

## **REPORT EFFICACIA VIRUCIDA**

Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida nei confronti del virus *SARS-CoV-2*

**PRODOTTO:**

**JONIX CUBE**  
**un dispositivo di purificazione dell'aria**

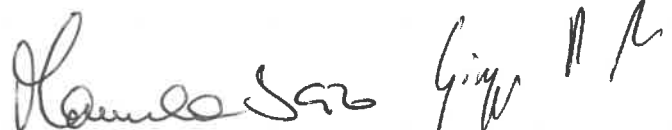
### **COMMITTENTE**

**Jonix S.r.l.**. Indirizzo: Viale Spagna, 31/33 - 35020 Tribano (PD)  
P.Iva e C.F. 04754080283

### **RESPONSABILE SCIENTIFICO:**

Prof. Andrea Crisanti

**Collaboratori:** dott.ssa Claudia Del Vecchio, dott.ssa Manuela Sciro, dott. Di Pietra Giuseppe



Data Report: 22/09/2020

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. SCOPO.....  | 3  |
| 2. TERMINI E DEFINIZIONI.....                              | 3  |
| 3. INTRODUZIONE.....                                       | 3  |
| 4. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE.....                     | 4  |
| 5. CONDIZIONI SPERIMENTALI .....                           | 4  |
| 6. MATERIALI E REAGENTI .....                              | 4  |
| 7. APPARECCHIATURE .....                                   | 5  |
| 8. PROVE PRELIMINARI.....                                  | 6  |
| 9. VERIFICA INATTIVAZIONE – PROVA CON FORMALDEIDE .....    | 7  |
| 10. VERIFICA DELL’ATTIVITA’ VIRUCIDA DEI DISPOSITIVI ..... | 8  |
| 11. CALCOLO DELL’ESPRESSIONE DEI RISULTATI.....            | 8  |
| 12. EFFICACIA VIRUCIDA .....                               | 9  |
| 13. RISULTATI ED ATTIVITA’ VIRUCIDA .....                  | 9  |
| 15. CONCLUSIONE .....                                      | 9  |
| 16. RIFERIMENTI .....                                      | 10 |

## 1. SCOPO

Il seguente report ha la finalità di definire in modo chiaro e dettagliato le modalità di esecuzione e i risultati dello studio svolto per la verifica dell'attività virucida su superfici di strumentazione che utilizza la tecnologia del plasma freddo (Non Thermal Plasma) emettendo specie ossidanti.

## 2. TERMINI E DEFINIZIONI

**Attività virucida o antivirale:** capacità di un prodotto di produrre una riduzione del numero di particelle virali infettanti tramite procedure sperimentali che comprendono precise e definite condizioni di prova.

**Unità Formanti Placche (PFU):** numero di particelle virali infettanti per mL.

**ID<sub>50</sub>:** dose infettante il 50% di sospensione virale o della diluizione della sospensione virale che induce nelle colture cellulare il 50% di effetto citotossico virale (CPE).

**Effetto citotossico virale (CPE):** alterazione morfologica delle cellule e/o la loro distruzione conseguente alla moltiplicazione del virus.

**Inattivazione dei virus:** riduzione dell'infettività di un virus nei confronti del prodotto in esame.

## 3. INTRODUZIONE

Al fine di garantire la massima precisione e accuratezza il test è stato eseguito in conformità alla norma EN 14476:2019 "Disinfettanti chimici e antisettici- prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica- Metodo di prova e requisiti (Fase2/Stadio1)" e alla norma EN 17272:2020 "Disinfettati chimici e antisettici: metodi di disinfezione dell'aria indoor attraverso processi automatizzati – Determinazione delle attività battericida, micobattericida, sporicida, fungicida, lievicida , virucida e fagocita" (limitatamente all'utilizzo dei supporti metallici descritti).

L'attività virucida è stata testata impiegando il ceppo di SARS-CoV-2. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in Laboratorio di Biosicurezza livello 3 (BSL3).

