando 100 μ l de DMEM al 2% libre de virus para considerarlos como un control negativo para la infección. Incubar la placa a 37 °C, 5% de CO² durante 3 días. Después de este período, observe la placa bajo un microscopio óptico y cuente los pocillos que muestran el Efecto Citopático (CPE) por fila.

Para teñir la placa y resaltar las placas formadas, fijar el sustrato celular con una solución de acetona y metanol en una proporción 1:2 (200 μ l por pocillo) y dejar incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de dos lavados con PBS, tiñe cada pocillo con 60 μ l de una solución de cristal-violeta al 0,1%.

Un pocillo se considera positivo para el efecto citopático incluso si solo unas pocas células presentan CPE. La prueba debe considerarse válida solo si los controles negativos no muestran CPE. El título viral se valora mediante el método estadístico de Kärber:

$$T = 10^{1 + d(S-0.5) + 1} \text{ TCID50 / ml}$$

d = Log10 de la dilución (= 1 para diluciones de factor 10)

S = suma de las proporciones de CPE + / fila de pozo para cada dilución (10^{-1} a 10^{-10})

Para estimar el título viral en Unidades Formadoras de Placas / ml (pfu / ml), reste 0,7 Log del título calculado como TCID50/ml ($1 \times 10^{T-0.7}$).

2.5 Prueba de evaluación de la actividad viricida del dispositivo NEVOLA: fases experimentales

Las pruebas de evaluación de la eficacia del tratamiento se deben realizar por separado para cada tecnología de tratamiento de aire colocada dentro del dispositivo.

Para ambas evaluaciones, utilice dos paños Texwipe empapados en solución viral colocados respectivamente en la posición 1 y la posición 2 dentro del dispositivo y dos placas de Petri colocadas en la posición 3 dentro del dispositivo. Por lo tanto, para cada tecnología, pruebe un total de 4 muestras de sobrenadante viral (2 paños y 2 placas de Petri) con cada tiempo de exposición relativo, como se indica en el párrafo específico (2.2).

El ensayo de sobrenadante viral tratado tanto en fase líquida como liberado sobre tela, permite evaluar la eficacia de penetración de las dos tecnologías de tratamiento diferentes en relación con las diferentes matrices infectadas.

Deje bajo capa a flujo laminar (BSCII) el sobrenadante bajo control expuesto al aire para los tiempos de exposición de cada protocolo de tratamiento.

Pruebe el test TCID50 tomando 120 μ l de cada solución tratada y sin tratar.

Para extraer el virus de los paños empapados con el sobrenadante, proceda de la siguiente manera:

- Una vez finalizadas las fases de tratamiento de los materiales, introducir los paños en un Facon de 50 mL

- Remojar los paños en alícuotas de 4 mL de DMEM dentro del Falcon.
- Agite el Falcon durante 10 minutos y luego centrifugue durante 5 minutos a 1500 rpm.
- Tome 120 µl del fondo del Falcon y utilícelos para las diluciones de base 10.

Tener en cuenta el factor de dilución 10 del producto extrapolado de las telas en el momento de estimar el título viral: 400 µl de suspensión viral sembrada sobre la tela se resuspenden utilizando 4 ml de DMEM (1:10).

Evalúe la efectividad de los tratamientos Dust Free y de nebulización comparando el título de los materiales tratados con el título de los controles relacionados no expuestos a las tecnologías probadas.

Para determinar la titulación, consulte el párrafo específico (2.4).

3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Para que el ensayo se considere válido, se deben verificar los siguientes resultados:

- El título de la suspensión de SARS-CoV-2 pura utilizada para el ensayo debe mostrar un título de TCID₅₀ ≥ 10⁷/mL.
- Los títulos de las suspensiones utilizadas como control deben mostrar un título suficiente para estimar cualquier decaimiento posterior al tratamiento: TCID₅₀ ≥ 10⁴/mL.
- Todos los pocillos con los sustratos de control deben mostrar todos claramente un sustrato bien coloreado y sin ningún rastro de efectos citopáticos.

4. SECCIÓN ESPERIMENTAL

Prueba realizada el 16/10/2020

El stock viral de SARS-CoV-2 utilizó el GenBank accession number: MW000351.

Expansión viral del 25/09/2020 (8 ° ciclo de expansión).

Células utilizadas para la prueba en excelentes condiciones morfológicas y confluentes: 45° ciclo de replicación (declaración en el momento de la adquisición: 37° ciclo)

5. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS

Los resultados de las pruebas experimentales destinadas a evaluar la eficacia del tratamiento del SARS-CoV-2 mediante el dispositivo NEVOLA se resumen en la Tabla 1.

