

Ministero della difesa della Federazione Russa
ISTITUZIONE PUBBLICA FEDERALE
"48 ° ISTITUTO CENTRALE DI RICERCA" DEL MINISTERO DELLA
DIFESA DELLA FEDERAZIONE RUSSA.
(IPF "48 ° ICR" del Ministero della Difesa russo)

APPROVATO DAL
Responsabile del IPF "48 ° ICR"
del ministero della difesa russo
Dottore in Scienze Biologiche, Professore,
Membro corrispondente della RAS

S . V . Borisevich

27 aprile 2020

PROTOCOLLO DI SPERIMENTAZIONE
Delle unità “Alfa -06” e “Alfa -09”
Sull’efficienza della disinfezione di superfici metalliche contaminate da
SARS - CoV -2 coronavirus

Sergiyev Posad - 2020

1 OGGETTO DELLA SPERIMENTAZIONE

1.1 l'oggetto della sperimentazione sono le unità "Alfa-06" e "Alfa-09".

2 OBIETTIVI E SCOPI DELLA SPERIMENTAZIONE

2.1 L'obiettivo è quello di determinare l'efficacia della disinfezione delle superfici di metallo contaminate da SARS - CoV -2 coronavirus (di seguito " coronavirus ") tramite l'utilizzo delle unità "Alfa-06" e "Alfa-09".

2.2 Scopi della sperimentazione:

2.2.1 Determinare il livello iniziale di contaminazione delle superfici di prova prima della loro irradiazione con le unità "Alfa-06" e "Alfa-09";

2.2.2 Determinare il livello residuo di contaminazione delle superfici di prova dopo la loro irradiazione con l'unità "Alfa-06" (campione n . 1) ;

2.2.3 Determinare il livello residuo di contaminazione delle superfici di prova dopo la loro irradiazione con l'unità "Alfa-09" (campione n . 2).

3 DISPOSIZIONI GENERALI

3.1 Le sperimentazioni sono state effettuate in conformità con i principali requisiti delle linee guida Sanitario-Epidemiologiche SP 1.3.311813 "Sicurezza del lavoro con i microrganismi di I - II gruppo di rischio" e la Direttiva R 3.5.1904- 04 "utilizzo della luce ultravioletta germicida per la disinfezione indoor dell'aria". "Sicurezza del lavoro con i microrganismi di I - II gruppo di rischio" e la Direttiva R 3.5.1904- 04 "utilizzo della luce ultravioletta germicida per la disinfezione indoor dell'aria".

3.2 Fattori e misure da considerare

3.2.1 Per la sperimentazione sono state utilizzate superfici in acciaio inossidabile (grado 12 X 18 H 10 T) .

Gli oggetti di sperimentazione sono stati collocati a 1 metro di altezza dal pavimento ed a 2 metri di distanza nel caso dell'unità "Alfa-06" , e 1,5 metri nel caso dell' "Alfa-09".

Le unità sono state sistemate in conformità con gli schemi forniti dalla casa produttrice.

3.3.2 La determinazione della concentrazione biologica del coronavirus (attività biologica , livello di contaminazione) è stata effettuata in fiale con monostrato (25 cm ² di superficie) di cellule Vero C1008 di un giorno coperte da agar col metodo della selezione negativa.

3.3.3 L'attività biologica è stata calcolata secondo la formula 1 :

$$A = \frac{a_{cp} \cdot b_n}{c} , \quad (1)$$

dove A è l'attività biologica , PFU · ml⁻¹;

a_{cp}- la media ponderata delle colonie negative per fiala calcolata secondo la formula 2, PFU ;

b_n- il rapporto di diluizione più alto ;

c - il volume inoculato , ml .

$$A_{cp} = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{b_n \left(\frac{1}{b_1} + \frac{1}{b_2} + \dots + \frac{1}{b_n} \right)}, \quad (2)$$

Dove: a₁ - a_n è la media della conta delle colonie negative per diluizione del materiale testato da 1 n ;

b₁ - b_n - il rapporto di diluizione del materiale testato.

3.3.4 I livelli di contaminazione iniziale e secondaria, corrispondentemente, sono stati calcolati seguendo la formula 3:

$$A_s = \frac{A \cdot V}{S}, \quad (3)$$

Dove: A_s è il livello di contaminazione , PFU · cm⁻²;

V – il volume del liquido utilizzato per la rimozione del materiale biologico campione dalla superficie , ml ;

S - l'area di contaminazione dell'oggetto della sperimentazione , cm².

