UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
E CLINICHE "LUIGI SACCO"

PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' VIRUCIDA DEL DISPOSITIVO NEVOLA SU SARS-CoV-2

	NOME	FUNZIONE	FIRMA	DATA
Redatto da	Davide Mileto	Principal Investigator		09/11/2020
Revisionato da	Luca Gatti	Committente (Air-Control Srl)		09/11/2020
	Luca Tabanelli	Produttore Nevola (Kemin Textile Srl)		09/11/2020
Approvato da	Maria Rita Gismondo	Supervisore		9/11/2020

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

Sommario

1 INTRODUZIONE 2
2 MATERIALI E METODI 2
2.1 Materiali 2
2.2 Condizioni prescelte di test in sospensione 3
2.3 Definizione della sospensione virale da saggiare 4
2.4 Titolazione virale: Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50) 4
2.5 Test di valutazione dell'attività virucida del dispositivo NEVOLA: fasi sperimentali 5
3 CRITERI DI ACCETTAZIONE 6
4 SEZIONE SPERIMENTALE 6
5 ESITO SPERIMENTAZIONE 6
6 CONCLUSIONI 7
7 BIBLIOGRAFIA 7

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

1.INTRODUZIONE

La cabina NEVOLA (denominazione del prototipo) è un apparecchio progettato per la sanificazione di capi di abbigliamento; si compone di tre moduli ed ha una volumetria interna totale di 2,13 m^3.
La cabina si avvale di due distinte tecnologia per il trattamento dei materiali posti al suo interno: tecnologia Dust-Free (FC UNIT 3") e nebulizzazione.

- La tecnologia Dust Free sfrutta il dispositivo FC Unit 3", basato sul principio della fotocatalisi: l'emissione di raggi UV provoca la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che hanno un'azione ossidante sui microrganismi presenti nell'aria esposta al trattamento. La tecnologia PCO™ dei moduli FC UNIT sfrutta l'azione combinata dei raggi di una speciale lampada UV con una struttura catalizzatrice costituita da una lega metallica con matrice a nido d'ape, composta principalmente da TiO2 (biossido di titanio) e altri 3 metalli nobili in misura inferiore. I moduli FC UNIT, investiti dal flusso d'aria, danno origine ad una reazione fotocatalitica in grado di produrre radicali ossidrili (•OH) e perossido di idrogeno (H2O2) in quantità minime. Acqua ossigenata e radicali ossidrilici permettono di sanificare sia il flusso d'aria che le superfici che hanno azione abbattente sui microrganismi esposti al trattamento.
- La sanificazione tramite nebulizzazione viene invece realizzata attraverso l'ausilio di un generatore di nebbia secca in grado di vaporizzare 0.4 mL/sec di una soluzione al 4% di benzalconio cloruro posta al suo interno.

Finalità dello studio è la valutazione dell'efficacia di trattamento di SARS-CoV-2 da parte del dispositivo NEVOLA. A tale scopo, le due tecnologie di sanificazione, Dust Free e Nebulizzazione, poste all'interno della cabina verranno valutate distintamente.

2.MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

- Dispositivo NEVOLA:
  - Tecnologia Dust Free n°2 dispositivi FC Unit 3": ciascuno composto da un catalizzatore penta-metallico a base di biossido di titanio, da una lampada UVC e ad un ventilatore con portata d'aria utile di 35 m3/h a ricircolo interno.
  - Tecnologia Nebulizzazione: caldaia con una potenza di 900W e una temperatura di esercizio pari a 180 °C (su ugello) abbinato ad una pompa di 18 W a nebbia secca con portata di erogazione pari a 0,4 mL/sec.
- SARS-CoV-2 in sospensione a titolo maggiore o uguale di TCID50 10^7/mL
- Cellule VERO C1008 (ATCC®CRL-1586™)
- Terreno di coltura cellulare: Dulbecco's Modified Eagle Medium with L-glutamine (DMEM, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Siero Fetale Bovino (FBS, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Penicillin-Streptomycin [5,000 U/mL] (Pen-Strep, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Bagno termostatico a 37°C ± 1°C
- Incubatore a CO_2
- Piastre per colture cellulari da t25 cm^2
- Piastre per colture cellulari da t75 cm^2
- Piastre per colture cellulari a 96 pozzetti

