



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**Relazione finale: Attività antivirale di campioni trattati con “B TITANIA SILVER” e
con PULITORE MULTIUSO “B ZERO”**

Ricercatori:

Prof. Nicoletta Basilico

Prof. Serena Delbue

Dr. Sarah D’Alessandro

Dr. Lucia Signorini

Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche

Prof. Silvia Parapini

Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

Università degli Studi di Milano

Via Carlo Pascal, 36

20133 Milano

Contatti:

nicoletta.basilico@unimi.it

serena.delbue@unimi.it

Data della relazione: 4 Dicembre 2020



RIASSUNTO

L'effetto antivirale di campioni trattati con "B TITANIA SILVER" e con pulitore "B ZERO" è stato verificato contro SARS-CoV-2, responsabile di COVID-19.

Gli esperimenti sono stati effettuati come indicato dalla norma ISO 21702:2019 "Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surface (Misurazione dell'attività antivirale su plastica e altre superfici non porose)"¹ con alcune modifiche.

Nelle condizioni sperimentali utilizzate, sia i campioni trattati con "B TITANIA SILVER" che con pulitore multiuso "B ZERO" hanno mostrato attività antivirale contro SARS-CoV-2.

Nel dettaglio

- 1- il trattamento combinato di "B TITANIA SILVER" e simulazione di 15 pulizie effettuate con il pulitore multiuso "B ZERO" ha mostrato un'efficacia superiore al 99.9 % nella riduzione della carica virale**
- 2- il pulitore multiuso "B ZERO", con trattamento ripetuto, ha mostrato effetto antivirale additivo e cumulativo, raggiungendo, dopo 15 e 30 applicazioni, una riduzione della carica virale rispettivamente del 95% e del 98.4%**

SCOPO

Lo scopo dello studio è stato quello di verificare l'attività antivirale di superfici a bassa porosità. Nello specifico:

- 1- campioni di "gres porcellanato" trattati con il prodotto "B TITANIA SILVER"
- 2- campioni di "gres porcellanato" trattati con il pulitore multiuso "B ZERO" (15 applicazioni del prodotto)
- 3- campioni di "gres porcellanato" trattati con il pulitore multiuso "B ZERO" (30 applicazioni del prodotto)
- 4- campioni di "gres porcellanato" trattati con il prodotto "B TITANIA SILVER" e successivamente con il pulitore multiuso "B ZERO" (15 applicazioni del prodotto)

In breve, SARS-CoV-2 è stato aggiunto ai campioni precedentemente trattati con B TITANIA SILVER e/o pulitore multiuso B ZERO e, dopo 18 ore di contatto, l'infettività residua del virus è stata valutata mediante metodo Plaque Assay.

MATERIALI E METODI

I campioni, il prodotto "B TITANIA SILVER" e il pulitore multiuso "B ZERO" sono stati forniti da Bonasystems Italia srl.

Coltura cellulare

Cellule Vero CCL-81 (cellule epiteliali renali di scimmia) sono state mantenute in coltura, in terreno DMEM, a cui sono stati aggiunti 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato al calore, 2 mM di glutammina, 100 unità/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina.



Isolamento di SARS-CoV-2 da tampone nasofaringeo di paziente COVID-19

SARS-CoV-2 è stato isolato da 500 µl di tampone nasofaringeo, prelevato da paziente con COVID-19, inoculati su cellule Vero all' 80% di confluenza; dopo 3 ore di incubazione a 37 °C con il 5% di CO₂, l'inoculo è stato rimosso e le cellule sono state incubate in terreno per 72 ore, fino allo sviluppo di evidente effetto citopatico (cytopathic effects, CPE).

La quantificazione del numero di copie virali nei sovranatanti è stata effettuata mediante reverse transcriptase-real-time PCR quantitativa (qRT-PCR).² SARS-CoV-2 è stato concentrato con PEG, seguendo le istruzioni del produttore e il titolo virale è stato valutato mediante metodo Plaque assay, usando diluizioni da 10¹ a 10⁹. La sequenza nucleotidica completa del ceppo di SARS-CoV-2 così isolato è stata depositata presso la banca dati Gen Bank, NCBI (numero di registrazione: MT748758)

Preparazione dei campioni

Ogni campione è costituito da un quadrato di (50 ± 2) mm x (50 ± 2) mm.

