

*Tłumaczenie raportu z badania skuteczności wirusobójczej urządzeń  
Sanity System przeciwko wirusowi SARS-CoV-2.*

*Uniwersytet w Padwie (Włochy), 02.11.2020*

# SPRAWOZDANIE DOTYCZĄCE SKUTECZNOŚCI DZIAŁANIA WIRUSOBÓJCZEGO

Ilościowa zawieszinowa metoda oceny działania wirusobójczego  
w stosunku do wirusa SARS-CoV-2

**Produkt:**  
**urządzenie SANITY SYSTEM**  
**służące do dezynfekcji pomieszczeń (powietrza i powierzchni)**  
**z wykorzystaniem technologii ozonowania**

## ZLECENIODAWCA

**Sanity System Italia Srl.** Adres: Via delle Industrie, 13/C – 35010 Limena (PD)

Nr VAT i nr podatkowy: 04954700284

## KIEROWNIK NAUKOWY

Prof. Andrea Crisanti

**Współpracownicy:** dr Claudia Del Vecchio

Data sprawozdania: 02.11.2020

[pieczęć okrągła:  
Wydział Medycyny Molekularnej  
Uniwersytet w Padwie]

## SPIS TREŚCI

|  |   |
|--|---|
| 1. Cel .....   | 4 |
| 2. Pojęcia i definicje.....                                    | 4 |
| 3. Wstęp .....   | 4 |
| 4. Charakterystyka próbek .....                                | 4 |
| 5. Warunki przeprowadzenia badania .....                       | 5 |
| 6. Materiały i odczynniki .....                                | 5 |
| 7. Przyrządy .....   | 6 |
| 8. Testy wstępne .....   | 6 |
| 9. Weryfikacja inaktywacji – test z użyciem formaldehydu ..... | 6 |
| 10. Weryfikacja działania wirusobójczego urządzeń.....         | 7 |
| 11. Obliczanie formułowania wyników.....                       | 8 |
| 12. Wyniki i działanie wirusobójcze .....                      | 8 |
| 13. Wniosek.....   | 9 |
| 14. Odniesienia.....   | 9 |

## 1. CEL

Niniejsze sprawozdanie ma a celu określenie w sposób jasny i szczegółowy trybu przeprowadzenia i wyników badań realizowanych w celu weryfikacji działania wirusobójczego na powierzchniach przyrządów z wykorzystaniem ozonu.

## 2. POJĘCIA I DEFINICJE

**Działanie wirusobójcze lub przeciwwirusowe:** zdolność produktu do zmniejszenia liczby zakaźnych cząsteczek wirusów określona poprzez procedury doświadczalne obejmujące precyzyjne i zdefiniowane warunki badania.

**Jednostki określające miano wirusa (PFU):** liczba zakaźnych cząsteczek wirusa na mL.

**ID<sub>50</sub>:** średnia dawka zaraźliwa zawiesiny wirusowej lub rozcieńczenia zawiesiny wirusowej, która wywołuje średnie działanie cytotoksyczne wirusa w hodowlach komórkowych (CPE).

**Działanie cytotoksyczne wirusa (CPE):** zmiany morfologiczne zachodzące w komórkach i/lub zniszczenie komórek wskutek namnażania się wirusa.

**Inaktywacja wirusów:** zmniejszenie zakaźności wirusa w stosunku do analizowanego produktu.

## 3. WSTĘP

Badania sprawdzające działanie polegające na hamowaniu aktywności (działanie wirusobójcze) wirusa SARS-CoV-2 przez urządzenie „Sanity System” (testowany produkt) zostały zrealizowane na Wydziale Medycyny Molekularnej (Uniwersytet w Padwie). Wszystkie badania zostały przeprowadzone w laboratorium bezpieczeństwa biologicznego poziomu 3 (BSL3).

Działalność wirusobójcza została zbadana z wykorzystaniem szczepu SARS-CoV-2. Wszystkie badania zostały przeprowadzone w laboratorium bezpieczeństwa biologicznego poziomu 3 (BSL3).

## 4. CHARAKTERYSTYKA PRÓBEK

**Produkt:** Urządzenie „Sanity System”

**Opis produktu:** Sanity System, model SANYMED to urządzenie służące do profesjonalnego odkażania, usuwające bakterie, grzyby, wirusy i ogólnie wszelkie obciążenia mikrobiologiczne, jak też i zanieczyszczenia oraz zapachy.

