

Padova, 18 Agosto 2021

**OGGETTO: contratto di ricerca commissionata per lo svolgimento dell'attività di: "valutare l'efficacia anti-SARS-CoV-2 di una superficie funzionalizzata".**

L'attività di ricerca in oggetto ha previsto la valutazione dell'attività antivirale di trattamenti di una superficie funzionalizzata nei confronti di SARS-CoV-2 in idonei modelli cellulari.

Nello specifico, i saggi che sono stati allestiti hanno incluso l'impiego di quantità note di virus e, utilizzando colture di cellule Vero E6, l'analisi della riduzione dell'infettività virale a seguito di contatto con il materiale opportunamente trattato con anodizzazione agli ioni di argento "GHA".

## Materiali e metodi

### *Colture cellulari*

Sono state utilizzate cellule epiteliali di rene di scimmia Vero E6, altamente sensibili e permissive all'infezione da parte di SARS-CoV-2. Le cellule sono state coltivate in presenza di terreno DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's" medium), addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, "fetal bovine serum") e di antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml). Le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO<sub>2</sub>.

### *Allestimento dello stock di sospensione virale, titolazione del virus*

E' stato impiegato l'isolato clinico di SARS-CoV-2 2019-nCoV/Italy-INMI1\*. La sospensione virale è stata ottenuta infettando monostrati cellulari di Vero E6 ad una bassa molteplicità di infezione (*multiplicity of infection*, m.o.i., pari a 0.01 pfu/cellula dove pfu indica unità formanti placche). In presenza di effetto citopatico maggiore dell'80% del monostrato, le cellule ed i sovrantanti sono stati raccolti e sottoposti a tre cicli di congelamento-scongelo e successiva centrifugazione a bassa velocità per eliminare i detriti cellulari. Il sovrantante è stato poi aliquotato e congelato a -80°C.



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

Il titolo della sospensione virale è stato determinato mediante saggio di placche. A tale scopo, le cellule Vero E6 sono state seminate alla densità di  $10^5$  cellule/ml ed infettate in presenza di concentrazioni scalari (in base 10) di virus per 1 ora a  $37^\circ\text{C}$ , poi mantenute in presenza di DMEM al 2% (v/v) di FBS, addizionato con carbossimetilcellulosa allo 0.75%. Dopo un'incubazione di 48-72 ore a  $37^\circ\text{C}$ , le cellule venivano fissate in presenza di formaldeide, colorate con cristalvioletto e poi si procedeva alla conta delle placche formatesi sul monostrato per effetto citopatico del virus. Il titolo virale veniva calcolato mediante il metodo di Spearman-Karber ed espresso come pfu/ml.

Per valutare la riduzione dell'infettività virale è stata utilizzata la procedura descritta nella **ISO 21702\_2019 "Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces"**, utilizzando campioni del materiale in esame delle dimensioni di 4 cm x 4 cm sui quali sono stati depositati 400  $\mu\text{l}$  di sospensione virale con un titolo pari a  $10^7$  PFU/ml. L'inoculo è stato coperto con un film della dimensione di 3 cm x 3 cm in maniera da creare uno stato sottile a contatto con il materiale. Ogni campione è stato alloggiato in una capsula petri ed in contenitori chiusi per minimizzare l'evaporazione. Dopo un opportuno periodo di incubazione, il virus residuo è stato raccolto utilizzando 10 ml di terreno DMEM privo di siero e titolato in duplicato su cellule Vero E6 come sopra specificato, utilizzando 100  $\mu\text{l}$  del campione così come raccolto e 5 diluizioni in base 10 dello stesso.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in Laboratorio di Biosicurezza di Livello 3 (BSL3).

*\*This study was also supported by the European Virus Archive goes Global (EVAg) project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 653316.*

## Risultati

Sono stati condotti **2 esperimenti**, utilizzando 3 diverse tempistiche di esposizione del virus al materiale trattato e NON trattato (30 minuti, 1 ora, 2 ore). Per ogni esperimento e per ogni tempistica sono stati utilizzati 3 campioni di materiale trattato e 3 di materiale NON trattato (controllo). Il titolo virale è stato valutato con il saggio delle placche. I risultati ottenuti sono illustrati nelle seguenti Tabelle, ciascuna rappresentativa di ogni singolo esperimento.