I campioni (piastrelle "gres porcellanato") sono stati fornite da Bonasystems Italia srl

I campioni trattati con "B TITANIA SILVER" e/o pulitore multiuso "B-ZERO" sono stati preparati in laboratorio.

Il prodotto "B TITANIA SILVER" è stato applicato sul campione con una pipetta Pasteur in modo da coprire tutta la superficie ed è stato fatto essiccare all'aria per 60 minuti.

Il pulitore multiuso "B ZERO" è stato applicato al campione per 15 o 30 volte. L'applicazione ripetuta serve a simulare la pulizia quotidiano con il prodotto, permettendo la valutazione dell'effetto additivo e cumulativo del prodotto.

Prima dell'uso, ogni campione è stato sterilizzato mediante immersione in etanolo al 70%, per eliminare ogni potenziale contaminazione batterica e depositato in una piastra petri.

Procedura del saggio

Un volume di 0.4 ml di sospensione virale (1-5x10⁶ PFU/ml) è stato deposto su 3 campioni trattati e 3 campioni non trattati. L'inoculo virale è stato coperto con una pellicola 40 x 40 mm e i campioni sono stati incubati per 18 ore a 25°C, in condizioni di umidità relativa > 90% e al buio.

Al termine delle 18 ore di contatto 20 ml di brodo SCDLP sono stati aggiunti ai 3 campioni trattati con "B TITANIA SILVER" e ai restanti 3 campioni non trattati ed è stato effettuato il Plaque assay.

Il plaque assay è stato effettuato in piastre da 6 pozzetti, valutando la presenza di virus nel terreno SCDLP recuperato dalle Petri. Per ogni trattamento sono state effettuate 6 diluizioni seriali 1 a 10, in terreno DMEM completo p e 0.4 ml di ogni diluizione sono stati aggiunti, in doppio, al monostrato cellulare. Dopo 2 ore, l'inoculo è stato rimosso, le cellule sono state lavate con 2 ml di terreno DMEM e coperte con agarosio 0.3% sciolto in DMEM. Dopo 72 ore di incubazione a 37 °C con 5% CO₂, le cellule sono state fissate con formaldeide al 4% e, dopo rimozione dello strato di agarosio e opportuni lavaggi, sono state colorate con blu di metilene. Le placche sono state contate e i risultati espressi come Unità Formanti Placca (Plaque Forming Unit, PFU) per ml.

A tempo 0, immediatamente dopo la deposizione del virus, a 3 campioni sono stati aggiunti 20 ml di brodo SCDLP e l'infettività residua è stata valutata mediante Plaque assay.



Citotossicità e sensibilità delle cellule al virus

Per il test di citotossicità, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 1.3×10^4 cellule/pozzetto. Venti ml di brodo SCDLP neutralizzante sono stati aggiunti a 3 campioni "non trattati" e a 3 campioni "trattati" e, immediatamente, 0.1 ml di neutralizzante SCDLP sono stati recuperati e aggiunti in triplicato alle cellule. Dopo 2 ore di incubazione, il neutralizzante SCDLP è stato sostituito con terreno completo e le cellule sono state incubate a 37°C in 5% CO_2 ; la vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio MTT.³

Per la verifica della sensibilità delle cellule al virus, sono stati utilizzati 3 campioni non trattati e 3 campioni trattati. Venti ml di brodo SCDLP sono stati aggiunti ai campioni e 5 ml sono stati prelevati e trasferiti in provette, a cui sono stati aggiunti 50 μl di sospensione virale (4×10^4 PFU / ml). È stato utilizzato anche un controllo negativo, costituito da brodo SCDLP. Dopo 30 minuti, l'infettività virale è stata misurata mediante Plaque assay come precedentemente descritto.

Il titolo virale è stato calcolato utilizzando la seguente formula:

$$S = (2.5 \times P)$$

dove

S è il titolo virale per ml;

P è il conteggio medio delle placche nei pozzetti in duplicato.