3.3.5 L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata tramite il calcolo della deviazione standard dei risultati delle 5 sperimentazioni.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Dispositivi e attrezzature richiesti per la sperimentazione:

- unità "Alfa-06";
- unità "Alfa-09";
- Termostato MIR 254- PE , 240 L , prodotto da Panasonic ;
- sterilizzatore elettrico per strumenti medici, GOST 19596-89 E ;
- frigorifero " Samsung " , 2 scomparti, modello RL 44 ECPS ;
- termostato automatico " Binder " , controllo della temperatura tra 20 - 60 gradi , volume di 53 dm³, prodotto negli USA ;
- camera di biosicurezza di II classe , di tipo A 2 , BAVP -01 "Laminar-S" (220,150) " Lamsystems " , ZAO " Laminarnye sistemy " ;

- piastra elettrica , GOST 14919-83 E ;
- provette batteriologiche , GOST 23932-82 E ;
- tappi conici in gomma , GOST 7852-76 ;
- pipette per misurazione 1.0 , 5.0 , e 10 cm³ , precisione classe 2 , GOST 20.292-74 E ;
- recipienti di vetro, 100 e 250 cm³ , termicamente e chimicamente resistenti , GOST 25336-82;
- spatola di vetro , IPF "48 ICR" del Ministero della Difesa RF ;
- forbici oftalmiche appuntite, piegate, ITR 42-64-66;
- pinze mediche , GOST 21241-75;
- lampada da laboratorio ad alcol , GOST 25336-82 E ;
- treppiede da laboratorio, tipo SILB , TR 79 RF 265-72-5;
- siringa di gomma , TR 38.106-141-80;

Le attrezzature e dispositivi utilizzati per le misurazioni durante la sperimentazione sono metrologicamente controllati e accreditati secondo GOST PB 8,576-2000 e GOST B 008,002 - 2013.

4.2 I materiali utilizzati e i reagenti chimici necessari per la sperimentazione:

- coltura virale SARS - CoV -2 (isolato B) datato marzo 16 , 2020 con attività biologica $5,8 \cdot 10^6$ PFU · ml⁻¹;
- Vero 1008 colture cellulari ;
- bio agar (fabbricato da Difco);
- siero di vitello fetale (fabbricato da HyClone);
- antibiotici per colture cellulari (prodotti da HyClone);
- rosso neutro (rosso vitale per colture cellulari);
- soluzione di Hanks, di Earle, VKA , bicarbonato di sodio , soluzione di glutammato (prodotte secondo le direttive del IPF 48 ° ICR del Ministero della Difesa RF);
- soluzione salina come da PR -07-320-35, la prescrizione del l' IPF "48 ° ICR" del Ministero della Difesa RF ;
- alcool etilico, GOST 18300-72;
- acqua distillata , GOST 6709-72;
- matita di vetro , TR 46-22-904-78;
- lana di cotone medicata , GOST 5556-81;
- garza medica , TR 388-23-501-79;
- guanti chirurgici , GOST 3-88;
- perossido di idrogeno di grado tecnico A, TR 2123-002-25665344-2008.

4.3 Il personale che esegue i test con microrganismi dei gruppi a rischio I - II deve disporre di indumenti da lavoro e di dispositivi di protezione individuale e mezzi di igiene personale secondo le norme standard

4.4 I test sono stati eseguiti nella zona “ contagiosa ” in condizioni di massimo isolamento.

5 CONDIZIONI E PROCEDIMENTI DELLA SPERIMENTAZIONE

5.1 Le sperimentazioni sono state eseguite nell’area “ contagiosa ” del laboratorio con temperatura ambiente a (24 ± 1) gradi e (42 ± 3) % di umidità relativa.

La attività biologica iniziale della coltura virale SARS–CoV-2 (isolato B del marzo 16, 2020) è stato $5.8 \cdot 10^6$ PFU \cdot ml⁻¹.