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

- Cristalvioletto
- Acetone 99%
- Metanolo 99%
- Tampone Fosfato Salino (PBS)
- Micropipette: 10 µL; 200 µL; 1000 µL
- Puntali sterili con filtro
- Pipettatore automatico
- Pipette sierologiche
- Texwipe™ Panni asciutti non tessuti TechniCloth™ (45% PE / 55% cellulosa)
- Piastre petri
- Vortex
- Falcon 50 mL
- Sarsted 2 mL
- Cappa di Sicurezza Biologica di Livello II (BSCII)
- Dispositivi di Protezione Individuale dedicati

2.2 Condizioni prescelte per il test

Temperatura: 25 °C ± 1 °C

Materiali trattati:

- sospensione virale rilasciata su piastra petri
- panni Texwipe imbevuti con sospensione virale

Volume di sospensione virale utilizzato per ciascun materiale trattato: 400µL

Tecnologia Dust Free

- pretrattamento di 30 minuti del dispositivo NEVOLA con tecnologia Dust Free prima di ciascun trattamento
- trattamento 1: 20 minuti di esposizione
- trattamento 2: 30 minuti di esposizione

Nebulizzazione

- trattamento 1: 45 secondi di nebulizzazione e 20 minuti di esposizione
- trattamento 2: 90 secondi di nebulizzazione e 20 minuti di esposizione

Posizionamento dei materiali da trattare

- Posizione 1 (Texwipe) : 86 cm dal tetto e 30 cm da porta anteriore
- Posizione 2 (Texwipe) : 73 cm dal tetto e 34 cm da porta anteriore
- Posizione 3 (Petri) : 28 cm dal fondo e 90 cm da porta anteriore

I controlli di tipo Texwipe e Petri, inoculati con le medesime concentrazioni di SarsCov-2, sono posti all'interno della cappa di sicurezza biologica di livello II (BSC II) del laboratorio BSL4.

Tutte le operazioni sono da eseguire in un laboratorio con livello di sicurezza biologica minimo 3 (BSL-3 o BSL-4)