Determinazione dell'infettività del virus

Per ogni campione, l'infettività del virus recuperato è stata ottenuta utilizzando la seguente formula:

$$N = (2.5 \times C \times D \times V) / A$$

dove

N è l'infettività del virus recuperato per cm^2 di campione;

C è il numero medio di placche contate nei due pozzetti del duplicato;

D è il fattore di diluizione per i pozzetti contati;

V è il volume del brodo SCDLP aggiunto al campione, in ml;

A è la superficie del film di copertura, in cm^2

Calcolo dell'attività antivirale

L'attività antivirale è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$R = U_t - A_t$$

Dove:

R è l'attività antivirale

U_t è il log medio del numero di placche (in PFU/ cm^2) dei 3 campioni non trattati dopo 18 ore (il contatto della superficie con il virus è stato di 18 ore e non di 24, come indicato dalla norma ISO)

A_t è il log medio del numero di placche (in PFU/ cm^2) dei 3 campioni trattati dopo 18 ore (il contatto della superficie con il virus è stato di 18 ore e non di 24, come indicato dalla norma ISO)



RISULTATI

Di seguito vengono descritti i risultati del test antivirale.

1. Campioni di “gres porcellanato” trattati con il prodotto “B TITANIA SILVER”

Il trattamento con "B TITANIA SILVER" ha determinato una riduzione virale pari a 0.73 log, corrispondente ad una riduzione del 81.5 %.

Tabella 1: Risultati del test antivirale su campioni di “gres porcellanato” trattati con il prodotto “B TITANIA SILVER”

N (PFU/cm2) T=0 U0	N (PFU/cm2) Log N T=18 ore Non trattati Ut	N* (PFU/cm2) Log N T=18 ore Trattati At	R^{&} Attività antivirale Ut-At	% Inibizione virale
3540.3 (2025.7) Log=3.480	641.9 (214.8) Log=2.836	133.7 (45.7) Log=2.102	0.734	81.5 %

* N è l'infettività del virus recuperato per cm² di campione

& R è l'attività antivirale

I dati rappresentano la media e la deviazione standard, tra parentesi, ottenuti da tre campioni

2. Campioni di “gres porcellanato” trattati con il pulitore multiuso “B ZERO” (15 applicazioni del prodotto)

Quindici applicazioni del pulitore multiuso "B ZERO" hanno determinato una riduzione virale pari a 1.304 log, corrispondente ad una riduzione del 95 %.

Tabella 2: Risultati del test antivirale ottenuti su campioni di “gres porcellanato” trattati con il pulitore multiuso “B ZERO” (15 applicazioni del prodotto)

N (PFU/cm2) T=0 U0	N (PFU/cm2) Log N T=18 ore Non trattati Ut	N* (PFU/cm2) Log N T=18 ore Trattati At	R^{&} Attività antivirale Ut-At	% Inibizione virale
8281.2 (662.9) Log=3.917	1048.6 (578.2) Log=2.972	86.71 (43.5) Log=1.668	1.304	95.0 %

* N è l'infettività del virus recuperato per cm² di campione

& R è l'attività antivirale

I dati rappresentano la media e la deviazione standard, tra parentesi, ottenuti da tre campioni distinti



3. Campioni di “gres porcellanato” trattati con il pulitore multiuso “B ZERO” (30 applicazioni del prodotto)

Trenta applicazioni del pulitore multiuso "B ZERO" hanno determinato una riduzione virale pari a 1.955 log, corrispondente ad una riduzione del 98.4 %.

