

**Determinazione dell'Attività Antivirale di Ozono e Ioni Negativi
Prodotti con Icon3 di M2L/O3zono Srl contro SARS-CoV-2**

2 Novembre 2020

Sperimentatore	ViroStatics srl c/o Porto Conte Ricerche Loc. Tramariglio, Alghero, Sassari
Committente	M2L/O3zono Viale S. Lazzaro, Vicenza

Headquarters and Laboratories

c/o Porto Conte Ricerche
07041 Alghero (SS), Italy
VAT 02159110903
info@virostatics.it

Registered Office

Viale Umberto I°, 46
07100 Sassari, Italy
Registration # 152871
www.virostatics.com

Dichiarazione di conformità

Gli esperimenti sono stati condotti seguendo protocolli interni di controllo qualità, monitorando i processi di esecuzione e registrazione degli studi, in modo conforme alle normative di Good Laboratory Practice (GLP like) per la produzione di dati affidabili e per assicurare la validità dei test stessi.

Lo studio è stato condotto all'interno delle strutture di ViroStatics nel periodo qui indicato.

Inizio attività sperimentali	19 Ott 2020
Fine attività sperimentali	30 Ott 2020

Firma del Direttore dello Studio

Data

Devi de F...

.....

.....2 Novembre 2020.....

Dettagli dello studio

Struttura di svolgimento dei test: ViroStatics Srl
Porto Conte Ricerche, Loc. Tramariglio
07041 Alghero (Sassari)

Direttore dello studio: Dott. Davide De Forni (CSO)

Personale coinvolto: Dott. ssa Barbara Poddesu (Ricercatrice Senior)
Dott. ssa Giulia Cugia (Ricercatrice Senior)

Introduzione

È stata valutata l'azione virucida nei confronti del nuovo coronavirus SARS-CoV-2 di un trattamento con ozono e ioni negativi effettuato tramite la macchina Icon3 (ozonizzatore e ionizzatore) dell'azienda M2L/O3zono, determinando la riduzione del titolo virale (la misura della più piccola quantità di particelle virali in grado di infettare il 50% delle cellule in una coltura).

Per determinare il titolo virale è stato utilizzato un sistema cellulare *in vitro*.

Metodi

Una sospensione di virus SARS-CoV-2 di 6 μL , suddivisa in goccioline da 0.5 μL , è stata esposta ad un trattamento con ozono e ioni negativi prodotti dalla macchina Icon3. Il trattamento è avvenuto all'interno di un contenitore in plastica del volume di 57 L, all'interno del quale è stata posta la macchina Icon3 insieme alla piastra contenente il virus. Il contenitore è sempre rimasto, per ragioni di sicurezza, sotto cappa biologica a flusso laminare di classe II.

La quantità di ozono e ioni negativi e la durata del trattamento sono state controllate da M2L/O3zono tramite un'applicazione informatica che regolava l'accensione e lo spegnimento della macchina Icon3. La quantità di ozono è stata monitorata durante il trattamento mediante un rilevatore di gas ozono Pump Type Gas Detector (range di misura 0-50 ppm, risoluzione 0.01 ppm).

Le condizioni sperimentali utilizzate sono riassunte di seguito:

Volume di sospensione del virus: 6 μL , suddivisa in 12 goccioline da 0.5 μL , depositate sul fondo di pozzetti di una piastra da 96

Quantità di ozono usata per il trattamento: range 2,40-3,37 ppm

Quantità di ioni negativi: 3 accensioni di 3 secondi ciascuna nel corso dei primi 20 minuti (secondo la ditta costruttrice la macchina Icon3 è in grado di erogare 80 milioni di ioni negativi per cm^3 in un tempo di 3-5 minuti)

Tempo di contatto: 20 minuti (+20 minuti per attendere il decadimento naturale dell'ozono)

Temperatura di test: $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Il virus esposto all'aria invece che all'ozono nello stesso volume di sospensione e per lo stesso tempo di contatto è stato utilizzato come controllo.

Dopo il trattamento è stato utilizzato un volume totale di 10 μL di terreno per recuperare il virus sul fondo di ciascun pozzetto della piastra da 96.