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

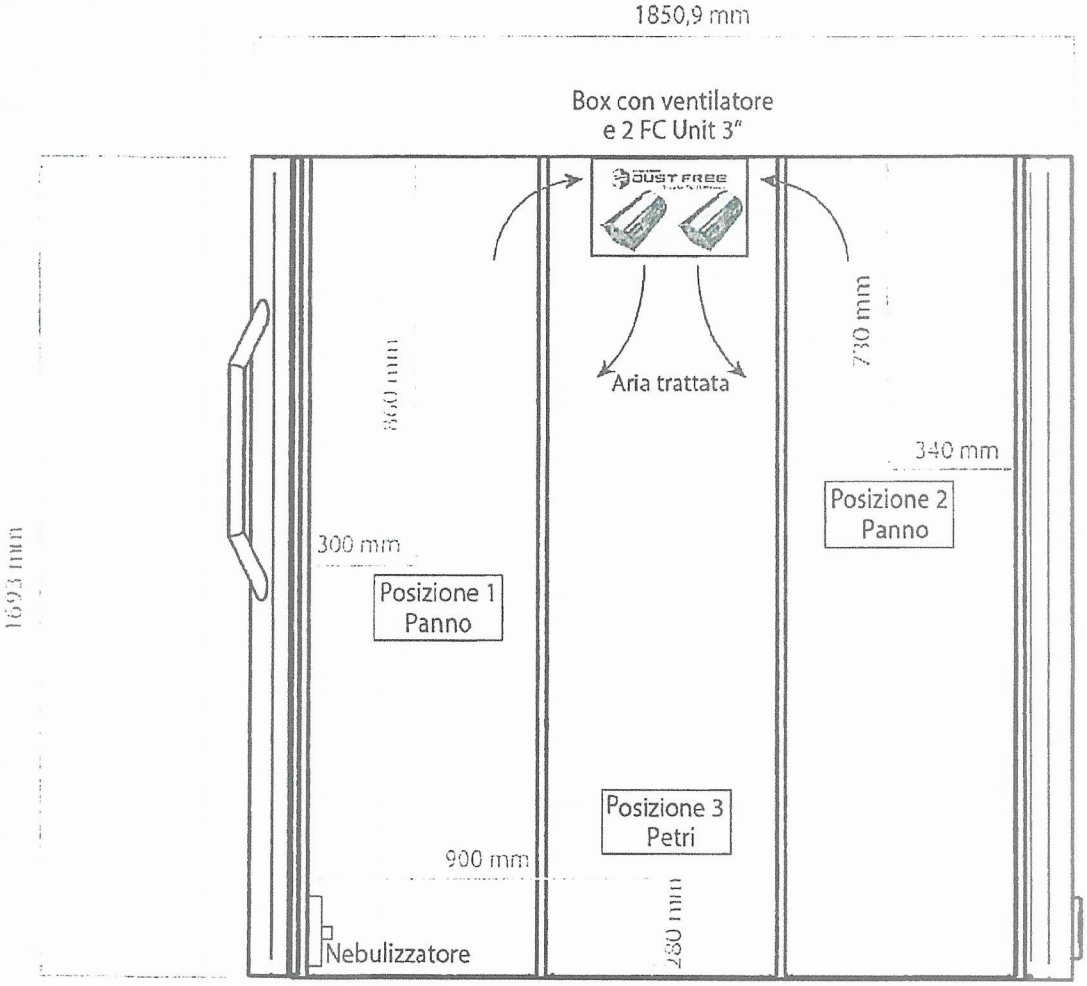


Fig.1 Schema del dispositivo NEVOLA

2.3 Definizione della sospensione virale da saggiare

Il SARS-CoV-2 si trova in sospensione in terreno di mantenimento della coltura cellulare utilizzata per l'amplificazione virale.
Nello specifico: al tempo 0 (T0) in una fiasca per coltura cellulare t75 cm^2 (confluenza di circa 80%) si inocula 1mL di SARS-CoV-2 e 9 mL di DMEM al 2% FBS ed 1% PenStep e si lascia ad incubare a 37°C al 5% di CO_2. Post 72h dall'infezione (T3) il surnatante raccolto dalla coltura rappresenta la sospensione di SARS-CoV2 da testare.
La definizione del titolo virale viene eseguita mediante valutazione della TCID50/mL. La sospensione da utilizzare per le prove di valutazione dell'attività virucida dovrà avere un titolo ≥ TCID50 10^7/mL.

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

2.4 Titolazione virale: Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID50)

Utilizzando la sospensione virale da saggiare, eseguire10 diluizioni in base 10 (da 10^{-1} a 10^{-10}).
Le diluizioni si ottengono miscelando la sospensione virale con DMEM a freddo.
Preparare 10 provette contenenti 1080µL di DMEM al 2% e disporle in ghiaccio.
Eseguire le diluizioni seriali aliquotando 120µL di sospensione virale nella prima provetta contenente il DMEM al 2% (10^{-1}). Procedere con le diluizioni fino alla provetta 10 (10^{-10}) dalla quale, una volta eseguita la diluizione, scartare 120 µL di soluzione.
Terminate le diluizioni, procedere con l'eliminazione del terreno dalle piastre da 96 pozzetti all'interno delle quali sono state precedentemente seminate e coltivate 25.000 cellule VERO E6/pozzetto permissive per infezione da SARS-CoV-2 (confluenza attesa del monostrato cellulare pari ad 80% della superficie del pozzetto).
In ogni fila di pozzetti della piastra da 96, aggiungere 100 µl/pozzetto nei primi 10 pozzetti delle otto diluizioni virali più alte (da 10^{-3} alla 10^{-10}); negli ultimi due pozzetti d'ogni fila aliquotare 100µL di DMEM al 2% privo di virus in modo da considerarli come controllo negativo di infezione. Incubare la piastra a 37°C, 5% CO2 per 3 giorni. Dopo tale periodo osservare la piastra al microscopio ottico e contare i pozzetti che mostrano Effetto Citopatico (CPE) per fila.
Per effettuare la colorazione della piastra e rendere evidenti le placche formatesi, fissare il substrato cellulare tramite una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:2 (200 µl per pozzetto) e lasciarle ad incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo due lavaggi con PBS, colorare ciascun pozzetto con 60 µl di una soluzione 0,1% di cristal-violetto.
Un pozzetto è considerato positivo per l'effetto citopatico anche se solo poche cellule presentano CPE. Il test è da ritenersi valido solamente se i controlli negativi non presentano CPE. Il titolo virale viene quindi stimato mediante il metodo statistico di Kärber:

$T=10^{1+d(S-0,5)+1}$ TCID50/mL
d=Log10 della diluizione (=1 per diluizioni di fattore 10)
S=somma dei rapporti di pozzetti CPE+/fila per ogni diluizione (dalla 10-1 alla 10-10)

Per stimare il titolo virale in Unità Formanti Placche/mL (pfu/mL), sottrarre 0,7 Log al titolo calcolato come TCID50/mL ($1x10^{T-0,7}$).