5.2 Per i test sono state utilizzate placchette in acciaio inossidabile 5×5 cm contaminate dal coronavirus .

5.3 Le unità sono state posizionate come segue :

- “Alfa-06”: l' unità era situata lateralmente, a distanza di 2 metri dalle placchette in acciaio disposte verticalmente all’altezza di 1 metro. Sono state utilizzate in sequenza le modalità " Superficie / battericida " (di seguito "modalità n. 1 "), " Superficie / sporicida " (di seguito "modalità n. 2 ") e " Superficie / tuberculocida" (di seguito "modalità n. 3 ");

- “Alfa-09”: l' unità era situata lateralmente, a distanza di 1.5 metri dalle placchette in acciaio disposte verticalmente all’altezza di 1 metro. Sono state utilizzate in sequenza le modalità " Superficie / battericida " (di seguito "modalità n. 4 "), " Superficie / sporicida " (di seguito "modalità n. 2 ") e " Superficie / tuberculocida" (di seguito "modalità n. 5 ").

Per ciascuna unità, ciascuna modalità di trattamento è stata utilizzata in sequenza.

5.4 I test sono stati eseguiti secondo la procedura standard sviluppata dal IPF "48 °ICR" del Ministero della Difesa RF e secondo le linee guide R 4.2.2643-10.

5.5 Durante la prima fase dei test è stato preparato il monostrato di coltura cellulare Vero nelle fiale. Per questo dalle fiale con il monostrato di coltura cellulare selezionate per la sperimentazione, dopo la termostatazione, è stato versato il mezzo di crescita e sono state etichettate.

5.6 Sulle placchette in acciaio è stato applicato 0,1 ml di coltura del coronavirus con attività biologica di $1.0 \cdot 10^6$ PFU \cdot ml⁻¹. La quantità è stata distribuita uniformemente sulla superficie della placchetta con uno spatola di vetro .

5.7 Le placchette sono state divise in gruppi sperimentazione e controllo . Le placchette di controllo sono state usate per il controllo al momento dell'applicazione del coronavirus e durante la decontaminazione. A tale scopo sono state prese 5 placchette di prova .

5.8 Il campionamento dalle superfici di prova è stato effettuato con due tamponi di garza (inumidito e secco). Ciascun campione è stato agitato a mano per 3 minuti in 10 ml di liquido assorbitore.

5.9 Per determinare l'attività biologica del coronavirus, 0,5 ml del corrispondentemente diluito liquido di assorbitore sono stati aggiunti in ciascuna fiala con il monostrato. L'inoculato è stato uniformemente sparso sul monostrato con movimenti ondeggianti della fiala .

5.10 Le fiale sono state posizionate orizzontalmente con il monostrato di cellule infette rivolto verso il basso. Le fiale sono state incubate per 60 minuti nel termostato a $(37.0 \pm 0.5$ gradi).

5.11 Dopo l'incubazione, l'inoculato è stato rimosso con una pipetta e in ciascuna fiala sono stati aggiunti 10 ml di mezzo di copertuta in agar primario, portato alla temperatura di $(42.0 \pm 0.5$ gradi). Quindi le fiale sono state posizionate orizzontalmente con il monostrato di cellule infette rivolto verso il basso.

5.12 Dopo che il mezzo di copertuta in agar si è solidificato (10-15 min) , le fiale sono state girate con il monostrato verso l'alto e poste in termostato a $(37.0 \pm 0.5$ gradi) per 48 ore.

5.13 Dopo l' incubazione, 10 ml di mezzo di copertuta in agar secondario con rosso neutro è stato aggiunto nella fiala per la colorazione del monostrato. Dopo le fiale sono state incubate per altre 24 ore a $(37.0 \pm 0.5$ gradi). Poi sono stati effettuati i conteggi delle colonie negative.

5.14 I test sono stati eseguiti con i seguenti controlli :

- il controllo del l' iniziale attività biologica del coronavirus;
- controllo del liquido diluente (assorbitore);
- controllo delle colture cellulari Vero 1008.

6 RISULTATI DELLA SPERIMENTAZIONE

6.1 I risultati della individuazione dei livelli iniziali e residui di contaminazione da coronavirus delle superfici di prova così come la efficacia della loro disinfezione con l'unità "Alfa-06" con modalità N. 1-3 sono riportati nella tabella 1. Il tempo di esposizione è stato di 2,0 minuti per la modalità n.1; 3,0 minuti per la modalità n.2; e 6,5 minuti per la modalità n.3 .