**Warunki przechowywania:** w temperaturze pokojowej

**Instrukcje dotyczące przyrządów:** zob. załącznik

## 5. WARUNKI PRZEPROWADZENIA BADANIA

**Temperatura przeprowadzenia testu:** został wykonany w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Czas kontaktu:** według wskazań producenta

**Okres prowadzenia badań:** data rozpoczęcia testu 16.08.2020, data zakończenia testu 30.09.2020

## 6. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI

### Badane mikroorganizmy:

SARS-CoV 2

### Linia komórkowa:

VERO E 6 (ATCC CCL-81)\*

\*ATCC (American Type Culture Collections)

### Zapasy wirusa w zawiesinie

Każda zawiesina wirusowa została przygotowana i zintensyfikowana na dużą skalę w jednowarstwowych hodowlach komórkowych. Po zakażeniu i namnożeniu się wirusa, pozostałości komórkowe zostały usunięte przez podwójne odwirowanie z małą prędkością (2500 obr./min przez 10 min), a następnie pobrano nadsącz zawierający wirusa, w celu określenia miana wirusa. Podzielono zawiesinę na wzorcowe porcje o objętości 2 ml w probówkach Eppendorfa i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  w zamrażarce.

### Hodowle komórkowe

Komórki VERO E6, komórki nabłonkowe pochodzące z nerek naczelnych (linia ciągła).

### Nośniki (carriers)

Wykorzystano tarczki stalowe INOX AISI 316 o średnicy 35 mm, wcześniej wysterylizowane w autoklawie.

### PODŁOŻE MIKROBIOLOGICZNE I ODCZYNNIKI

Dla celów analizy odczynniki muszą być czyste i/lub odpowiednie do zastosowań mikrobiologicznych.

### Pożywka hodowli komórkowej

Każda linia komórkowa jest przechowywana w termosie w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przy 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  na podłożu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z dodatkiem 10% (v/v) surowicy płodu cielęcego (FBS) i 1% (p/v) di penicyliny – streptomycyny (pen-strep).

### Phosphate Buffered Saline (PBS) [roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami]

Roztwór zawierający: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,89 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,20 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  w 1000 ml wody destylowanej.

## 7. PRZYRZĄDY

- Mikroskop odwrócony do obserwacji hodowli komórkowych
- Sekundomierz
- Mieszadło Vortex
- Wirówka
- Inkubator CO<sub>2</sub> (5% v/v) mogący podtrzymywać temperaturę 37°C ± 1°C.
- Pionowy laminarny kaptur przepływowy „BioHazard” klasy II
- Zamrażarki

## 8. BADANIA WSTĘPNE

### Przygotowanie zawiesiny wirusowej – miano wirusa

Zmieszano 0,2 ml zawiesiny wirusowej (roztworu podstawowego) + 1,8 ml DMEM serum-free i przygotowano rozcieńczenia seryjne od 10<sup>-2</sup> do 10<sup>-9</sup> (rozcieńczenia 1:10).

250 µl każdego rozcieńczenia przeniesiono na 24-dołkowe płytki zawierające jednowarstwową hodowlę komórek (>90%) po aspiracji podłoża hodowlanego. Każde rozcieńczenie zawiesiny wirusowej było pogrupowane po 6 w płytce. 12 dołków pozostawiono bez inokulum (kontrola linii komórkowej). Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C (czas adsorpcji wirusowej), inokulum zostało usunięte, wykonano obmycie z pomocą PBS, a kolejne 500 µl DMEM zostało dodane wraz z 2% (v/v) FBS i 0,75% (v/v) karboksymetylocelulozy.

### Warunki inkubacji w termosie

Zakażenia zostały umieszczone w inkubatorze z 5% (v/v) CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C ± 1°C i obserwowane pod mikroskopem odwróconym w celu wykrycia tworzenia się płytek rozpadu, spowodowanych efektem cytotatycznym (CPE) zawiesiny wirusowej. Płytki znajdujące się w dołkach zostały zliczone pod mikroskopem odwróconym w rozcieńczeniu służącym do obliczeń, po utrwaleniu w formaldehydzie i zabarwieniu krystalicznym roztworem fioleto.

Wyniki CPE (testu ilościowego) dla każdego rozcieńczenia zostały ujęte jako odsetek pozytywnych wyników między 100% a 0% i zapisane jako „0” dla braku CPE oraz od „1” (25% CPE) do „4” (100% CPE) w zależności od stopnia uszkodzenia komórek.

Miano zakaźne zostało obliczone metodą Spaerman-Kärber (ocena ID<sub>50</sub>).