2.5 Test di valutazione dell'attività virucida del dispositivo NEVOLA: fasi sperimentali

I saggi di valutazione dell'efficacia di trattamento sono da eseguire separatamente per ciascuna tecnologia di trattamento dell'aria posta all'interno del dispositivo.

Per entrambe le valutazioni, utilizzare due panni Texwipe imbevuti di soluzione virale posti rispettivamente in posizione 1 e posizione 2 all'interno del dispositivo e due piastre petri poste in posizione 3 all'interno del dispositivo. Per ciascuna tecnologia testare quindi un totale di 4 campioni di surnatante virale (2 panni e 2 petri) con ogni relativo tempo di esposizione come riportato da paragrafo dedicato (2.2).
Il saggio del surnatante virale trattato sia in fase liquida che rilasciato su panno, permette di valutare l'efficacia di penetrazione delle due differenti tecnologia di trattamento relativamente alle diverse matrici infette.

Lasciare sotto cappa a flusso laminare (BSCII) il surnatante di controllo esposto all'aria per i tempi di esposizione di ciascun protocollo di trattamento.

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

Eseguire il test della TCID50 prelevando 120µL da ciascuna soluzione trattata e non.
Per l'estrazione del virus dai panni imbevuti con il surnatante procedere come segue:
- terminate le fasi di trattamento dei materiali, inserire i panni in una Facon da 50 mL
- imbibire i panni aliquotando 4 mL di DMEM all'interno della Falcon
- vortexare la Falcon per 10 minuti e successivamente centrifugare per 5 minuti a 1500 rpm
- prelevare 120 µL dal fondo della Falcon ed utilizzarli per le diluizioni in base 10.

Tenere presente il fattore di diluizione 10 per il prodotto estrapolato dai panni al momento della stima del titolo virale: 400 µL di sospensione virale seminata sul panno sono risospesi utilizzando 4 mL di DMEM (1:10).

Valutare l'efficacia dei trattamenti Dust Free e nebulizzazione confrontando il titolo dei materiali trattati con il titolo dei relativi controlli non esposti alle tecnologie saggiate.

Per la determinazione della titolazione si faccia riferimento al paragrafo dedicato (2.4).

3.CRITERI DI ACCETTAZIONE

Affinché la sperimentazione possa essere ritenuta valida dovranno verificarsi i seguenti risultati:

- Il titolo la sospensione di SARS-CoV-2 pura utilizzata per la sperimentazione dovrà mostrare un titolo TCID50 $\geq 10^7$/mL.
- I titoli delle sospensioni utilizzate come controllo dovranno mostrare un titolo sufficiente per stimare l'eventuale decadimento post trattamento: TCID50 $\geq 10^4$/mL.
- I pozzetti con i substrati di controllo dovranno tutti mostrare chiaramente un substrato ben colorato e senza alcuna traccia di effetti citopatici.

4.SEZIONE SPERIMENTALE

Prova eseguita in data 16/10/2020

Stock virale di SARS-CoV-2 utilizzato GenBank accession number: MW000351.
Espansione virale del 25/09/2020 (8° ciclo di espansione).

Cellule utilizzate per il test in ottime condizioni morfologiche e confluenti: 45° ciclo di replicazione (dichiarazione al momento dell'acquisto: 37° ciclo)

