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

UNIVERSITÉ DE MILAN
DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOMÉDICALES
ET CLINIQUES "LUIGI SACCO"

PROTOCOLE D'ÉVALUATION DES ACTIVITÉS VIRUCIDE DE L'APPAREIL NEVOLA SUR LE SARS-CoV-2

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Edité par	David Miletus	Main Enquêteur	//SIGNATURE// David Miletus	9/11/2020
Révisé par	Luca Gatti	Client (Air-Control Srl)	//SIGNATURE// Luca Gatti	9/11/2020
	Luca Tabanelli	Fabricant Nevola (Kemin Textile Srl)	//SIGNATURE// Luca Tabanelli	9/11/2020
Approuvé par	Maria Rita Gismondo	Contrôleur	//SIGNATURE// Maria Rita Gismondo	9/11/2020

Département des sciences biomédicales et cliniques "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milan, Italie

Sommaire

1. INTRODUCTION

La cabine NEVOLA (nom du prototype) est un dispositif destiné à la désinfection des vêtements; elle est composée de trois modules et a un volume intérieur total de 2,13 m3.
La cabine utilise deux technologies différentes pour le traitement des matériaux placés à l'intérieur : la technologie Dust-Free (FC UNIT 3") et la Nebulization.

- La technologie Dust Free exploite le dispositif FC Unit 3", basé sur le principe de la photocatalyse : l'émission de rayons UV provoque la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui ont une action oxydante sur les microorganismes présents dans l'air exposé au traitement. La technologie PCO™ des modules FC UNIT exploite l'action combinée des rayons d'une lampe UV spéciale avec une structure catalytique constituée d'un alliage métallique à matrice alvéolée, principalement composé de TiO2 (dioxyde de titane) et d'autres 3 métaux nobles dans une moindre mesure. Les modules FC UNIT, lorsqu'elles sont affectées par le flux d'air, donnent lieu à une réaction photocatalytique capable de produire des hydroxyl radicals(-OH) et du peroxyde d'hydrogène (H2O2) en quantités minimes. Le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles permettent d'assainir à la fois le flux d'air et les surfaces qui ont une action démolissante sur les micro-organismes exposés au traitement.
- L'assainissement par nébulisation est plutôt réalisé à l'aide d'un générateur de brouillard sec capable de vaporiser 0,4 ml/sec d'une solution de chlorure de benzalkonium à 4% placée à l'intérieur.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'efficacité du traitement du SRAS-CoV-2 par le dispositif NEVOLA. À cette fin, les deux technologies d'assainissement, Dust Free et Nebulization, placées à l'intérieur de la cabine seront évaluées séparément.

2. MATÉRIAUX ET MÉTHODES

2.1 Matériaux

- Dispositif NEVOLA :
  - No. 2 Appareils Dust Free Technology FC Unit 3" : chacun d'eux est constitué d'un catalyseur penta-métallique à base de dioxyde de titane, d'une lampe UVC et d'un ventilateur avec un débit d'air de recirculation interne de 35 m3/h.
  - Technologie d'atomisation : chaudière d'une puissance de 900 W et d'une température de fonctionnement de 180 °C (sur la buse) combinée à une pompe à brouillard sec de 18 W avec un débit de 0,4 ml/sec.
- SARS-CoV-2 en suspension supérieure ou égale à TCID50 10^7/mL
- Cellules TRUE 01008 (ATCC®CRL-1586™)
- Milieu de culture cellulaire : Le milieu Eagle modifié Dulbecco avec L-glutamine (DMEM, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Sérum de veau fœtal (FBS, GibcoTM ThermoFisher Scientific)
- Pénicilline-Streptomycine [5,000 U/mL] (Pen-Strep, Gibco™ ThermoFisher Scientific)
- Bain thermostaté à 37°C ± 1°C
- Incubateur à CO_2
- Plaques de culture cellulaire t25 cm^2
- Plaques de culture cellulaire t75 cm^2
- Plaques de culture cellulaire à 96 puits

- Violet de gentiane
- Acétone 99
- Méthanol 99%
- Tampon phosphate salin (PBS)
- Micropipettes : 10 pL ; 200 pL ; 1000 pL
- Embouts stériles à filtre
- Pipeteur automatique
- Pipettes sérologiques
- TexwipeTM TechniClothTM chiffons non tissés secs (45% PE / 55% cellulose)
- Boîtes de pétri
- Vortex
- Falcon 50 mL
- Sarsted 2 mL
- Hotte de sécurité biologique niveau II (BSCII)
- Équipement de protection individuelle dédié