Patógeno	Matriz Contaminada	Tecnología	Tiempo di Exposición	TCID50
SARS-CoV-2 (MW000351)	Stock puro	//	//	10 ¹⁰ /ml
	Petri	Controles (No-Tratamiento)	20 minutos	10 ⁸ /ml
			30 minutos	10 ⁸ /ml
	Texwipe		20 minutos	10 ^{5.5} /ml*
			30 minutos	10 ^{5.5} /ml*
	Petri	Dust-Free	20 minutos	10 ⁷ /ml
			30 minutos	10 ^{7.1} /ml
	Texwipe	Dust-Free	20 minutos	10 ³ /ml*
			30 minutos	10 ³ /ml*
	Petri	Nebulización	20 minutos (45 s)	10 ^{7.6} /ml
			20 minutos (90 s)	10 ^{7.9} /ml
	Texwipe	Nebulización	20 minutos (45 s)	10 ⁶ /ml*
20 minutos (90 s)			10 ^{5.8} /ml*	

Tab.1 Resultados de la experimentación. La desviación estándar calculada para el ensayo TCID50 es ± 0,5%.

* El título reportado está corregido por el factor de dilución 1:10 (+1 log)

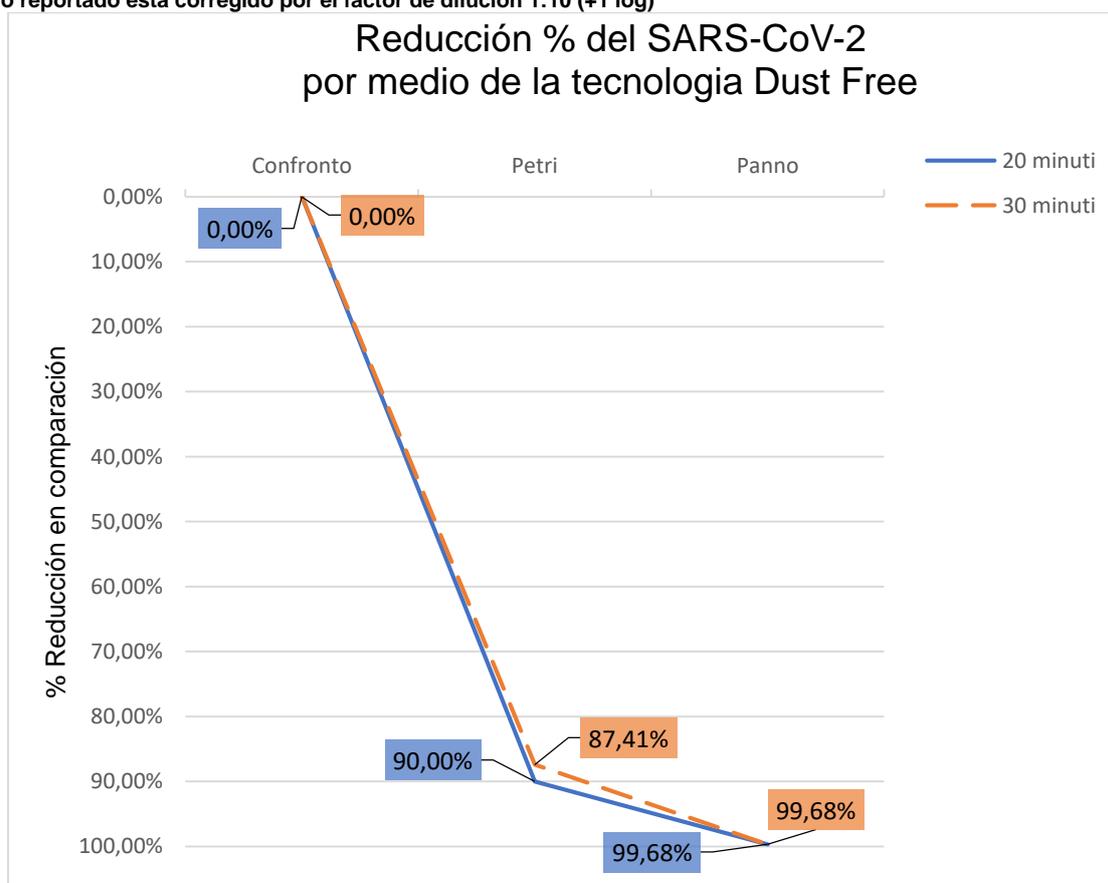


Gráfico.1% de reducción de SARS-CoV-2 en placas de Petri y paños Texwipe en comparación con el control relativo en los tiempos de 20 y 30 minutos de tratamiento Dust Free.