Tabella 3: Risultati del test antivirale ottenuti su campioni di “gres porcellanato” trattati con il pulitore multiuso “B ZERO” (30 applicazioni del prodotto)

N (PFU/cm ²) T=0 U ₀	N (PFU/cm ²) Log N T=18 ore Non trattati U _t	N* (PFU/cm ²) Log N T=18 ore Trattati A _t	R^{&} Attività antivirale U _t -A _t	% Inibizione virale
7812.5 (3314.5) Log=3.872	515.3 (101.6) Log=2.711	6.1 (2.5) Log=0.756	1.955	98.4 %

* N è l'infettività del virus recuperato per cm² di campione

& R è l'attività antivirale

I dati rappresentano la media e la deviazione standard, tra parentesi, ottenuti da tre campioni distinti

4. Campioni di “gres porcellanato” trattati con il prodotto “B TITANIA SILVER” e successivamente con il pulitore multiuso “B ZERO” (15 applicazioni del prodotto)

Il trattamento con "B TITANIA SILVER" associato a 15 applicazioni del pulitore multiuso “B ZERO” ha determinato una riduzione virale maggiore di 3.015 log, corrispondente ad una riduzione superiore al 99.9 %.

Tabella 4: Risultati del test antivirale ottenuti su campioni di “gres porcellanato” trattati con “B TITANIA SILVER” e pulitore “B ZERO” (15 applicazioni del prodotto)

N (PFU/cm ²) T=0 U ₀	N (PFU/cm ²) Log N T=18 ore Non trattati U _t	N* (PFU/cm ²) Log N T=18 ore Trattati A _t	R^{&} Attività antivirale U _t -A _t	% Inibizione virale
17265.6 (10616.2) Log=4.185	515 (101) Log=3.015	0	> 3.015	> 99.9 %

* N è l'infettività del virus recuperato per cm² di campione

& R è l'attività antivirale

I dati rappresentano la media e la deviazione standard, tra parentesi, ottenuti da tre campioni distinti



Controlli: Verifica dell'effetto citotossico e della sensibilità delle cellule al virus

La tabella 5 riassume i risultati della citotossicità e della sensibilità delle cellule al virus. **Il trattamento con "B TITANIA SILVER" non ha indotto citotossicità e non ha ridotto la sensibilità delle cellule al virus.**

Tabella 5: Risultati della citotossicità e della sensibilità delle cellule al virus

	Citotossicità	Sensibilità al virus		
		S (Log PFU/ml)	Criteri di accettazione	Risultato
Controllo negativo	1.03 (0.023)*	2.17		
Non trattati	1.04 (0.028)	2.07	$ S_n - S_u \leq 0.5$	0.10 (≤ 0.5 , accettato)
Trattati con B Titania Silver	1.07 (0.014)	2.04	$ S_n - S_t \leq 0.5$	0.13 (≤ 0.5 , accettato)
Trattati con pulitore B ZERO (15 applicazioni)	0.989 (0.031)	1.91	$ S_n - S_u \leq 0.5$	0.26 (≤ 0.5 , accettato)

*Valori di densità ottica (OD) del test MTT. I dati rappresentano la media e la deviazione standard, tra parentesi, ottenuti da tre campioni.

CONCLUSIONI

Nelle condizioni sperimentali utilizzate, i campioni trattati con "B TITANIA SILVER" e/o pulitore multiuso "B ZERO" hanno mostrato un effetto antivirale contro SARS-CoV-2, dopo 18 ore di contatto.

In dettaglio, la riduzione della replicazione virale, rispetto a i controlli non trattati, è stata pari a:

- **0.734 log** su campioni trattati con "B TITANIA SILVER";
- **1.304 log** su campioni trattati con 15 applicazioni di pulitore multiuso "B ZERO";
- **1.955 log** su campioni trattati con 30 applicazioni di pulitore multiuso "B ZERO";
- **> 3 log** su campioni trattati con "B TITANIA SILVER" associato a 15 applicazioni di pulitore multiuso "B ZERO".



REFERENZE

1. ISO 21702:2019(E) “Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surface”. First edition 2019-05. Published in Switzerland
2. World Health Organization, WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. US CDC Real-time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus (28 January 2020). Available at: <https://www.fda.gov/media/134922/download> [last access 20 March 2020].
3. D’Alessandro, M. Gelati, N. Basilico, E.A. Parati, R.K. Haynes, D. Taramelli, Differential effects on angiogenesis of two antimalarial compounds, dihydroartemisinin and artemisone: Implications for embryotoxicity, *Toxicology*. 241 (2007) 66–74. doi:10.1016/j.tox.2007.08.084.