2.2 Conditions de test sélectionnées

Température : 25 °C ± 1 °C

Matériaux traités :

- suspension virale libérée sur une boîte de pétri
- des chiffons Texwipe imbibés de suspension virale

Volume de la suspension virale utilisée pour chaque matière traitée : 400 p.L

Technologie Dust Free

- 30 minutes de prétraitement de l'appareil NEVOLA avec la technologie Dust Free avant chaque traitement
- traitement 1 : 20 minutes d'exposition
- traitement 2 : 30 minutes d'exposition

Nébulisation

- traitement 1 : 45 secondes de nébulisation et 20 minutes d'exposition
- traitement 2 : 90 secondes de nébulisation et 20 minutes d'exposition

Positionnement des matériaux à traiter

- Position 1 (Texwipe) : 86 cm du toit et 30 cm de la porte d'entrée
- Position 2 (Texwipe) : 73 cm du toit et 34 cm de la porte d'entrée
- Position 3 (Petri) : 28 cm du bas et 90 cm de la porte d'entrée

Les contrôles Texwipe et Petri, inoculés avec les mêmes concentrations de SarsCov-2, sont placés à l'intérieur de la hotte de niveau de biosécurité II (BSC II) du laboratoire BSL4.

Toutes les opérations doivent être effectuées dans un laboratoire ayant un niveau de sécurité biologique minimum 3 (BSL-3 ou BSL-4).