Per la determinazione del titolo del virus trattato con aria e del virus trattato con ozono e ioni negativi è stato utilizzato un sistema cellulare. Le cellule Vero E6 (cellule epiteliali renali del cercopiteco grigioverde, ATCC CRL-1586) sono state mantenute in coltura alla loro densità ottimale in base alle indicazioni riportate dalla ATCC. Al giorno 1 dell'esperimento le cellule sono state trasferite in piastre da 96 pozzetti (10.000 cellule per pozzetto). Al giorno 2 dell'esperimento le cellule sono state infettate utilizzando diluizioni seriali (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ...) della sospensione di virus raccolta in seguito alla prova con ozono e del controllo trattato con aria. Ciascuna diluizione virale è stata testata in 6 repliche.

Dopo 3 giorni, è stato prelevato il surnatante dai pozzetti di coltura ed è stata determinata l'avvenuta o mancata infezione in ciascun pozzetto della piastra, tramite un saggio ELISA (che permette la rilevazione della nucleoproteina NP del virus - SARS-CoV-2 Nucleocapsid Detection ELISA Kit, Sino Biological).

I dati raccolti sono stati utilizzati per calcolare il titolo del virus trattato con ozono e ioni negativi o trattato con aria tramite il metodo descritto da Reed e Muench.

I dati di infezione ottenuti con il saggio ELISA sono stati utilizzati per preparare la seguente tabella:

A	B	C	D	E	F
Diluizione del Virus	No. Pozzetti infetti	No. Pozzetti non infetti	No. cumulativo di infetti	No. cumulativo di non infetti	Rapporto di pozzetti infetti sul totale (%)
10 ⁻²					
10 ⁻³					
10 ⁻⁴					
10 ⁻⁵					
...					

Nella prima riga vengono inseriti i dati relativi alla diluizione virale con 6/6 pozzetti infetti. Nell'ultima riga vengono inseriti i dati relativi alla diluizione virale con 0/6 pozzetti infetti.

Nella colonna B viene inserito il numero di pozzetti infetti per ciascuna diluizione virale.

Nella colonna C viene inserito il numero di pozzetti non infetti per ciascuna diluizione virale.

La colonna D rappresenta il numero cumulativo di pozzetti infetti calcolato sommando i numeri della colonna B, partendo dal basso e aggiungendo i numeri sopra.

La colonna E rappresenta il numero cumulativo di pozzetti non infetti calcolato sommando i numeri della colonna C, partendo dall'alto e aggiungendo i numeri sotto.

La colonna F rappresenta il rapporto cumulativo di pozzetti infetti: colonna D/(colonna D + colonna E), espresso in percentuale.

Viene calcolata la distanza proporzionale tra le due diluizioni virali più vicine al 50%:

$$\frac{(\% \text{ rapporto pozzetti infetti sopra il } 50\%) - 50\%}{$$

$$(\% \text{ rapporto pozzetti infetti sopra il } 50\%) - (\% \text{ rapporto pozzetti infetti sotto il } 50\%)$$

Viene quindi applicato un fattore di correzione per il fattore di diluizione (-1).

Viene aggiunto il fattore di diluizione relativo alla diluizione virale con un rapporto di infezione sopra al 50%.

Il valore ottenuto viene utilizzato come esponente con base 10 per ottenere il titolo virale ($\mu\text{L}/\text{TCID}_{50}$), cioè il volume in cui è contenuta una TCID_{50} (quantità di virus richiesto per causare l'infezione nel 50% delle cellule di una coltura).

Risultati

Virus trattato con aria

Volume di sospensione del virus: 12x0.5 µL

Tempo di contatto: 40 minuti

La Tabella 1 riporta i pozzetti infetti (in rosso) e i pozzetti non infetti (in verde) per ciascuna diluizione virale testata. I valori indicano la densità ottica rilevata dal lettore ELISA a 450 nm. Vengono considerati infetti i pozzetti con una densità ottica superiore a quella del pozzetto controllo (diluyente), pari a 0.1.

Tabella 1. Virus trattato con aria: numero di pozzetti infetti e non infetti alle diverse diluizioni virali testate.

Aria	Diluizioni virali testate					
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Replica 1	>3	>3	0.12	0.09	0.19	0.09
Replica 2	>3	>3	0.07	0.08	0.28	0.09
Replica 3	>3	>3	0.19	0.08	0.08	0.09
Replica 4	>3	>3	0.12	0.07	0.08	0.09
Replica 5	>3	>3	0.33	0.09	0.10	0.09
Replica 6	>3	>3	>3	0.11	0.12	0.07

La Tabella 2 riporta il calcolo dei rapporti di infezione alle diverse diluizioni virali testate.