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

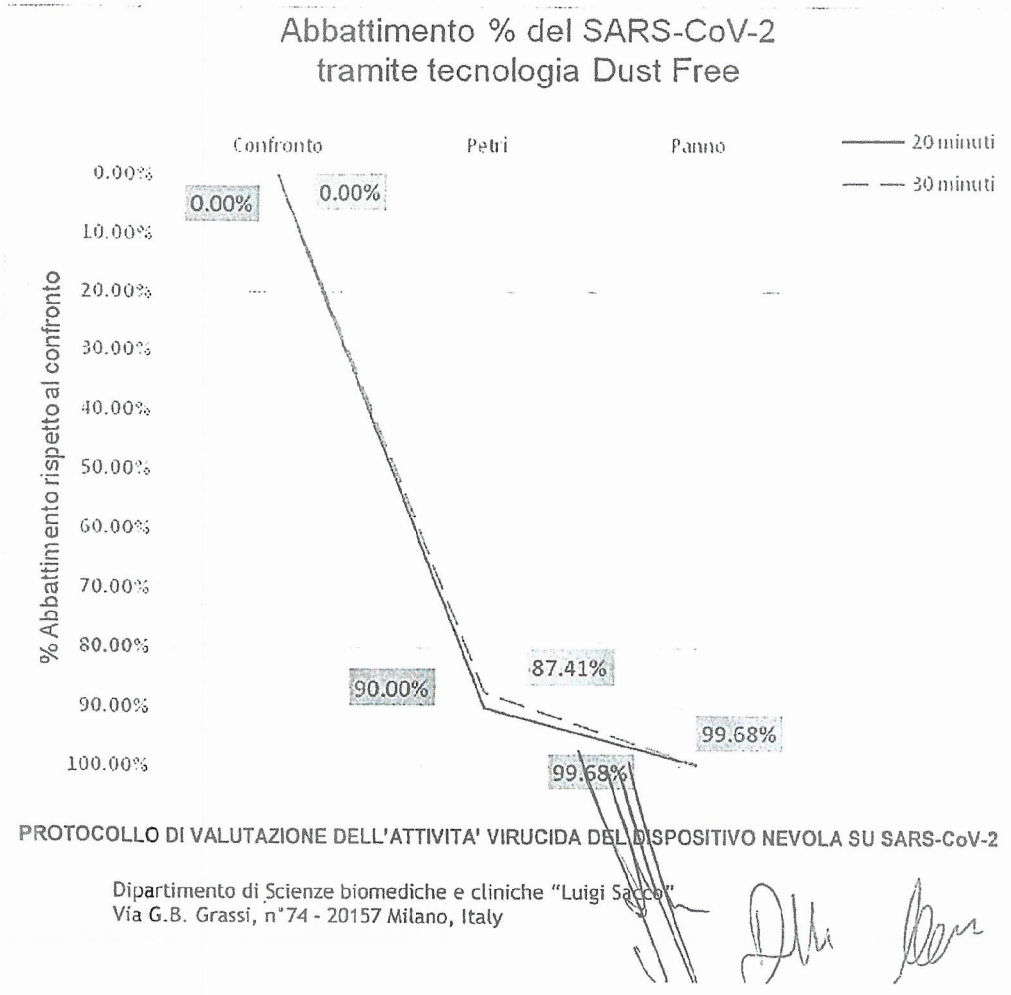
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
E CLINICHE "LUIGI SACCO"

5.ESITO SPERIMENTAZIONE

I risultati delle prove sperimentali finalizzate alla valutazione dell'efficacia di trattamento di SARS-CoV-2 ad opera del dispositivo NEVOLA sono riassunti in tabella 1.

Patogeno	Matrice Contaminata	Tecnologia	Tempo di Esposizione	TCID50
SARS-CoV-2 (MW000351)	Stock puro	//	//	10^{10}/mL
	Petri	Controlli (No-Trattamento)	20 minuti	10^{8}/mL
			30 minuti	10^{8}/mL
	Texwipe		20 minuti	$10^{5.5}$/mL*
			30 minuti	$10^{5.5}$/mL*
	Petri	Dust-Free	20 minuti	10^{7}/mL
			30 minuti	$10^{7.1}$/mL
	Texwipe	Dust-Free	20 minuti	10^{3}/mL*
			30 minuti	10^{3}/mL*
	Petri	Nebulizzazione	20 minuti (45 s)	$10^{7.6}$/mL
			20 minuti (90 s)	$10^{7.9}$/mL
	Texwipe	Nebulizzazione	20 minuti (45 s)	10^{6}/mL*
			20 minuti (90 s)	$10^{5.8}$/mL*

Tab.1 Risultati sperimentazione. La deviazione standard calcolata per il saggio TCID50 è ±0.5%.
*** Il titolo riportato è corretto per il fattore di diluizione 1:10 (+1 log)**



Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

Grafico.1 Abbattimento % del SARS-CoV-2 su petri e panni Texwipe a confronto con il relativo controllo alle tempistiche di 20 e 30 minuti di trattamento Dust Free.