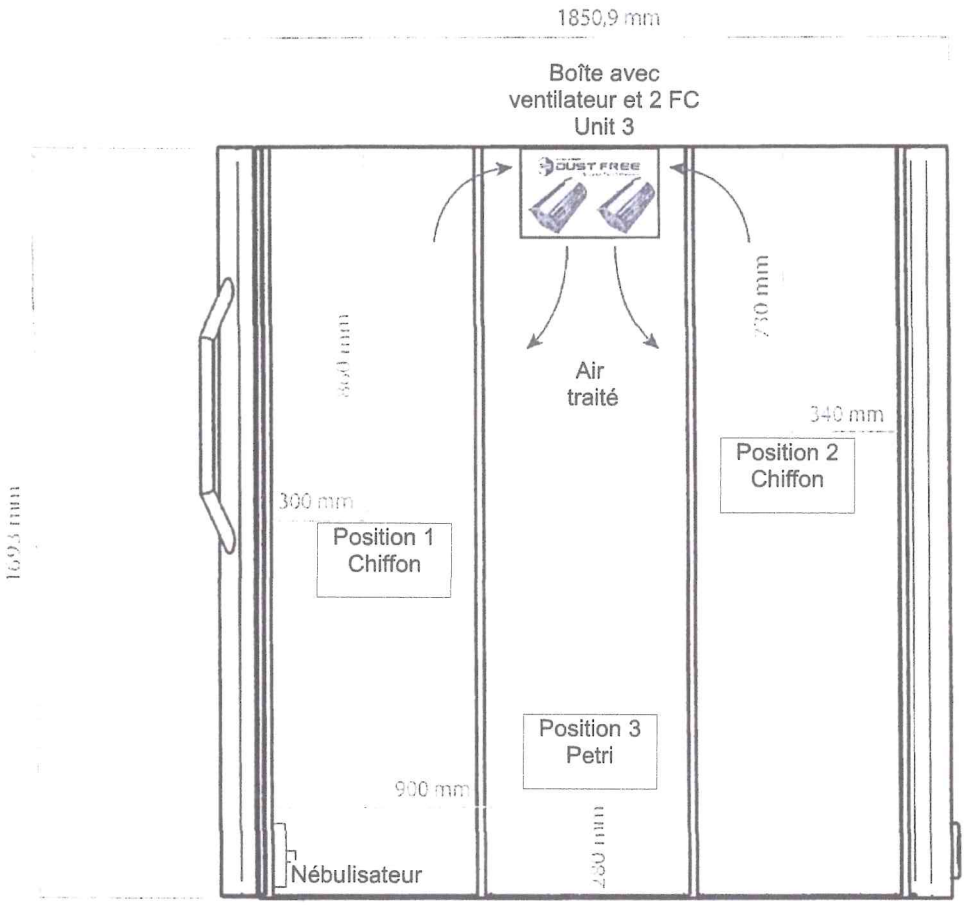


Fig.1 Schéma du dispositif NEVOLA

2.3 Définition de la suspension virale à tester

Le SARS-CoV-2 est en suspension dans un milieu de culture cellulaire de maintenance utilisé pour l'amplification virale.
Plus précisément : au temps 0 (T0) dans une bobine de culture cellulaire t75 cm 2 (confluence d'environ 80%), 1 ml de SARS-CoV-2 et 9 ml de DMEM à 2% de FBS et 1% de PenStep sont inoculés et est incubé à 37°C à 5% de CO_2. 72h après l'infection (T3), le surnageant collecté dans la culture représente la suspension de CoV2-SARS à tester.
La définition du titre viral est effectuée par l'évaluation de la TCID50/mL. La suspension à utiliser pour les tests d'évaluation de l'activité virucide doit avoir un titre ≥ TCID50 10^7/mL.

2.4 Titrage viral :Tissue Culture Infectious Dosage 50 (TCID50)

En utilisant la suspension virale à tester, effectuer 10 dilutions sur la base de 10 (10^{-1} à 10^{-10}). Les dilutions sont obtenues en mélangeant la suspension virale avec du DMEM froid.
Préparez 10 tubes contenant 1080µL de 2% de DMEM et placez-les en glace.
Effectuer des dilutions en série en aliquotant 120µL de suspension virale dans le premier tube contenant 2% de DMEM (10^{-1}). Procédez aux dilutions jusqu'au tube 10 (10^{-10}) à partir duquel, une fois la dilution effectuée, jetez 120 µL de solution.
Une fois les dilutions terminées, procéder à l'enlèvement de la terre des plaques de 96 puits dans lesquelles 25 000 cellules permissives VERO E6/puits pour l'infection par le SRAS-CoV-2 ont été préalablement ensemencées et cultivées (confluence prévue de la cellule monocouche égale à 80 % de la surface du puits).
Dans chaque rangée de puits de la plaque 96, ajouter 100 µL/puits dans les 10 premiers puits des huit dilutions de virus les plus élevées (10^{-3} à 10^{-10}) ; dans les deux derniers puits de chaque rangée, aliquoter 100µL de DMEM à 2% sans virus dans les deux derniers puits afin qu'ils soient considérés comme un contrôle négatif de l'infection. Incuber la plaque à 37°C, 5% de CO2 pendant 3 jours. Après cette période, observez la plaque au microscope optique et comptez les puits présentant un effet cytopathique (ECP) par rangée.
Pour colorer la plaque et rendre visibles les plaques formées, fixer le substrat cellulaire avec une solution d'acétone et de méthanol dans un rapport 1:2 (200 µL par puits) et laisser incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Après deux lavages au PBS, colorer chaque puits avec 60 µL d'une solution de Violet de gentiane à 0,1 %.
Un puits est considéré comme positif pour l'effet cytopathique même si seules quelques cellules présentent un ECP. Le test n'est valable que si les contrôles négatifs ne montrent pas d'ECP. Le titre viral est ensuite estimé à l'aide de la méthode statistique de Kàrber :

$T=10^{1+d(S-0,5)+1}$ TCID50/mL
d=Log10 de la dilution (=1 pour les dilutions par le facteur 10)
S=somme des rapports de puits CPE+/rangée pour chaque dilution (10^{-1} à 10^{-10})

Pour estimer le titre viral en unités formatrices de plaques/mL (pfu/mL), soustrayez 0,7 Log du titre calculé comme TCID50/mL ($1x10^{T-0,7}$).

2.5 Test d'évaluation de l'activité virucide du dispositif NEVOLA : étapes expérimentales

Les essais d'évaluation de l'efficacité du traitement doivent être effectués séparément pour chaque technologie de traitement de l'air dans l'appareil.

Pour les deux évaluations, utilisez deux chiffons Texwipe trempés dans une solution virale placés respectivement en position 1 et 2 à l'intérieur de l'appareil et deux boîtes de pétri placées en position 3 à l'intérieur de l'appareil. Pour chaque technologie, on teste ensuite un total de 4 échantillons de surnageant viral (2 lingettes et 2 boîtes de pétri) avec chaque temps d'exposition relatif comme indiqué au paragraphe 2.2.
Le dosage du surnageant viral traité, à la fois en phase liquide et libéré sur le tissu, permet d'évaluer l'efficacité de la pénétration des deux différentes technologies de traitement par rapport aux différentes matrices infectées.