Tabella 2. Virus trattato con aria: rapporti di infezione alle diverse diluizioni virali

A	B	C	D	E	F
Diluizione del Virus	No. Pozzetti infetti	No. Pozzetti non infetti	No. cumulativo di infetti	No. cumulativo di non infetti	Rapporto di pozzetti infetti sul totale (%)
10 ⁻⁴	6	0	16	0	100
10 ⁻⁵	5	1	10	1	90.9
10 ⁻⁶	1	5	5	6	45.5
10 ⁻⁷	4	2	4	8	33.3
10 ⁻⁸	0	6	0	14	0

Calcolo del titolo del virus trattato con aria.

(% rapporto pozzetti infetti sopra il 50%) – 50%

(% rapporto pozzetti infetti sopra il 50%) – (% rapporto pozzetti infetti sotto il 50%)

$$(90.9 - 50) / (90.9 - 45.5) = 0.9$$

Fattore di correzione: -5

Titolo del virus trattato con aria: $10^{-5.9} = 0.00000125 \mu\text{L}/\text{TCID}_{50}$ (ovvero $7.94\text{E}+08 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$)

Virus trattato con ozono e ioni negativi

Volume di sospensione del virus: 6 μL , suddivisa in 12 goccioline da 0.5 μL , depositate sul fondo di pozzetti di una piastra da 96

Quantità di ozono usata per il trattamento: range 2,40-3,37 ppm

Quantità di ioni negativi: 3 accensioni di 3 secondi ciascuna (secondo la ditta costruttrice la macchina Icon3 è in grado di erogare 80 milioni di ioni negativi per cm^3 in un tempo di 3-5 minuti)

Tempo di contatto: 20 minuti (+20 minuti per attendere il decadimento naturale dell'ozono)

Temperatura di test: $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

La Tabella 3 riporta i pozzetti infetti (in rosso) e i pozzetti non infetti (in verde) per ciascuna diluizione virale testata. I valori indicano la densità ottica rilevata dal lettore ELISA a 450 nm. Vengono considerati infetti i pozzetti con una densità ottica superiore a quella del pozzetto controllo (diluyente), pari a 0.1.

Tabella 3. Virus trattato con ozono e ioni negativi: numero di pozzetti infetti e non infetti alle diverse diluizioni virali testate.

Ozono e ioni negativi	Diluizioni virali testate				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Replica 1	>3	>3	0.08	0.07	0.07
Replica 2	>3	>3	0.08	0.07	0.07
Replica 3	>3	>3	>3	0.07	0.07
Replica 4	>3	>3	0.07	0.08	0.07
Replica 5	>3	>3	0.08	0.06	0.07
Replica 6	>3	>3	0.09	0.07	0.08

La Tabella 4 riporta il calcolo dei rapporti di infezione alle diverse diluizioni virali testate.

Tabella 4. Virus trattato con ozono e ioni negativi: rapporti di infezione alle diverse diluizioni virali

A	B	C	D	E	F
Diluizione del Virus	No. Pozzetti infetti	No. Pozzetti non infetti	No. cumulativo di infetti	No. cumulativo di non infetti	Rapporto di pozzetti infetti sul totale (%)
10 ⁻³	6	0	7	0	100
10 ⁻⁴	1	5	1	5	16.7
10 ⁻⁵	0	6	0	11	0

Calcolo del titolo del virus trattato con ozono e ioni negativi.

$$\frac{(\% \text{ rapporto pozzetti infetti sopra il } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ rapporto pozzetti infetti sopra il } 50\%) - (\% \text{ rapporto pozzetti infetti sotto il } 50\%)}$$

$$(\% \text{ rapporto pozzetti infetti sopra il } 50\%) - (\% \text{ rapporto pozzetti infetti sotto il } 50\%)$$

$$(100 - 50) / (100 - 16.7) = 0.6$$

Fattore di correzione: -3

Titolo del virus trattato con ozono e ioni negativi: $10^{-3.6} = 0.00025 \mu\text{L/TCID}_{50}$ (ovvero $3.98\text{E}+06 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$)

Il grafico seguente indica la percentuale del titolo del virus trattato con ozono e ioni negativi rispetto al virus controllo esposto all'aria (=100%).

Riduzione del titolo virale in seguito a trattamento con Icon3 di M2L/O3zono