## 9. WERYFIKACJA INAKTYWACJI – TEST Z UŻYCIEM FORMALDEHYDU

2 mL zawiesiny wirusowej zostały wymieszane z 8 mL PBS i 10 mL roztworu formaldehydu 1,4 % (p/v) w celu kontroli poprawności działania systemu. Bezpośrednio po kontakcie trwającym 30 min. e 60 min., wymieszano 0,2 mL powyższego roztworu z 1,8 mL DMEM + 2% FBS w lodzie.

Wykonano rozcieńczenia seryjne od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  (rozcieńczenia 1:10) z PBS + 2% FBS. Dla każdego rozcieńczenia rozprowadzono 250  $\mu$ l w 6 dołkach 24-dołkowej mikroptytki i umieszczono w inkubatorze, w temperaturze 37°C na 1 godzinę. Następnie, po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C (czas absorpcji wirusowej), usunięto inokulum, wykonano obmycie z PBS i dodano 500  $\mu$ l di DMEM z dodatkiem 2% (v/v) FBS i 0,75% (v/v) karboksymetylocelulozy.

Hodowle komórkowe zostały umieszczone w inkubatorze z 5%(v/v) CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C  $\pm$  1°C i były obserwowane pod odwróconym mikroskopem w celu wykrycia efektu cytopatycznego (CPE) zawiesiny wirusowej. Płytki znajdujące się w dołkach zostały zliczone w rozcieńczeniu służącym do obliczeń, po utrwaleniu w formaldehydzie i zabarwieniu krystalicznym roztworem fioletu oraz metanolu. Wyniki CPE (testu ilościowego) dla każdego rozcieńczenia zostały ujęte jako odsetek pozytywnych wyników między 100% a 0% i zapisane jako „0” dla braku CPE oraz od „1” (25% CPE) do „4” (100% CPE) w zależności od stopnia uszkodzenia komórek.

Miano zakaźne zostało obliczone metodą Spaerman-Kärber (ocena ID<sub>50</sub>).

#### **Cytotoksyczność roztworu – test z użyciem formaldehydu**

Dodano 1 ml formaldehydu 1,4% (p/v) do 1 ml PBS. Z tego rozcieńczenia przygotowano rozcieńczenia seryjne od  $10^{-2}$  do  $10^{-4}$  (rozcieńczenia 1:10) poprzez pobranie 0.2 ml uzyskanej mieszaniny + 1.8 ml DMEM serum-free.

0.1 ml z każdego rozcieńczenia umieszczono po 6 w płytkach z jednowarstwowymi koefluencyjnymi hodowlami komórkowymi (>90%). Mieszaniny nie umieszczono w 6 dołkach (kontrola linii komórkowej). Po 1 godzinie w temperaturze 37°C  $\pm$  1°C dodano 100  $\mu$ l DMEM + 10% FBS, po czym hodowla komórkowa została włożona do inkubatora w temperaturze 37°C  $\pm$  1°C, przy 5% CO<sub>2</sub> i stale obserwowana pod mikroskopem odwróconym przez kolejne 9 dni, w celu zaobserwowania efektu cytopatycznego (CPE), spowodowanego cytotoksycznym działaniem formaldehydu.

## **10. WERYFIKACJA DZIAŁANIA WIRUSOBÓJCZEGO URZĄDZEŃ**

### **PRZYGOTOWANIE ZAWIESINY WIRUSOWEJ**

W celu przygotowania zawiesiny wirusowej dla potrzeb testu – zob. punkt 8 – TESTY WSTĘPNE.

### **FAZA NARAŻENIA NA DZIAŁANIE CZYNNIKA**

#### **Przygotowanie nośników**

Nośniki przed użyciem zostały wysterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C przez 5 min. Następnie umieszczono je w pustych szalkach Petriego. Na nośnikach kontrolnych oraz nośnikach wystawionych na działanie ozonu umieszczono 50  $\mu$ l zawiesiny wirusowej, która następnie została dobrze rozprowadzona. Pozostawiono zawiesinę do wyschnięcia pod przepływowym kapturem laminarnym.

#### **Nośniki kontrolne**

Nośniki kontrolne są przechowywane w laboratorium pod zamkniętą pokrywą szalki Petriego.

**Nośniki wystawione na działanie ozonu**

Nośniki, które miały być wystawione na działanie ozonu, zostały umieszczone w dostarczonej witrynie z otwartą pokrywą, w pozycji przeciwnej do położenia urządzenia testowego, umożliwiającą ekspozycję na działanie przyrządów Sanity System.

**FAZA ZBIERANIA****Zbieranie nośników**

Wszystkie nośniki (narażone i kontrolne) zostały pobrane z 1 mL pożywki hodowli. Następnie nośniki poddano skrobaniu przez 1 minutę. Przygotowano rozcieńczenia seryjne  $10^{-2}$  do  $10^{-9}$  (rozcieńczenia 1:10).

