
Dipartimento di Biotecnologie Mediche

**Dott. A. Botarelli
Dott. O. Alessandrini**

BIO MEDICAL PHARMA
Branch of Power Metal Italia Srl
Via Fiorentina, 8 - 59100
Prato (PO) – Italy

RELAZIONE SULL'ATTIVITA' VIRUCIDA LELLO SPRUZZINO

**Eseguito da: Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Biotecnologie Mediche,
Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena**

INTRODUZIONE

Questo studio ha lo scopo di dimostrare l'attività virucida del prodotto Rivestimento TiO_2 e TiO_2 Ag (TiO_2+Ag) nei confronti del virus SARS-Cov-2. I campioni Rivestimento TiO_2 e TiO_2 Ag sono stati messi a contatto in concentrazione del 40% con il virus SARS-Cov-2 a concentrazione nota per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo filtrazione su colonnina Micro-Spin S400 HR, il filtrato è stato utilizzato per infettare le cellule Vero E6 sensibili al virus, secondo UNI EN14476 (luglio 2019).

Identificazione dei campioni:

CAMPIONE 1 (TiO_2)

- numero di lotto: 200709
- conservazione: temperatura ambiente

CAMPIONE 2 (TiO_2 Ag)

- numero di lotto: 200731
- conservazione: temperatura ambiente

LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Dipartimento di Biotecnologie Mediche
Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena
Tel 0577 233866 – Email: microvir@libero.it
microvir.dbm.unisi.it

Dipartimento di Biotecnologie Mediche

TEST CITOTOSSICITA'

Le cellule Vero E6 (ATCC CRL-1586) sensibili al virus sono state inoculate (2×10^5 /ml) in una piastrina a 96 e incubate a 37°C, 5% CO₂.

Dopo 24 ore, i campioni Rivestimento TiO₂ e TiO₂ Ag sono stati diluiti al 40% in terreno D-MEM (SS) e filtrati (100 µl), in una colonnina Micro-Spin S400 HR (2' a 2000 rpm). 100 µl di filtrato sono stati ulteriormente diluiti con 130 µl di D-MEM (SS) (1/2,3).

Quindi, 50µl del prodotto sono stati distribuiti per pozzetto (in quadruplicato) nella piastrina a 96 pozzetti con monostrato di cellule Vero E6, dopo aver tolto terreno di coltura. Successivamente, vengono aggiunti 50 µl di D-MEM (SS) per pozzetto.

La piastrina viene osservata tutti i giorni al microscopio ottico (10x). La lettura finale viene effettuata dopo 3 giorni, per evidenziare eventuale effetto citotossico.

RISULTATI CITOTOSSICITA' CAMPIONE 1:

| CAMPIONE 1 | |
|---|-------------|
| TiO ₂ diluito come descritto | Non Tossico |

RISULTATI CITOTOSSICITA' CAMPIONE 2:

| CAMPIONE 2 | |
|--|-------------|
| TiO ₂ Ag diluito come descritto | Non Tossico |

ATTIVITA' VIRUCIDA

Le cellule Vero E6 (ATCC CRL-1586) sensibili al virus sono state inoculate (2×10^5 /ml) in una piastrina a 96 e incubate a 37°C, 5% CO₂.

Dopo 24 ore, 60 µl di virus SARS-Cov-2 (2×10^6 TICD₅₀/pozzetto) vengono messi a contatto con 40µl di ciascun prodotto per 30 minuti a temperatura ambiente. Per il controllo virus, il prodotto in esame è stato sostituito con il medium di coltura, ed il virus è stato trattato nello stesso modo dei campioni saggiati.

100 µl della sospensione vengono filtrati in una colonnina Micro-Spin S400 HR (2' a 2000 rpm) e diluiti con 130 µl di D-MEM (SS) (1/2,3).

Viene quindi eseguita titolazione del virus dopo trattamento. Vengono distribuiti 50µl delle diluizioni del campione per pozzetto (in quadruplicato) nella piastrina a 96 pozzetti su cui è presente il monostrato di cellule Vero E6, da cui è stato allontanato il terreno di coltura. Successivamente, vengono aggiunti 50 µl di D-MEM (SS) per pozzetto.

La piastrina viene osservata tutti i giorni al microscopio ottico (10x). La lettura finale viene effettuata dopo 3 giorni, alla evidenza di effetto citopatico nel controllo virus. Il titolo virale è stato calcolato in base alla formula di "Reed and Muench" (Reed L.J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938;27:493–497).

Il test è stato eseguito in triplicato in data 09/10/2020, 20/10/2020 e 10/11/2020.

Dipartimento di Biotecnologie Mediche

RISULTATI ATTIVITA' VIRUCIDA

| CAMPIONE 1 | Tempo | Campione virale dopo trattamento | Diluizione 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | Titolo (TCID ₅₀ /ml) |
|------------------|-------|----------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------------|
| TiO ₂ | 30' | +++ | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 75% infettività nel campione iniziale |
| K Virus | 30' | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++- | -- | -- | 2 x 10 ⁶ |

+ = presenza effetto citopatico in ciascun pozzetto analizzato

| CAMPIONE 2 | Tempo | Campione virale dopo trattamento | Diluizione 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | Titolo (TCID ₅₀ /ml) |
|---------------------|-------|----------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------------|
| TiO ₂ Ag | 30' | +++ | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 50% infettività nel campione iniziale |
| K Virus | 30' | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++- | -- | -- | 2 x 10 ⁶ |

+ = presenza effetto citopatico in ciascun pozzetto analizzato

RELAZIONE SULL'ATTIVITA' VIRUCIDA DELLO SPRUZZINO

CONCLUSIONE

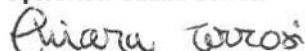
Entrambe i prodotti, Rivestimento TiO₂ e TiO₂ Ag presentano attività virucida verso il virus SARS-Cov-2, come si può evincere dalla tabella. Il trattamento con entrambe i prodotti è risultato efficace contro il virus SARS CoV-2 a partire dalla diluizione 10⁻¹.

Il prodotto viene considerato virucida quando, dopo il tempo di contatto, si osserva nel campione trattato una riduzione del titolo TCID₅₀ di 4 log₁₀ rispetto a quello riscontrato nel controllo virus.

MATERIALI E REAGENTI UTILIZZATI

- Virus Sars-Cov-2 Vero E6 (2) (SARS-CoV-2 Siena-1/2020, Accession no. MT531537) (Stock del 27/07/2020)
- D-MEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco (n. cat. 41965-039, Lotto 2156422, Scad. 2020-12-31)
- FBS (Fetal Bovine Serum) Euroclone (n.cat. ECS0180L, Lotto EUS00AY, Scad.04/2024)
- Incubatore a CO₂ Heraeus (Hera cell240)
- Piastrine 96 pozzetti, Cyto One (n.cat. CC7682-7596, Lotto 1481802)
- Microspin S-400 HR Columns (n.cat.275114001, Lotto 17150989, GE Healthcare) Scad: 1.10.2022

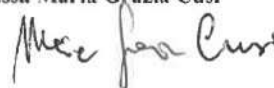
Operatore: Chiara Terrosi



Data 13.11.2020

FIRMA

Prof.ssa Maria Grazia Cusi



LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Dipartimento di Biotecnologie Mediche
Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena
Tel 0577 233866 – Email: microvir@libero.it
microvir.dbm.unisi.it