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

#### **4. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE**

**Prodotto:** Dispositivo Non thermal Plasma Jonix Cube (di seguito denominata Jonix Cube)

**Descrizione del prodotto:** Jonix CUBE è un dispositivo di purificazione dell'aria; di design che sfrutta una tecnologia avanzata chiamata a plasma freddo per eliminare batteri, muffe, virus, inquinanti e odori

**Condizioni di stoccaggio:** temperatura ambiente

**Istruzioni strumentazione:** vedasi allegato

#### **5. CONDIZIONI SPERIMENTALI**

**Temperatura test:** è stato eseguito a  $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tempo di contatto:** 30'-60'-120'-240'

**Periodo di Analisi:** data inizio del test: 01-08-2020 ÷ Data fine test 01-09-2020

#### **6. MATERIALI E REAGENTI**

**Microrganismi di prova:**

*SARS-CoV 2*

**Linea cellulare:**

VERO E 6 (ATCC CCL-81)\*

\*ATCC (American Type Culture Collections)

***Sospensione stock virale***

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

Ogni sospensione virale è stata preparata e amplificata su larga scala in colture cellulari in monostrato. Dopo l'infezione e la moltiplicazione del virus, i detriti cellulari sono stati allontanati mediante doppia centrifugazione a bassa velocità (2500 rpm per 10 min), ed il surnatante, contenente il virus, è prelevato per determinare il titolo virale. È stato suddiviso in aliquote a titolo noto di 2 ml di volume in eppendorf e conservato alla temperatura di - 80°C in congelatore.

### **Colture cellulari**

Cellule VERO E6, cellule di origine epiteliale, provenienti da rene di scimmia (linea continua).

### **Supporti (carriers)**

Sono stati impiegati dischi di acciaio INOX AISI 316 da 35 mm di diametro, preventivamente sterilizzati in autoclave.

### **MEZZI DI COLTURA E REAGENTI**

I reagenti devono essere puri per analisi e/o adatti per applicazioni microbiologiche.

#### **Terreno di coltura delle colture cellulari**

Ogni linea cellulare è mantenuta in un termostato a 37°C con il 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionate con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) e 1% (p/v) di penicillina - streptomina (pen- strep).

#### **Phosphate Buffered Saline (PBS)**

Soluzione contenente: 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 2,89 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O, 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml di H<sub>2</sub>O distillata.

## **7. APPARECCHIATURE**

- Microscopio invertito per l'osservazione delle colture cellulari
- Cronometro
- Agitatore Vortex

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

- Centrifuga
- Incubatore a CO<sub>2</sub> (5% v/v) in grado di mantenere la temperatura a 37°C ± 1°C.
- Cappa a flusso laminare verticale “BioHazard” classe II
- Congelatori

## 8. PROVE PRELIMINARI

### PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE VIRALE - TITOLO VIRALE

0,2 ml di sospensione virale (soluzione madre) + 1,8 ml di DMEM serum-free sono stati miscelati e preparate diluizioni seriali da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-9</sup> (diluizioni 1:10).

250 µl di ogni diluizione è stato trasferito in piastre a 24 pozzetti contenenti il monostrato cellulare a confluenza (>90%) dopo aspirazione del terreno di coltura. Ogni diluizione della sospensione virale è stata piastrata in sestuplo. Sono stati lasciati senza inoculo 12 pozzetti, (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (tempo di adsorbimento virale), l'inoculo è stato rimosso, effettuato un lavaggio con PBS e aggiunti 500 µl di DMEM addizionati di 2% (v/v) FBS e 0,75% (v/v) di carbossimetilcellulosa.

#### Condizioni di incubazione in termostato

Le infezioni sono state poste in incubatore con il 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> a 37°C ± 1°C e osservate al microscopio invertito per rilevare la formazione di placche di lisi, causate dall'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. Sono state contate al microscopio invertito le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile dopo la fissazione con formaldeide e colorazione con una soluzione di cristalvioletto.

I risultati di CPE (prova quantitativa) di ogni diluizione sono espressi con la percentuale di risultati positivi compresa tra 100% e 0% e registrate come "0" per nessuna CPE e da "1" (25% CPE) a "4" (100% CPE) a seconda del grado di danno cellulare.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo Spaerman – Karber (valutazione ID<sub>50</sub>).