Laisser sous la hotte à flux laminaire (BSCII) le contrôle surnageant exposé à l'air pendant la durée d'exposition de chaque protocole de traitement.

Testez le TCID50 en prélevant 120µL de chaque solution traitée et non traitée. Pour extraire le virus des chiffons imbibés du surnageant, il faut procéder comme suit :

- une fois les phases de traitement des matériaux terminées, insérer les lingettes dans un Falcon de 50 ml
- Trempez les vêtements dans 4 ml de DMEM à l'intérieur du Falcon
- Faites tourbillonner le Falcon pendant 10 minutes, puis centrifuger pendant 5 minutes à 1500 tours/minute.
- Prélever 120 µL au fond du Faucon et les utiliser pour les dilutions selon le facteur de dilution 10 du produit extrapolé du tissu lors de l'estimation du titre viral : 400 µL de suspension virale semée sur le tissu sont remis en suspension à l'aide de 4 ml de DMEM (1:10).

Évaluer l'efficacité des traitements Dust Free et de nébulisation en comparant le titre des matériaux traités avec le titre des témoins relatifs non exposés aux technologies testées.

Pour la détermination du titrage, voir le paragraphe 2.4.

3. CRITÈRES D'ACCEPTATION

Pour que l'essai soit considéré comme valide, les résultats suivants doivent être obtenus :

- Le titre de suspension pure SARS-CoV-2 utilisée pour l'essai doit porter un titre TCID50 ≥ 10^4/mL.
- Les titres des suspensions utilisées comme contrôle doivent présenter un titre suffisant pour estimer la décroissance possible après traitement : TCID50 ≥ 10^4/mL.
- Les puits équipés de substrats de contrôle doivent tous présenter clairement un substrat bien coloré et sans aucune trace d'effets cytopathiques.

4. SECTION EXPÉRIMENTALE

Test effectué le 16/10/2020

Le stock viral du SRAS-CoV-2 a utilisé le numéro d'accès GenBank : MW000351.
Expansion virale du 25/09/2020 (8e cycle d'expansion).

Cellules utilisées pour le test dans d'excellentes conditions morphologiques et confluentes : 45° cycle de réplication (déclaration au moment de l'achat : 37° cycle)

Département des sciences biomédicales et cliniques "Luigi Sacco"
Via G.B. Grassi, n°74 - 20157 Milan, Italie

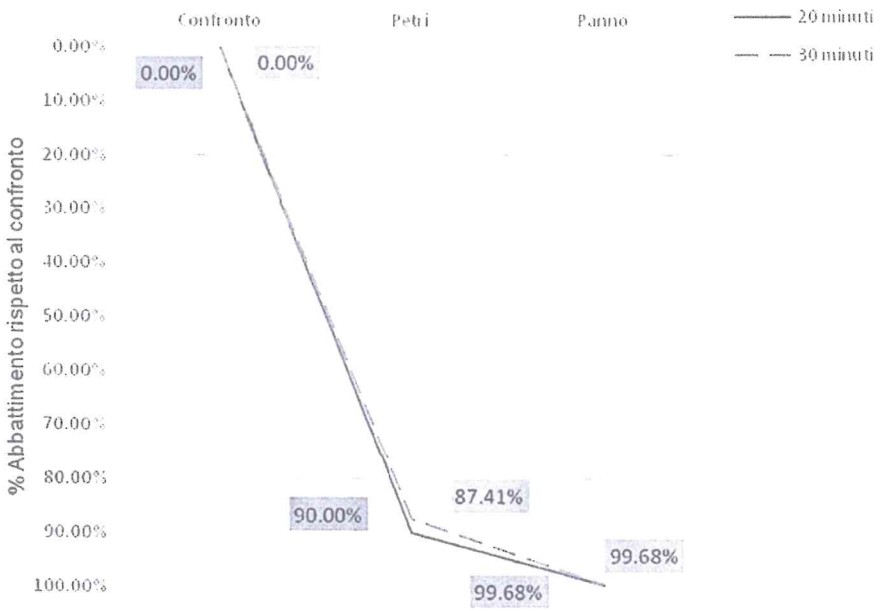
5. RESULTAT DU PROCÈS

Les résultats des essais expérimentaux visant à évaluer l'efficacité du traitement du SRAS-CoV-2 par le dispositif NEVOLA sont résumés dans le tableau 1.