La sospensione pura di SARS-CoV-2 utilizzata per le prove sperimentali, ha mostrato un titolo virale pari a TCID50 10^{10}/mL.
La sospensione virale depositata sulla piastra Petri e lasciata sotto la BSCII utilizzata come controllo positivo ha mostrato un titolo pari a TCID50 10^{8}/mL; lo stesso volume di sospensione assorbito dal panno Texwipe e lasciato sotto la BSCII per controllo del trattamento su panno, ha mostrato un titolo di TCID50 $10^{5.5}$/mL.
Al termine del trattamento all'interno della cabina NEVOLA per mezzo di tecnologia Dust-Free FC UNIT 3", i titoli virali stimati nelle soluzioni depositate all'interno delle piastre petri ed esposte alla tecnologia per 20 e 30 minuti sono risultati rispettivamente di TCID50 10^{7}/mL e $10^{7.1}$/mL.
A fronte del trattamento con la stessa tecnologia sui panni Texwipe i titoli virali ottenuti sono risultati pari a TCID50 10^{3}/mL per ambedue i tempi di esposizione.
Le sospensioni di SARS-CoV-2, trattate con soluzione di benzalconio cloruro al 4 % nebulizzato all'interno del dispositivo NEVOLA, hanno mostrato un titolo di TCID50 $10^{7.6}$/mL e $10^{7.9}$/mL quando esposte in forma liquida all'interno delle petri rispettivamente per il trattamento 1 (45 secondi di nebulizzazione) e il trattamento 2 (90 secondi di nebulizzazione e 20 minuti di esposizione); il titolo virale ha raggiunto rispettivamente i valori di TCID50 10^{6}/mL e $10^{5.8}$/mL con le soluzioni depositate su panno Texwipe e trattate con la medesima tecnologia nebulizzante per il trattamento 1 (45 secondi di nebulizzazione) e il trattamento 2 (90 secondi di nebulizzazione e 20 minuti di esposizione).
La deviazione standard calcolata per il saggio di titolazione virale (TCID50) è risultata dello 0.5% (0.5 log).
Per ciascun singolo saggio (controlli e trattamenti), non si osservano differenze significative tra i titoli virali ottenuti ed i tempi di latenza all'aria (controlli) ed esposizione ai trattamenti.
I controlli negativi di tutte le piastre utilizzate per i saggi hanno mostrato un ottimo stato del monostrato cellulare risultando ben colorati e senza alcun effetto citopatico.

6.CONCLUSIONI

A fronte dell'accordo stipulato tra Università degli Studi di Milano, nello specifico tra il Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco" e l'azienda Air Control Srl (P.I. 04805320969) è stato condotto un protocollo di studio finalizzato alla valutazione dell'attività virucida del dispositivo NEVOLA nei confronti di SARS-CoV-2.
Dall'analisi dei dati ottenuti sperimentalmente, il dispositivo NEVOLA quando utilizzato con attivazione della sola tecnologia Dust-Free FC UNIT 3", ha mostrato capacità di abbattere la carica virale di SARS-CoV-2 inoculata in fase liquida sia su una superficie che su un tessuto.
L'abbattimento verificato sul petri inoculato di SARS-CoV-2, esposto all'aria trattata per 20 minuti in un volume di 2,13 m^3, ha mostrato una riduzione di 1.0 log (90.0%) rispetto al controllo non trattato.
L'abbattimento verificato sul panno costituito per il 45% in polietere e 55% cellulosa, inoculato di SARS-CoV-2, esposto all'aria trattata per 20 minuti in un volume di 2,13 m3, ha mostrato invece una riduzione di 2.5 log (99.7%) rispetto al controllo non trattato.
Il ventilatore impiegato ha portata d'aria pari a 35 mch.
Nelle condizioni sperimentali valutate, la tecnologia a vapore con nebulizzazione di una soluzione al 4% di benzalconio cloruro applicata dal dispositivo NEVOLA non ha mostrato risultati apprezzabili in termini di decadimento del titolo virale. Ulteriori studi di approfondimento

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy

della combinazione tra tecnologia nebulizzante e dispositivo NEVOLA sono necessari al fine di migliorare la resa di trattamento nei confronti di SARS-CoV-2.

7.BIBLIOGRAFIA

1) EN14476:2013
2) Kampf G1, Todt D2, Pfaender S2, Steinmann E2. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020 Feb 6.
3) ASTM E1053 - 11 Standard Test Method to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces.
4) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW000351
5) World Health Organization. Interim Guidance. Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19. Ref. no. WHO/2019-nCoV/Disinfection/2020.1
6) https://aircontrolclima.it/moduli-fc-unit/

Dipartimento di Scienze biomediche e cliniche "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milano, Italy