La suspensión pura de SARS-CoV-2 utilizada para las pruebas experimentales, mostró un título viral igual a TCID50 10^{10} mL.

La suspensión viral depositada en la placa de Petri y dejada bajo el BSCII utilizado como control positivo mostró un título igual a TCID50 10^8 /mL; el mismo volumen de suspensión absorbido por el paño Texwipe y dejado bajo el BSCII para controlar el tratamiento en el paño, mostró un título de TCID50 $10^{5,5}$ /mL.

Al finalizar el tratamiento dentro de la cabina NEVOLA mediante tecnología Dust-Free FC UNIT 3 ", los títulos virales estimados en las soluciones depositadas en el interior de las placas de Petri y expuestas a la tecnología durante 20 y 30 minutos fueron respectivamente TCID50 10^7 /mL y $10^{7,1}$ /mL.

En comparación con el tratamiento con la misma tecnología en paños Texwipe, los títulos virales obtenidos fueron iguales a TCID50 10^3 / ml para ambos tiempos de exposición.

Las suspensiones de SARS-CoV-2, tratadas con una solución de cloruro de benzalconio al 4% nebulizada dentro del dispositivo NEVOLA, mostraron un título de TCID50 $10^{7,6}$ /mL y $10^{7,9}$ /mL cuando se expusieron en forma líquida dentro de las placas de Petri, respectivamente. para el tratamiento 1 (45 segundos de nebulización) y el tratamiento 2 (90 segundos de nebulización y 20 minutos de exposición); el título viral alcanzó respectivamente los valores de DICT50 10^6 /mL y $10^{5,8}$ /mL con las soluciones depositadas sobre un paño Texwipe y tratadas con la misma tecnología nebulizadora para el tratamiento 1 (45 segundos de nebulización) y el tratamiento 2 (90 segundos de nebulización y 20 minutos de exposición).

La desviación estándar calculada para el ensayo de titulación viral (TCID50) fue del 0,5% (0,5 log).

Para cada ensayo individual (controles y tratamientos), no se observan diferencias significativas entre los títulos virales obtenidos y los tiempos de latencia en el aire (controles) y exposición a los tratamientos.

Los controles negativos de todas las placas utilizadas para los ensayos muestran un excelente estado de la monocapa celular resultando bien teñido y sin ningún efecto citopático.

6.CONCLUSIONES

A frente del acuerdo estipulado entre la Universidad de Milán, concretamente entre el Departamento de Ciencias Biomédicas y Clínicas "Luigi Sacco" y la empresa Air Control Srl (PI 04805320969), se realizó un protocolo de estudio destinado a evaluar la actividad viricida del dispositivo NEVOLA contra el SARS-CoV-2. A partir de los análisis de los datos obtenidos experimentalmente, el dispositivo NEVOLA, cuando se utiliza con activación de la tecnología Dust-Free FC UNIT 3, ha demostrado la capacidad de reducir la carga viral de SARS-CoV-2 inoculado en fase líquida tanto en superficie como en un tejido.

La reducción verificada en placa de Petri inoculada de SARS-CoV-2, expuesta al aire tratado durante 20 minutos en un volumen de $2,13 \text{ m}^3$, mostró una reducción de 1,0 log (90,0%) mayor que la reducción natural del virus verificado en la prueba de control, realizada en las mismas condiciones, pero sin tecnología Dust Free.

La reducción verificada en la tela compuesta por 45% de poliéster y 55% de celulosa, inoculada con SARS-CoV-2, expuesta al aire tratado durante 20 minutos en un volumen de $2,13 \text{ m}^3$, en cambio mostró una reducción de 2,5 log (99,7%) mayor que la reducción natural del virus verificado en la prueba de control, realizada en las mismas condiciones, pero sin tecnología Dust Free.

El ventilador utilizado tiene un caudal de aire de 35 mch.

En las condiciones experimentales evaluadas, la tecnología de vapor con nebulización de una solución de cloruro de benzalconio al 4% aplicada al dispositivo NEVOLA no muestra resultados apreciables en cuanto a reducción del título viral. Más estudios en profundidad de la combinación de la tecnología de nebulización y el dispositivo NEVOLA son necesarios para la mejora del tratamiento contra el SARS-CoV-2

7.BIBLIOGRAFÍA

- 1) EN14476:2013
- 2) 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.
- 3) ASTM E1053 - 11 Standard Test Method to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces.
- 4) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MW000351>
- 5) 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
- 6) <https://aircontrolclima.it/moduli-fc-unit/>