Pathogène	Matrice contaminée	Technologie	Temps d'exposition	TCID50
SRAS-CoV-2 (MW000351)	Stock pur	//	//	10^{10}/mL
	Petri	Contrôles (Pas de traitement)	20 minutes	10^{8}/mL
			30 minutes	10^{8}/mL
	Texwipe		20 minutes	$10^{5.5}$/mL*
			30 minutes	$10^{5.5}$/mL*
	Petri	Dust-Free	20 minutes	10^{7}/mL
			30 minutes	$10^{7.1}$/mL
	Texwipe	Dust-Free	20 minutes	10^{3}/mL
			30 minutes	10^{3}/mL
	Petri	Nébulisation	20 minutes (45 s)	$10^{7.6}$/mL
			20 minutes (90 s)	$10^{7.9}$/mL
	Texwipe	Nébulisation	20 minutes (45 s)	10^{6}/mL
			20 minutes (90 s)	$10^{5.8}$/mL*

Tab.1 Résultats des tests. L'écart-type calculé pour le test TCID50 est de ±0,5%. * Le titre déclaré est corrigé du facteur de dilution 1:10 (+1 log)

Réduction en % du SRAS-CoV-2
grâce à la technologie Dust Free



Graphique 1 : Réduction du taux de SRAS-CoV-2 sur les boîtes de Pétri et les chiffons Texwipe par rapport au contrôle correspondant après 20 et 30 minutes de traitement Dust Free.

La suspension pure de CoV-2-SARS utilisée pour les tests expérimentaux a montré un titre viral de TC1D50 10 19/m L.
La suspension virale déposée sur la boîte de Petri et laissée sous le BSCII utilisé comme contrôle positif a montré un titre de TCID50 10^{8}/mL ; le même volume de suspension absorbé par le tissu Texwipe et laissé sous le BSCII pour le contrôle de traitement sur le tissu a montré un titre de TCID50 $10^{5.5}$/mL.
A la fin du traitement à l'intérieur de la cabine NEVOLA utilisant la technologie Dust-Free FC UNIT 3", les titres viraux estimés dans les solutions déposées à l'intérieur des boîtes de pétri et exposées à la technologie pendant 20 et 30 minutes étaient respectivement de TCID50 10^{7}/m L et $10^{7.1}$/mL.
Les titres viraux obtenus avec la même technologie sur les chiffons Texwipe étaient de TCID50 10^{3}/mL pour les deux temps d'exposition.
Les suspensions de SARS-CoV-2, traitées avec une solution de chlorure de benzalkonium à 4 % nébulisée dans le dispositif NEVOLA, ont montré un titre de TCID50 de $10^{7.8}$/mL et $10^{7.9}$/mL lorsqu'elles ont été exposées sous forme liquide dans les boîtes de pétri pour le traitement 1 (45 secondes de nébulisation) et le traitement 2 (90 secondes de nébulisation et 20 minutes d'exposition) respectivement ; le titre viral a atteint TCID50 10^{6}/mL et $10^{5.8}$/mL avec les solutions déposées sur le tissu Texwipe et traitées avec la même technologie de nébulisation pour le traitement 1 (45 secondes de nébulisation) et le traitement 2 (90 secondes de nébulisation et 20 minutes d'exposition) respectivement.
L'écart-type calculé pour le test de titrage viral (TCID50) était de 0,5 % (0,5 log).
Pour chaque test individuel (contrôles et traitements), il n'y a pas de différences significatives entre les titres viraux obtenus et les temps de latence dans l'air (contrôles) et l'exposition aux traitements.
Les contrôles négatifs de toutes les plaques utilisées pour les tests ont montré un excellent état de la monocouche cellulaire et étaient bien colorés et sans aucun effet cytopathique.