**Umieszczenie na płytkach i inkubacja**

250  $\mu$ l z każdego rozcieńczenia przeniesiono na płytkę z 24 dołkami zawierającymi jednowarstwową konfluencyjną hodowlę komórkową (>90%) po aspiracji podłoża hodowli. Każde rozcieńczenie zawiesiny wirusowej było pogrupowane po 6 w płytce. 12 dołków pozostawiono bez inokulum, (kontrola linii komórkowej). Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C (czas adsorpcji wirusowej), inokulum zostało usunięte, wykonano obmycie z pomocą PBS, a kolejne 500  $\mu$ l DMEM zostało dodane wraz z 2% (v/v) FBS i 0,75% (v/v) karboksymetylocelulozy.

**11. OBLICZANIE FORMUŁOWANIA WYNIKÓW****Określanie miana zakaźnego (ID<sub>50</sub>).**

Działanie zakaźne zostało określone metodą Spaerman-Kärber, która wykorzystuje następującą formułę dla celu obliczenia wartości ID<sub>50</sub>:

$$-\log_{10} ID_{50} = - (x_0) - \{ [ R/100 ] - 0,5 \} \times \log_{10} \text{współczynnika rozcieńczenia}$$

Gdzie:

$x_0$  =  $\log_{10}$  minimalnego rozcieńczenia przy 100% reakcji pozytywnej

(CPE) R = zsumowanie (%) wyhodowanych kultur

Badanie działania wirusobójczego jest wykonane prawidłowo, kiedy podczas testów wstępnych spełniony zostaje następujący warunek: zawiesina wirusowa musi stanowić koncentrację wirusów umożliwiającą zmniejszenie początkowego miana wirusowego o do najmniej 4 lg: ID<sub>50</sub> = 10<sup>7</sup> /mL.

**12. WYNIKI I DZIAŁANIE WIRUSOBÓJCZE**

Testy zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu programów P1 i P2. Otrzymane wyniki zostały przedstawione w Tabeli nr 1.



| Program | Test | Początkowe miano zakaźne | Miano zakaźne po wykonanych działaniach | % redukcji |
|---------|------|--------------------------|---|------------|
| P1      | 1    | 6,5                      | 0,5                                     | 92,3       |
|         | 2    | 6,6                      | 0,4                                     | 93,9       |
| P2      | 1    | 7,0                      | 0,02                                    | 99,7       |
|         | 2    | 7,0                      | 0,01                                    | 99,9       |

**Tabela 1** Efekty działania Sanity System. Wartości redukcji liczebności wirusa zostały wyrażone w jednostkach logarytmicznych i w odsetkach. P1 – program 1, P2 – program 2.

W świetle otrzymanych wyników, powtórzono testy w tych samych warunkach, używając wyłącznie programu 2, którego wyniki są zawarte w poniższej tabeli nr 2.

| Program | Test | Początkowe miano zakaźne | Miano zakaźne po wykonanych działaniach | % redukcji |
|---------|------|--------------------------|---|------------|
| P2      | 3    | 7,0                      | 0,01                                    | 99,9       |
|         | 4    | 7,0                      | 0,02                                    | 99,7       |
|         | 5    | 7,0                      | 0,05                                    | 99,3       |

**Tabela 2** Efekty działania Sanity System. Wartości redukcji liczebności wirusa zostały wyrażone w jednostkach logarytmicznych i w odsetkach.

\* Dane przedstawiają wartości logarytmiczne jednostek określających miano wirusa (PFU/ml) w odniesieniu do 1 ml testowej zawiesiny wirusowej.

## 13. WNIOSEK

Otrzymane wyniki dowodzą, że urządzenie Sanity System (technologia oparta na zastosowaniu ozonu) charakteryzuje się skutecznością działania wirusobójczego wobec SARS-CoV-2 z obniżeniem liczebności wirusa o ponad 99% przy użyciu programu P2.

## 14. ODNIESIENIA

- **NORMA EUROPEJSKA EN 17272:2020 Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne**  
Metody dezynfekcji pomieszczeń drogą powietrzną z wykorzystaniem zautomatyzowanych procesów
- **NORMA EUROPEJSKA EN 14476:2019 Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne**  
Ilościowa zawieszinowa metoda określania działania wirusobójczego w obszarze medycznym

- **ISO/IEC 17025:2017** Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących
- **ISO 15189:2012** Laboratoria medyczne  
Wymagania dotyczące jakości i kompetencji

Właściciel: Hubert Manikowski – wyłączny dystrybutor Sanity System w Polsce