## 9. VERIFICA INATTIVAZIONE – PROVA CON FORMALDEIDE

2 mL di sospensione virale sono stati miscelati con 8 mL di PBS e 10 mL di soluzione di formaldeide al 1,4 % (p/v) per controllare la validità del sistema. Immediatamente dopo un contatto di 30 min. e 60 minuti, 0,2 mL di questa soluzione sono stati miscelati a 1,8 mL di DMEM + 2% FBS in ghiaccio. Sono state eseguite le diluizioni seriali da  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  (diluizioni 1:10) con PBS + 2% FBS. Per ogni diluizione sono stati distribuiti 250  $\mu$ l in 6 pozzetti della micropiastra da 24 pozzetti e poste incubatore a 37°C per 1 ora. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (tempo di adsorbimento virale), l'inoculo è stato rimosso, effettuato un lavaggio con PBS e aggiunti 500  $\mu$ l di DMEM addizionati di 2% (v/v) FBS e 0,75% (v/v) di carbossimetilcellulosa

La coltura cellulare è stata posta in incubatore al 5%(v/v) di CO<sub>2</sub> a 37°C  $\pm$  1°C, e osservate al microscopio invertito per la rilevazione dell'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. Sono state contate le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile dopo la fissazione e la colorazione con la soluzione di cristalvioletto - metanolo. I risultati di CPE (prova quantitativa) di ogni diluizione sono espressi con la percentuale di risultati positivi compresa tra 100% e 0% e registrate come "0" per nessuna CPE e da "1" (25% CPE) a "4" (100% CPE) a seconda del grado di danno cellulare.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo Spaerman – Karber (valutazione ID<sub>50</sub>).

### Citotossicità della soluzione test della formaldeide

1 ml di formaldeide 1,4% (p/v) è stato aggiunto a 1 ml di PBS. Da questa diluizione sono state preparate le diluizioni seriali da  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  (diluizioni 1:10) prelevando 0.2 ml della miscela ottenuta + 1.8 ml DMEM serum-free.

0.1 ml di ogni diluizione è stata piastrata in sestuplo nelle colture cellulari in monostrato a confluenza (>90%). A 6 pozzetti non è stata aggiunto la miscela (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora a 37°C  $\pm$  1°C sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di DMEM + 10% FBS e la coltura cellulare è stata posta in incubatore a 37°C  $\pm$  1°C, 5% di CO<sub>2</sub> ed osservata al microscopio invertito costantemente per i successivi 9 giorni per la rilevazione dell'effetto citopatico (CPE), causato dall'azione citotossica della soluzione di formaldeide.

## 10. VERIFICA DELL'ATTIVITÀ VIRUCIDA DEI DISPOSITIVI

Il test virucida è stato eseguito a 20°C.

50 µl di sospensione virale sono stati inoculati su ogni carrier e lasciati asciugare sotto cappa a flusso laminare. I dischi così inoculati sono stati impiegati per la verifica dell'attività virucida esponendoli all'azione della strumentazione Jonix Cube, oppure lasciati all'interno di capsule petri usandoli come dischi di controllo. I dischi trattati sono stati collocati all'interno di un apposito box contenente il dispositivo Jonix ed esposti alla sua azione per un tempo pari a 30'-60'-120'-240'. Successivamente, i dischetti (trattati e di controllo) sono stati eluiti con 1 ml di terreno di coltura e preparate diluizioni seriali da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-9</sup> (diluizioni 1:10). 250 µl di ogni diluizione è stato trasferito in piastre a 24 pozzetti contenenti il monostrato cellulare a confluenza (>90%) dopo aspirazione del terreno di coltura. Ogni diluizione della sospensione virale è stata piastrata in sestuplo. Sono stati lasciati senza inoculo 12 pozzetti (controllo della linea cellulare). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (tempo di adsorbimento virale), l'inoculo è stato rimosso, effettuato un lavaggio con PBS e aggiunti 500 µl di DMEM addizionati di 2% (v/v) FBS e 0,75% (v/v) di carbossimetilcellulosa.