Nello specifico, il titolo virale viene calcolato utilizzando la formula riportata al paragrafo 8.1 della ISO di riferimento, ovvero:

$$N = (10 \times C \times D \times V) / A$$



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

dove:

C: è la media del numero di placche contate nei 2 pozzetti rappresentativi del duplicato della titolazione;

D: è la diluizione della sospensione virale utilizzata per infettare i pozzetti analizzati al punto precedente;

V: è il volume di DMEM in ml utilizzato per recuperare il virus al termine dell'incubazione (10 ml);

A: è la superficie del film utilizzato per coprire l'inoculo virale in cm<sup>2</sup> (9 cm<sup>2</sup>).

In entrambi gli esperimenti sono risultate valide le condizioni riportate ai paragrafi 8.2.2/8.2.4 della ISO di riferimento.

In particolare, il titolo virale riscontrato nei caso del contatto dell'inoculo con campioni NON trattati è sempre risultato superiore a  $6.2 \times 10^2$  PFU/cm<sup>2</sup>.

Inoltre, il titolo ottenuto a partire dai campioni recuperati subito dopo il contatto con il materiale NON trattato ( $N_0$ ) è sempre risultato compreso tra  $2.5 \times 10^5$  PFU/cm<sup>2</sup> e  $1.2 \times 10^6$  PFU/cm<sup>2</sup> come riportato sotto ogni Tabella.

I dati riportati in Tabella sono espressi come attività antivirale R, calcolata come riportato nel paragrafo 8.3 della ISO di riferimento, ovvero:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

dove:

$U_0$ : è la media dei logaritmi del titolo virale espresso in PFU/cm<sup>2</sup> e calcolato dai campioni recuperati subito dopo l'inoculazione sul materiale NON trattato;

$U_t$ : è la media dei logaritmi del titolo virale espresso in PFU/cm<sup>2</sup> e calcolato dai campioni recuperati al tempo t dopo l'inoculazione sul materiale NON trattato;

$A_t$ : è la media dei logaritmi del titolo virale espresso in PFU/cm<sup>2</sup> e calcolato dai campioni recuperati al tempo t dopo l'inoculazione sul materiale trattato.

Inoltre, è stata calcolata la % di riduzione del titolo virale nei campioni posti a contatto con il materiale trattato rispetto a quelli posti a contatto con il materiale NON trattato recuperati alla stessa tempistica.



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

**Tabella esperimento n.1**

	30 minuti		1 ora		2 ore	
	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione
<b>NON TRATTATO</b>	1.9*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.1*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.4*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	
<b>TRATTATO</b>	5.1*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	<b>73%</b>	2.6*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	<b>76%</b>	1.1*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	<b>92%</b>
<b>R</b>	<b>0.57</b>		<b>0.62</b>		<b>1.1</b>	

$N_0 = 3.5 \cdot 10^5$  PFU/cm<sup>2</sup>

**Tabella esperimento n.2:**

	30 minuti		1 ora		2 ore	
	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione
<b>NON TRATTATO</b>	1.5*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.4*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.2*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	
<b>TRATTATO</b>	4*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	<b>73%</b>	2*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	<b>86%</b>	9*10 <sup>3</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	<b>93%</b>
<b>R</b>	<b>0.57</b>		<b>0.85</b>		<b>1.12</b>	

$N_0 = 3.97 \cdot 10^5$  PFU/cm<sup>2</sup>

In conclusione, al netto di un naturale decadimento del titolo virale al di fuori dell'ambiente intracellulare, concludiamo che il trattamento del materiale oggetto di studio ha la capacità di abbattere il titolo di SARS-CoV-2 di oltre 1 logaritmo dopo 2 ore di contatto.

