



AirLog⁶[®]

Oggetto: introduzione allo studio di valutazione dell'attività virucida del formulato Air Log 6 su ceppi di SARS-CoV-2

Il presente report descrive uno studio eseguito per valutare l'attività virucida di una formulazione denominata Air Log 6, idoneo all'aerosolizzazione secondo le direttive OMS 2003, su ceppi di SARS-CoV-2, a differenti titoli di carica virale e differenti concentrazioni, al fine di determinare un esatto decremento del titolo virale.

Il saggio evidenzia una degradazione dell'infettività virale SARS-CoV-2 di **2,7 log**, a fronte di un valore stabilito dalle comunità scientifiche internazionali di 2 logaritmi, necessario per considerare un formulato valido ed efficace nella lotta alle pandemie virali.

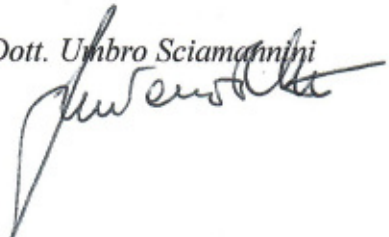
Inoltre il saggio contiene una attenta valutazione sulla citotossicità cellulare, come ulteriore garanzia per il metodo di impiego come sanizzante permanente nell'aria, fornendo un'ampia sicurezza per l'utilizzo in presenza di persone.

Lo studio è stato eseguito presso il Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia Università di Pisa

Coordinatore Prof. Mauro Pistello

Esecutore Dott.ssa Paola Quaranta

16 -12 - 2020

Dott. Umbro Sciamannini


CH . I . S . S . S.R.L.

Sede legale Piazza San Pietro in Vincoli 10 – 00184 Roma (RM)
Sede operativa Via Flaminia Ternana, 446 - 05035 Narni (TR)
Unità locale Via Giovanni Durando 38 – 20158 Milano (MI)

info@chiss.it - ww.chiss.it



UNIVERSITÀ DI PISA

*Dipartimento di Ricerca Traslazionale
e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia*

Via Savi, 10 - 56126 PISA

Tel: 050 2211828 - Fax: 050 2210624

Valutazione dell'attività virucida di una formulazione disinfettante

Dicembre 2020

Coordinatore dello Studio:

Prof. Mauro Pistello

Progetto ed Esecuzione dello Studio

Dott.ssa Paola Quaranta



UNIVERSITÀ DI PISA

*Dipartimento di Ricerca Traslazionale
e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia*

Via Savi, 10 - 56126 PISA

Tel: 050 2211828 - Fax: 050 2210624

Scopo dello Studio. Il presente report descrive uno studio eseguito per valutare l'attività virucida di una formulazione AIRLOG6 (CH. I. S. S. s.r.l., via Flaminia 446 – 05035 Narni (TR)). Lo studio è stato condotto secondo la procedura descritta di seguito, valutando l'attività antivirale nei confronti di Coronavirus SARS-COV2.

Formulazione disinfettante in esame. La formulazione disinfettante AIRLOG6 saggiata nel presente studio è stata fornita direttamente dal distributore (CH. I. S. S. s.r.l., via Flaminia 446 – 05035 Narni (TR)) in forma liquida. Sulla base della dichiarazione del produttore, il principio attivo della formulazione è 2 propanolo con 1 propanolo 42%, clorex raffinata 0,25%, alcol isopropilico. La formulazione disinfettante è stata saggiata alle diluizioni: puro, 10%; 1%; 0,1%. Le diluizioni sono state preparate diluendo la soluzione in terreno di coltura cellulare.

Condizioni dello Studio

Lo studio è stato condotto nel seguente modo.

Un'aliquota della sospensione virale, 200 μ l, è stata aggiunta a 200 μ l del prodotto valutato. La miscela virus-formulazione disinfettante è stata mantenuta a 20°C (\pm 1) per 30 minuti. Dopo incubazione, un'aliquota è stata immediatamente raccolta e sono state preparate delle diluizioni in ragione di 10 (fino a 10⁻⁴) in DMEM che sono state trasferite in una micropiastre da 96 pozzetti in cui precedentemente sono state seminate le cellule in 100 μ l di terreno di coltura (DMEM).