## 11. CALCOLO DELL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI

**Determinazione del titolo di infettività (ID<sub>50</sub>).**

L'attività infettante è stata determinata con il metodo Spearman - Kärber, che utilizza la seguente formula per il calcolo del valore ID<sub>50</sub>:

$$-\text{Log}_{10} \text{ID}_{50} = - (x_0) - \{ [ R/100 ] - 0,5 \} \times \log_{10} \text{fattore di diluizione}$$

Dove:

$x_0$  = log<sub>10</sub> della diluizione più bassa con il 100% di reazione positiva

(CPE) R = sommatoria (%) delle colture positive



Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

Il test dell'attività virucida è valido quando nelle prove preliminari si verifica tale condizione: la sospensione test virale deve presentare una concentrazione virale per determinare la riduzione di almeno 4 lg del titolo virale iniziale:  $ID_{50} = 10^7 / \text{mL}$ .

## 12. EFFICACIA VIRUCIDA

Il prodotto in esame è considerato **VIRUCIDA** quando a 20°C, dopo il tempo di contatto preso in esame, dimostra una **riduzione della vitalità di almeno  $10^4$** , corrispondenti a una riduzione pari 4 logaritmi (99,99%) nei confronti del ceppo virale test (EN 14476:2019 e EN 17272:2020).

## 13. RISULTATI ED ATTIVITA' VIRUCIDA

I risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella

*Tabella 1 – Effetti del trattamento con Jonix CUBE. I valori di riduzione della carica virale sono espressi sia in termine di unità logaritmiche che in termini percentuali.*

| Tempo di esposizione<br>(minuti) | Controlli  |             | Trattati   |             | Riduzione                 |          |
|----------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|---------------------------|----------|
|                                  | PFU/ml     | log(PFU/ml) | PFU/ml     | log(PFU/ml) | U <sub>logaritmiche</sub> | %        |
| 0                                | 10.000.000 | 7           | 10.000.000 | 7           | 0                         | 0        |
| 30                               | 10.000.000 | 7           | 1,07       | 0,03        | 6,97                      | 99,99999 |
| 60                               | 10.000.000 | 7           | 1,02       | 0,01        | 6,99                      | 99,99999 |
| 120                              | 10.000.000 | 7           | 1,02       | 0,01        | 6,99                      | 99,99999 |
| 240                              | 10.000.000 | 7           | 1,02       | 0,01        | 6,99                      | 99,99999 |

## 15. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti dimostrano che il dispositivo Jonix Cube (tecnologia Non Thermal Plasma (NTP)) presenta una **efficace attività antivirale nei confronti di SARS-CoV-2 con un abbattimento della carica virale pari al 99,99999% (circa 7 unità logaritmiche) dopo soli 30 minuti di esposizione;** ciò lascia supporre che il raggiungimento del livello di abbattimento richiesto dalle norme tecniche (4 unità logaritmiche) possa occorrere anche per tempi considerevolmente minori.

## 16. RIFERIMENTI

- NORMA EUROPEA EN 17272:2020 Disinfettanti chimici e antisettici –Metodo per la disinfezione ambientale mediante processi automatici
- NORMA EUROPEA EN 14476:2019 Disinfettanti chimici e antisettici -Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica
- ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- ISO 15189:2012 Medical laboratories— Requirements for quality and competence

---

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

## **VIRUCIDAL EFFECTIVENESS REPORT**

Quantitative test in suspension for the evaluation of virucidal activity  
against the *SARS-CoV-2* virus

PRODUCT:

**JONIX CUBE**  
**air purification device**

### **CLIENT**

**Jonix S.r.l.**. Address: Viale Spagna, 31/33 - 35020 Tribano (PD)  
VAT and Tax Code 04754080283

### **SCIENTIFIC RESPONSIBLE:**

Prof. Andrea Crisanti

**Research assistants:** Dott.ssa Claudia Del Vecchio, Dott.ssa Manuela Sciro, Dott. Di Pietra  
Giuseppe

Report Date: 22/09/2020

## INDEX

|   |    |
|---|----|
| 1. PURPOSE .....  | 3  |
| 2. TERMS AND DEFINITIONS .....                                  | 3  |
| 3. INTRODUCTION .....   | 3  |
| 4. CHARACTERIZATION OF THE SAMPLE .....                         | 4  |
| 5. EXPERIMENTAL CONDITIONS .....                                | 4  |
| 6. MATERIALS AND REAGENTS.....                                  | 4  |
| 7. EQUIPMENT.....   | 5  |
| 8. PRELIMINARY TESTS .....                                      | 6  |
| 9. INACTIVATION VERIFICATION – TEST WITH FORMALDEHYDE .....     | 7  |
| 10. VERIFICATION OF THE VIRUCIDAL ACTIVITY OF THE DEVICES ..... | 8  |
| 11. CALCULATION OF THE EXPRESSION OF THE RISULTS .....          | 8  |
| 12. VIRUCIDAL EFFECTIVENESS .....                               | 9  |
| 13. RESULTS AND VIRUCIDAL ACTIVITIES.....                       | 9  |
| 15. CONCLUSIONS .....   | 9  |
| 16. REFERENCES .....  | 10 |

## 1. PURPOSE

The purpose of the following report is the clearly and in detail definition of the performing methods and of the results of a research evaluating the virucidal activity on surfaces of a device using Cold Plasma (Non-Thermal Plasma) technology by emitting oxidizing species.

## 2. TERMS AND DEFINITIONS

**Virucidal or antiviral activity:** the ability of a product to produce a reduction in the number of infecting viral particles through testing procedures that require precise and defined test conditions.

**Plate Forming Units (PFUs):** number of infecting viral particles per mL.

**ID<sub>50</sub>:** dose infecting 50% of the viral suspension or of the dilution of the viral suspension which induces 50% viral cytotoxic effect (CPE) in cell cultures.

**Viral cytotoxic effect (CPE – cytopathologic effect):** morphological alteration and/or destruction of cells following the multiplication of the virus.

**Inactivation of viruses:** reduction of the infectivity of a virus towards the product concerned.

## 3. INTRODUCTION

In order to guarantee maximum precision and accuracy, the test was performed in compliance with the EN 14476:2019 standard "Chemical disinfectants and antiseptics - quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Stage 1)" and to the EN 17272:2020 standard "Chemical and antiseptic disinfectants: methods of indoor air disinfection through automated processes - Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and phagocytic activities" (limited to the use of the described metal supports).

The virucidal activity was tested using the SARS-CoV-2 strain. All experiments were conducted in the Biosafety Level 3 Laboratory (BSL3)

## 4. CHARACTERIZATION OF THE SAMPLE

Product: Jonix Cube Non-Thermal Plasma Device (hereinafter referred to as Jonix Cube)

Product description: Jonix CUBE is an air purification device; a design piece that uses an advanced technology called cold plasma to eliminate bacteria, molds, viruses, pollutants and odors

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

Storage conditions: room temperature

Device instructions: see attachment

## 5. TEST CONDITIONS

**Test temperature**: it was performed at + 20 ° C ± 1 ° C.

**Contact time**: 30'-60'-120'-240'

**Analysis period**: test start date: 01-08-2020 ÷ Test end date 01-09-2020

## 6. MATERIALS AND REAGENTS

**Test microorganisms:**

SARS-CoV-2

**Cell line:**

VERO E 6 (ATCC CCL-81) \*

\* ATCC (American Type Culture Collections)

**Viral stock suspension**

Each viral suspension was prepared and amplified on a large scale in monolayer cell cultures. After the infection and multiplication of the virus, the cellular debris was removed by double centrifugation at low speed (2500 rpm for 10 min), and the supernatant, containing the virus, is taken to determine the viral titer. It was divided into aliquots with known titer of 2 ml volume in Eppendorf and stored at -80 ° C in the freezer.

**Cell cultures**

VERO E6 cells, cells of epithelial origin taken from monkey kidney (solid line).

**Supports (carriers)**

35 mm diameter AISI 316 stainless steel discs were used, previously sterilized in an autoclave.

**MEDIUMS OF CULTURE AND REAGENTS**

Reagents must be pure for analysis and/or suitable for microbiological applications.

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

### Cell culture medium

Each cell line is kept in a thermostat at 37°C with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS) and 1% (w/v) of penicillin - streptomycin (pen-strep).

### Phosphate Buffered Saline (PBS)

Solution containing: 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 2.89 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O, 0.20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml of distilled H<sub>2</sub>O.