Tabella 1 - Efficacia della disinfezione delle superfici di prova da parte dell'unità "Alfa-06", n = 5, $\bar{x} \pm \tilde{\sigma}$

Tipo di superficie e dimensioni della superficie di prova	Livello medio di contaminazione iniziale della superficie di prova nel momento t..., $n \cdot 10^3 \text{ PFU} \cdot \text{cm}^{-2}$		Livello di contaminazione residua nella modalità, $\text{PFU} \cdot \text{cm}^{-2}$					
			N. 1		N. 2		N. 3	
	0 min	6 . 5 min	Risultato singolo	media	Risultato singolo	media	Risultato singolo	media
Acciaio inossidabile 12X18H10T, 5×5cm	3 . 62 ± 0 . 28	2 . 95 ± 0 . 1 6	0 . 8 1 . 6 0 0 . 8 0 . 4	0 . 72 ± 0 . 60	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0

6.2 I risultati della individuazione dei livelli iniziali e residui di contaminazione da coronavirus delle superfici di prova così come la efficacia della loro disinfezione con l'unità "Alfa-09" con modalità n. 4-6 sono riportati nella Tabella 2 . Il tempo di esposizione è stato di 3 minuti e 39 secondi per la modalità n.4; 6 minuti e 45 secondi per la modalità n.5; e 14 minuti 03 secondi per la modalità n.6.

Tabella 2 - Efficacia della disinfezione delle superfici di prova da parte dell'unità "Alfa-09", n = 5 , $\bar{x} \pm \tilde{\sigma}$

Tipo di superficie e dimensioni della superficie di prova	Livello medio di contaminazione iniziale della superficie di prova nel momento t..., $n \cdot 10^3 \text{ PFU} \cdot \text{cm}^{-2}$		Livello di contaminazione residuo nella modalità $\text{PFU} \cdot \text{cm}^{-2}$					
			N. 4		N. 5		N. 6	
	0 min	14.0 min	Risultato singolo	media	Risultato singolo	media	Risultato singolo	media
Acciaio inossidabile 12 X 18 H 10 T , 5 × 5 cm	3.62 ± 0.28	2.63 ± 0.21	0 . 4 0 . 8 0 . 4 0 0 . 8	0 . 48 ± 0 . 44	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0

6. 3 I risultati riportati nella Tabella 1 mostrano che l'irradiazione generata dall'unità "Alfa-06" porta alla decontaminazione delle superfici metalliche contaminate dal coronavirus (3.62 ± 0.28) PFU ·cm².

L'efficacia della disinfezione raggiunge il 99.98 % nella modalità "Superficie / battericida"; e il 100 % (completa decontaminazione) per le modalità "Superficie/sporicida" e "Superficie/ tuberculocida".

6.3 I risultati riportati nella tabella 2 mostrano che l'irradiazione generata dall'unità "Alfa-09" porta alla decontaminazione delle superfici metalliche contaminate dal coronavirus (3.62 ± 0.28) PFU ·cm².

A ciò , l'efficacia della disinfezione raggiunge 99.99% nella modalità "Superficie / battericida"; e il 100 % (completa decontaminazione) per le modalità " Superficie/sporicida " e " Superficie/ tuberculocida".

7 CONCLUSIONE

7.1 L'unità "Alfa06" assicura la disinfezione delle superfici di metallo contaminate dal SARS-CoV-2 coronavirus col 99,98 % di efficacia quando utilizza la modalità "Superficie/sporicida " e col 100 % di efficacia quando si utilizzano le modalità " Superficie/sporicida " e " Superficie/ tuberculocida".

7.2 L'unità "Alfa09 " assicura la disinfezione delle superfici di metallo contaminate dal SARS-CoV-2 coronavirus col 99,9 9 % di efficacia quando utilizza la modalità "Superficie/sporicida " e col 100 % di efficacia quando si utilizzano le modalità " Superficie/sporicida " e " Superficie/ tuberculocida".

7. 3 I risultati ottenuti consentono di consigliare l'uso delle unità "Alfa-06" e "Alfa-09" per la disinfezione delle superfici come parte della risposta epidemiologica per combattere la diffusione della infezione da coronavirus.

Capo dell'unità di ricerca 10

tenente colonnello

Senior research scientist, unità di ricerca 10

Senior research scientist, unità di ricerca 10

Senior research scientist, unità di ricerca 1

Research scientist, unità di ricerca 1

Research scientist, unità di ricerca 10

Research scientist, unità di ricerca 10

Research scientist, unità di ricerca 10

Junior research scientist, unità di ricerca 10

A . Zverev

D . Masyakin

N . Chepurenkov

Io . Shatokhina

N . Boyarskaya

V . Bykov

Io . Andro Shchuk

E . Kovalchuk

V . Trufanova