Il titolo infettante è stato successivamente calcolato mediante valutazione della ID₅₀ (diluizione della sospensione virale che è capace di indurre effetto citopatico nel 50% dei pozzetti). In sintesi, sono state adottate le seguenti condizioni sperimentali:

- Concentrazione AIRLOG 6 testate: puro, 10%, 1% e 0,1%.
- Temperatura: 20°C
- Tempo di contatto 30 min

Colture cellulari e sospensione virale stock. Nel presente studio è stato utilizzato l'isolato clinico SARS-COV-2 P-MI-0520 che presenta elevata attività citocida in vitro e contro svariati tipi cellulari. Gli stock di sospensione virale sono stati ottenuti infettando monostrati cellulari di Vero E6 confluenti all'80% coltivate in presenza di D-MEM supplementato con 5% di FCS. In presenza di effetto citopatico maggiore dell'80%, cellule e supernatanti sono stati raccolti e sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento e successiva centrifugazione a 400 g x 15 min per scartare i detriti cellulari. Il titolo virale è stato determinato mediante metodo della diluizione limite eseguito su cellule Vero E6 seminate in piastre da 96 pozzetti. Brevemente, le cellule confluenti sono state infettate in ottuplicato con 50 μ l di diluizioni seriali 1/10 della sospensione virale



UNIVERSITÀ DI PISA

*Dipartimento di Ricerca Traslazionale
e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia*

Via Savi, 10 - 56126 PISA

Tel: 050 2211828 - Fax: 050 2210624

le cellule sono state mantenute in incubazione per quattro giorni a 37 °C in incubatore a CO₂. Alla fine del tempo di incubazione è stato valutato l'effetto citopatico ed il titolo virale è stato determinato mediante il metodo di Spearman-Kärber.

Valutazione dell'effetto citotossico della formulazione in esame

Per valutare l'effetto citotossico esercitato dalla soluzione sulle cellule, monostrati di Vero E6 sono state trattate con AIRLOG6 a diluizioni diverse partendo da 1:3 e preparando diluizioni seriali 1:10 in DMEM e sono state tenute in incubazione per 24h. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio WST-8, dopo 24 h sono stati aggiunti 10 µl di WST-1 e misurando l'assorbanza a 460 nm.

Saggio dell'attività virucida. Dopo preparazione del prodotto in esame, 1 parte della sospensione virale è stata aggiunta a 1 parte di prodotto. Immediatamente al termine del tempo di contatto, sono state preparate diluizioni fino a 10⁻⁴ e l'infettività virale è stata valutata come descritto precedentemente mediante calcolo della ID₅₀ per ml.

Risultati dello Studio

Le sospensioni virali stock utilizzate sono costituite dall'isolato clinico P-MI-0520 SARS-CoV-2 alla concentrazione 10¹² TCID₅₀/ml. Per valutare la più alta concentrazione della formulazione in esame non tossica per le cellule, questa è stata saggiata in diluizioni con fattore 10 dalla concentrazione d'uso alla diluizione 10⁻¹¹ seminate in monostrati cellulari confluenti all'80%. Tale concentrazione è risultata essere 10⁻² ossia pari a 1%. Il saggio per misurare l'attività antivirale è stato allestito utilizzando il preparato alle concentrazioni: puro, 10%, 1%, 0,1%. L'attività della formulazione in esame è stata valutata mantenendo in incubazione con il virus per 30 min a 20 °C.

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti in termini di titolo virale dopo trattamento.

AirLOG6

Concentrazione	Titolo SARS-CoV-2	Decremento del titolo virale
puro	1,5	1,74
10%	0,5	2,74
1%	2,5	0,74
0,1%	3	0,24
0%	3,24	==

*logaritmo TCID₅₀



UNIVERSITÀ DI PISA

*Dipartimento di Ricerca Traslazionale
e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia*

Via Savi, 10 - 56126 PISA

Tel: 050 2211828 - Fax: 050 2210624

Come mostrato in tabella, il prodotto AIRLOG6 è in grado di abbattere l'infettività virale di SARS-CoV-2 di 2,7 log quando saggiata alla diluizione dello 10% per un tempo di incubazione di 30 minuti.

Conclusioni

Il prodotto AirLOG6 fornito da CH. I. S. S. s.r.l. e testato su virus SARS-CoV-2 è in grado di abbattere l'infettività virale di 2,7 logaritmi.

Data

15/12/2020

Firma

Paolo Quaranta

Paolo Quaranta