## 7. EQUIPMENT

- Inverted microscope for the observation of cell cultures
- Stopwatch
- Vortex stirrer
- Centrifuge
- CO<sub>2</sub> incubator (5% v/v) capable of maintaining the temperature at 37 ° C ± 1 ° C.
- "BioHazard" class II vertical laminar flow hood
- Freezers

## 8. PRELIMINARY TESTS

### PREPARATION OF VIRAL SUSPENSION - VIRAL TITER

0.2 ml of viral suspension (stock solution) + 1.8 ml of serum-free DMEM were mixed and serial dilutions from 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-9</sup> (dilutions 1:10) were prepared.

250 µl of each dilution was transferred to 24 well plates containing the cell monolayer at confluence (> 90%) after aspiration of the growth medium. Each dilution of the viral suspension was plated in sextuple. 12 wells were left uninoculated, (cell line control). After 1 hour of incubation at 37 ° C (viral adsorption time), the inoculum was removed, washed with PBS and added 500 µl of DMEM with 2% (v/v) FBS and 0.75% (v/v) of carboxymethylcellulose.

### Thermostat incubation conditions

Infections were incubated with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> at 37 ° C ± 1 ° C and observed under an inverted microscope to detect lysis plaque formation caused by the cytopathic effect (CPE) of the viral suspension.

The plaques present in the wells at counted dilution after fixation with formaldehyde and staining with a crystal violet solution were counted under an inverted microscope.

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

The CPE (quantitative test) results of each dilution are expressed with the percentage of positive results ranging from 100% to 0% and recorded as "0" for no CPE and "1" (25% CPE) to "4" (100% CPE) depending on the degree of cell damage.

Viral titer was calculated using the Spaerman-Karber method (ID<sub>50</sub> assessment).

## **9. INACTIVATION CHECK – TEST WITH FORMALDEHYDE**

2 mL of viral suspension was mixed with 8 mL of PBS and 10 mL of 1.4% (w/v) formaldehyde solution to check the validity of the system. Immediately after a contact of 30 minutes and 60 minutes, 0.2 mL of this solution was mixed with 1.8 mL of DMEM + 2% FBS in ice. Serial dilutions from 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-6</sup> (1:10 dilutions) with PBS + 2% FBS were performed. For each dilution 250 µl were distributed in 6 wells of the 24-well microplate and placed in the incubator at 37 ° C for 1 hour. After 1 hour in the incubator at 37 ° C (viral adsorption time), the inoculum was removed, washed with PBS and added 500 µl of DMEM with 2% (v/v) FBS and 0.75% (v/v) of carboxymethylcellulose were added.

The cell culture was placed in the incubator at 5% (v/v) of CO<sub>2</sub> at 37 ° C ± 1 ° C and observed under an inverted microscope for the detection of the cytopathic effect (CPE) of the viral suspension.

Plaques in the wells at counting dilution after fixation and staining with crystal violet-methanol solution were counted. The CPE (quantitative test) results of each dilution are expressed with the percentage of positive results ranging from 100% to 0% and recorded as "0" for no CPE and "1" (25% CPE) to "4" (100% CPE) depending on the degree of cell damage.

Viral titer was calculated using the Spaerman-Karber method (ID<sub>50</sub> assessment).

### **Cytotoxicity of the formaldehyde test solution**

1 ml of 1.4% (w/v) formaldehyde was added to 1 ml of PBS. From this dilution the serial dilutions from 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-4</sup> (dilutions 1:10) were prepared by taking 0.2 ml of the obtained mixture + 1.8 ml DMEM serum-free.

0.1 ml of each dilution was plated in sextuple into monolayer cell cultures at confluence (>90%). The mixture was not added to 6 wells (cell line control). After 1 hour at 37 ° C ± 1 ° C, 100 µl of DMEM + 10% FBS were added and the cell culture was placed in an incubator at 37 ° C ± 1 ° C, at 5% of CO<sub>2</sub> and constantly observed under an inverted microscope for the next 9 days for the detection of the cytopathic effect (CPE), caused by the cytotoxic action of the formaldehyde solution.