Padova, 18 Agosto 2021

Firma  
  
Prof.ssa Maria Cristina Parolin

# APPENDICE

Tabella esperimento n.1

	30 minuti		1 ora		2 ore	
	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione
NON TRATTATO	1.9*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.1*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.4*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	
TRATTATO	5.1*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	73%	2.6*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	76%	1.1*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	92%
R	0.57		0.62		1.1	

$N_0 = 3.5 \cdot 10^5$  PFU/cm<sup>2</sup>

Tabella esperimento n.2:

	30 minuti		1 ora		2 ore	
	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione	titolo	% riduzione
NON TRATTATO	1.5*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.4*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>		1.2*10 <sup>5</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	
TRATTATO	4*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	73%	2*10 <sup>4</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	86%	9*10 <sup>3</sup> PFU/cm <sup>2</sup>	93%
R	0.57		0.85		1.12	

$N_0 = 3.97 \cdot 10^5$  PFU/cm<sup>2</sup>

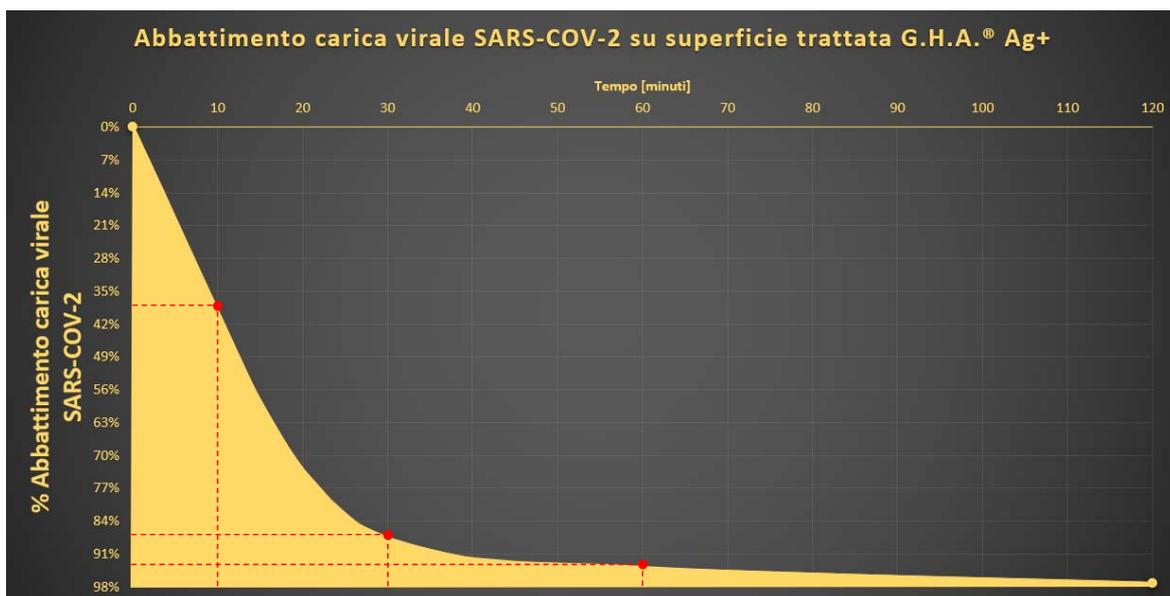
In conclusione, al netto di un naturale decadimento del titolo virale al di fuori dell'ambiente intracellulare, concludiamo che il trattamento del materiale oggetto di studio ha la capacità di abbattere il titolo di SARS-CoV-2 di oltre 1 logaritmo dopo 2 ore di contatto.

Questi valori indicano la carica virale iniziale.

Questi valori indicano la differenza fra la carica virale del campione senza trattamento e quella del campione trattato G.H.A, in percentuale rispetto alla prima, al tempo indicato.

Questi valori indicano il logaritmo in base 10 del rapporto fra la carica virale del campione non trattato e quella del campione trattato G.H.A., al tempo indicato.

Nota: il logaritmo in base 10 di un numero "n" è il numero che messo come esponente su 10 dà come risultato "n".



La grandezza in ordinata nel grafico rappresenta la percentuale di abbattimento della carica virale sul campione trattato G.H.A., espressa in percentuale rispetto alla carica virale iniziale. La curva raffigurata è il valore medio dei risultati dei due esperimenti svolti.