6. CONCLUSIONS

Suite à l'accord entre l'Université de Milan, en particulier entre le Département des sciences biomédicales et cliniques "Luigi Sacco" et la société Air Control Srl (N. TVA 04805320969), un protocole d'étude a été mené pour évaluer l'activité virucide du dispositif NEVOLA contre le SRAS-CoV-2.
D'après l'analyse des données obtenues expérimentalement, le dispositif NEVOLA, lorsqu'il est utilisé avec l'activation de la seule technologie Dust-Free FC UNIT 3", a montré la capacité de décomposer la charge virale du CoV-2 du SRAS inoculé en phase liquide à la fois sur une surface et dans un tissu. L'abattage vérifié sur la boîte de pétri inoculée de SARS-CoV-2, exposée à l'air traité pendant 20 minutes dans un volume de 2,13 m^3 , a montré une réduction de 1,0 log (90,0%) par rapport au témoin non traité.
La réduction vérifiée sur le tissu composé de 45% de polyéther et 55% de cellulose, inoculé avec le SARS-CoV-2, exposé à l'air traité pendant 20 minutes dans un volume de 2,13 m^3, a montré au contraire une réduction de 2,5 log (99,7%) par rapport au témoin non traité.
Le ventilateur utilisé a un débit d'air de 35 mch.
Dans les conditions expérimentales évaluées, la technologie de la vapeur avec nébulisation d'une solution de chlorure de benzalkonium à 4% appliquée par l'appareil NEVOLA n'a montré aucun résultat appréciable en termes de décroissance du titre viral. Des études supplémentaires sur la combinaison de la technologie de nébulisation et de l'appareil NEVOLA sont nécessaires pour améliorer le rendement du traitement contre le SRAS-CoV-2.

7. BIBLIOGRAPHIE

1) EN14476:2013
2) Kampf G1, Todt D2, Pfaender S2, Steinmann E2. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents. 3 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/

L'anno 2020 il giorno 24 del mese di 11

Nella Cancelleria del Tribunale di Salerno

Avanti al sottoscritto Funzionario è comparso il Perito/Consulente Tecnico del Tribunale Penale e Civile di Salerno, il Sig. Enciu Vasile Marius, nato il 18/06/1983 e residente in Salerno, con la carta d'identità CA36746AU rilasciata il 19/02/2018 a Salerno il quale chiede di asseverare con giuramento la traduzione che precede.
Pertanto, invitato il predetto C.T. a giurare sulla seguente formula "Giuro di aver bene e fedelmente adempiuto all'incarico affidatomi al solo scopo di far conoscere la verità.

Il C.T. pronuncia le parole: " Lo giuro…

The year 2020 day 24 and month 11

In the Court Registry of Salerno

The undersigned Vasile Marius Enciu born in Constanta, date of birth 18/06/1983, identification card no.: N. CA36746AU, issued on 19/02/2018 in Salerno professional interpreter and translator at the Court of Criminal and Civil Law of Salerno (Italy), to registered in the Civil and Criminal Court of Salerno from 30.11.2011, with the number 1132, certifies:
Therefore, the aforementioned C.T. was invited to swear on the following formula "I swear I well and faithfully fulfilled the assignment entrusted to the sole purpose of making known the truth."

The C.T. pronounces the following words: "I swear…"

Il C.T. / The C.T.

Albo Consulenti Tecnici Tribunale Salerno - Ruolo Periti Esperti C.C.I.A.A. Salerno
Marius Enciu
N° 1132
TRADUTTORE GIURATO

Il Funzionario / The Officer
Il Funzionario Giudiziario
dott. Pietro Rossi

Dichiarazione ai fini dell'esenzione fiscale: Si dichiara che il presente atto in basse al D.P.R. 26/10/1972 n. 642 e successive modificazioni è esente da bollo e diritti

TRADUZIONI GIURATE TRADUCEM
OFFICIAL TRANSLATORS & INTERPRETERS
Certified and sworn translators accredited by the Court of Salerno (Italy)
Mr. Marius Enciu
P. IVA: 04992200651
info@traducemtraduzioni.it - www.traducemtraduzioni.it
Whatsapp & Cell.: (+39) 371 17 49 592 Cell.: (+39) 331 79 38 134
Operational headquarters: ON THE ITALIAN TERRITORY
Registered office: SALERNO - Via Dei Principati, 77 - 84122 (SA)
Registration into the List of Experts, and Experienced Interpreters and Translators of the Chamber of Commerce of Salerno, registration no. 1132
Registration into the Association of Technical Experts Interpreters, and Translators of the Criminal and Civil Court of Salerno, registration no. 107

APOSTILLE

(convention de La Haja du 5 octobre 1961)

1. Stato: ITALIA

Il presente atto pubblico

2. è stato firmato da PIETRO ROSSI
3. in qualità di: CANCELLIERE
4. è munito del sigillo/ TRIBUNALE DI SALERNO

Attestato

5. in SALERNO 6. Il 24/11/2020
7. da PROCURA DELLA REPUBBLICA C/O IL TRIBUNALE DI SALERNO
8. col numero 1712/2020

PROCURA DELLA REPUBBLICA PRESSO IL TRIBUNALE DI SALERNO

Il Procuratore della Repubblica Aggiunto

Rocco Alfano