## 10. VERIFICATION OF THE VIRUCIDAL ACTIVITY OF THE DEVICES

The virucidal test was performed at 20°C.

50 µl of viral suspension was inoculated on each carrier and left to dry under a laminar flow hood. The discs inoculated were used to verify virucidal activity by exposing them to the action of the Jonix Cube device or left inside petri dishes using them as control discs. The treated discs were placed inside a special box containing the Jonix device and exposed to its action for a time equal to 30'-60'-120'-240'. Subsequently, the discs (both treated and control ones) were eluted with 1 ml of culture medium and serial dilutions of 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-9</sup> (dilutions 1:10) were prepared. 250 µl of each dilution was transferred to 24-well plates containing the cell monolayer at confluence (>90%) after aspiration of the culture medium. Each dilution of the viral suspension was plated in sextuple. 12 wells were left uninoculated (cell line control). After 1 hour of incubation at 37 ° C (viral adsorption time), the inoculum was removed, washed with PBS and 500 µl of DMEM with 2% (v/v) FBS and 0.75% (v/v) of carboxymethylcellulose were added.

## 11. CALCULATION OF THE EXPRESSION OF THE RESULTS

### Determination of the infectivity titer (ID<sub>50</sub>).

The infecting activity was determined with the Spaerman-Kärber method, which uses the following formula to calculate the ID<sub>50</sub> value:

$$-\text{Log}_{10} \text{ID}_{50} = - (x_0) - \{ [ R/100 ] - 0,5 \} \times \log_{10} \text{dilution factor}$$

Where:

$x_0$  = log<sub>10</sub> of the lowest dilution with 100% positive reaction

(CPE) R = summation (%) of the positive cultures

The virucidal activity test is valid when this condition occurs in the preliminary tests: the viral test suspension must have a viral concentration to determine the reduction of at least 4 lg of the initial viral titer: **ID<sub>50</sub> = 10<sup>7</sup>/mL.**

## 12. VIRUCIDAL EFFECTIVENESS

The product under examination is considered **VIRUCID** when at 20 ° C, after the contact time under consideration, it demonstrates **a reduction in vitality of at least 10<sup>4</sup>**, corresponding to a reduction of 4 logarithms (99.99%) compared to the test viral strain (EN 14476: 2019 and EN 17272: 2020).

Via A. Gabelli 63 - 35121 Padova  
C.F. 80006480281 - P.IVA 00742430283

### 13. RESULTS AND VIRUCIDAL ACTIVITIES

The results obtained are shown in the following table

*Table 1 - Effects of treatment with Jonix CUBE. The viral load reduction values are expressed both in terms of logarithmic units and in percentage.*

| Exposition time<br>(minutes) | Control    |             | Treated    |             | Reduction     |          |
|------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|---------------|----------|
|                              | PFU/ml     | log(PFU/ml) | PFU/ml     | log(PFU/ml) | Ulogaritmiche | %        |
| 0                            | 10.000.000 | 7           | 10.000.000 | 7           | 0             | 0        |
| 30                           | 10.000.000 | 7           | 1,07       | 0,03        | 6,97          | 99,99999 |
| 60                           | 10.000.000 | 7           | 1,02       | 0,01        | 6,99          | 99,99999 |
| 120                          | 10.000.000 | 7           | 1,02       | 0,01        | 6,99          | 99,99999 |
| 240                          | 10.000.000 | 7           | 1,02       | 0,01        | 6,99          | 99,99999 |

### 14. CONCLUSION

The results obtained show that the Jonix Cube device (Non-Thermal Plasma Technology (NTP)) has an **effective antiviral activity against SARS-CoV-2 with a reduction of the viral load equal to 99.99999% (about 7 logarithmic units) after only 30 minutes of exposure; this suggests that the achievement of the reduction level required by the technical standards (4 logarithmic units) may also occur for considerably shorter times.**

### 15. REFERENCES

- EUROPEAN STANDARD EN 17272: 2020 Chemical disinfectants and antiseptics - Method for environmental disinfection using automatic processes
- EUROPEAN STANDARD EN 14476: 2019 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area
- ISO / IEC 17025: 2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- ISO 15189: 2012 Medical laboratories - Requirements for quality and competence