



Ospedale
San Raffaele

N·A·N·O HUB

**Inattivazione
del Severe Acute
Respiratory Syndrome
Coronavirus 2 (Sars-CoV-2)
dopo trattamento
con filtro NanoHub**

OBIETTIVI DEL TEST E REALIZZAZIONE

- Fase 1: Verifica inattivazione dell'infettività di SARS-CoV-2 dopo il trattamento con 4 tempi (10,20,30 e 60 minuti) con il sistema di filtrazione predisposto da NanoHub.
- Fase 2: Quantificazione dell'RNA Virale.

Di seguito sono riportati i dati del test, "fase 1" effettuato presso l'Ospedale San Raffaele - Unità di Patogenesi Virale e Biosicurezza (d.ssa Elisa Vicenzi e d.ssa Silvia Ghezzi).

TECNOLOGIA DI FILTRAZIONE

Nanohub ha realizzato un dispositivo con il filtro sviluppato (e brevettato) con cui è stato possibile realizzare il test in soluzione liquida ed effettuare i prelievi secondo le modalità di esecuzione prevista dal test.

Il sistema di filtrazione è composto da un reattore fotocatalitico a rete metallica su cui è stato deposto un fotocatalizzatore a base di triossido di tungsteno (WO_3) e da un filtro in tessuto parte integrante del brevetto.

Filtro oggetto della domanda di brevetto n. 102020000013921

MODALITÀ DI ESECUZIONE DEL TEST

Lo stock virale di SARS-CoV-2, ottenuto dall'isolamento da tampone faringeo di paziente COVID-19 in cellule Vero, è stato diluito 1:100 in EMEM integrato con siero fetale al 1% (v/v), in modo da ottenere una sospensione virale contenente 1.7×10^4 unità infettanti per ml di sospensione.

La sospensione virale è stata introdotta nel dispositivo dall'ingresso superiore e a tempi progressivi da 10 minuti a 1 ora. La sospensione virale è stata raccolta e testata per presenza di unità virali infettanti mediante il test delle placche in cellule Vero.

Le cellule Vero sono state piastrate alla concentrazione di $7,5 \times 10^5$ /ml in piastre da 6 pozzetti, in presenza di in EMEM integrato con siero fetale al 10% (v/v). Ventiquattro ore dopo, le cellule sono state infettate con il virus raccolto ai diversi tempi dal dispositivo di inattivazione. Diluizioni seriali 1:10 (dal non diluito ad una diluizione 10^{-5}) del virus raccolto ai diversi tempi sono state testate in duplicato.

MODALITÀ DI ESECUZIONE DEL TEST

Dopo un'incubazione di 1 ora a 37°C, i surnatanti sono stati eliminati e sono stati aggiunti 500µl di metilcellulosa all'1% (p/v) a ciascun pozzetto in terreno completo. Dopo 3 giorni le cellule sono state fissate utilizzando formaldeide al 6% (v/v), soluzione salina, tamponate con fosfato e colorate con 1% (p/v) cristal violetto in metanolo al 70% (v/v).

Le placche sono state contate al microscopio stereoscopico (SMZ-1500, Nikon).

Il calcolo del titolo virale espresso in plaque forming unit (PFU)/ml è stato calcolato contando le placche nei pozzetti in cui il numero era inferiore a 100 e il valore è stato moltiplicato per il fattore di diluizione corrispondente.

DATI TEST - 1

INOCULO		
	TEST	COPIA
Non diluito	incontabili	incontabili
10 - 1	incontabili	incontabili
10 - 2	incontabili	103
10 - 3	13	18
10 - 4	5	0
10 - 5	0	0

10 MINUTI		
	TEST	COPIA
Non diluito	staccate	staccate
10 - 1	28	27
10 - 2	3	3
10 - 3	0	0
10 - 4	0	0
10 - 5	0	0

20 MINUTI		
	TEST	COPIA
Non diluito	3	staccate
10 - 1	3	3
10 - 2	0	0
10 - 3	0	0
10 - 4	0	0
10 - 5	0	0

DATI TEST - 2

30 MINUTI		
	TEST	COPIA
Non diluito	0	0
10 - 1	0	0
10 - 2	0	0
10 - 3	0	0
10 - 4	0	0
10 - 5	0	0

60 MINUTI		
	TEST	COPIA
Non diluito	0	0
10 - 1	0	0
10 - 2	0	0

PULIZIA*		
	TEST	COPIA
Non diluito	0	0
10 - 1	0	0
10 - 2	0	0

*Dopo 60 min di trattamento del virus, il dispositivo è svuotato e vengono introdotti 75 ml di terreno. La soluzione viene raccolta dopo 30 min e testata per presenza di virus con il test delle placche.

DATI / OSSERVAZIONI

I dati di un esperimento rappresentativo di 3 (in duplicato) sono mostrati nel grafico a fianco.

Dai dati si evidenzia che in **10 minuti è stata inattivata la carica virale infettiva del SARS-CoV-2 di oltre il 98,2%**; a 20 minuti di oltre il 99,8%. **Dopo 30 minuti il virus è stato completamente inattivato.**

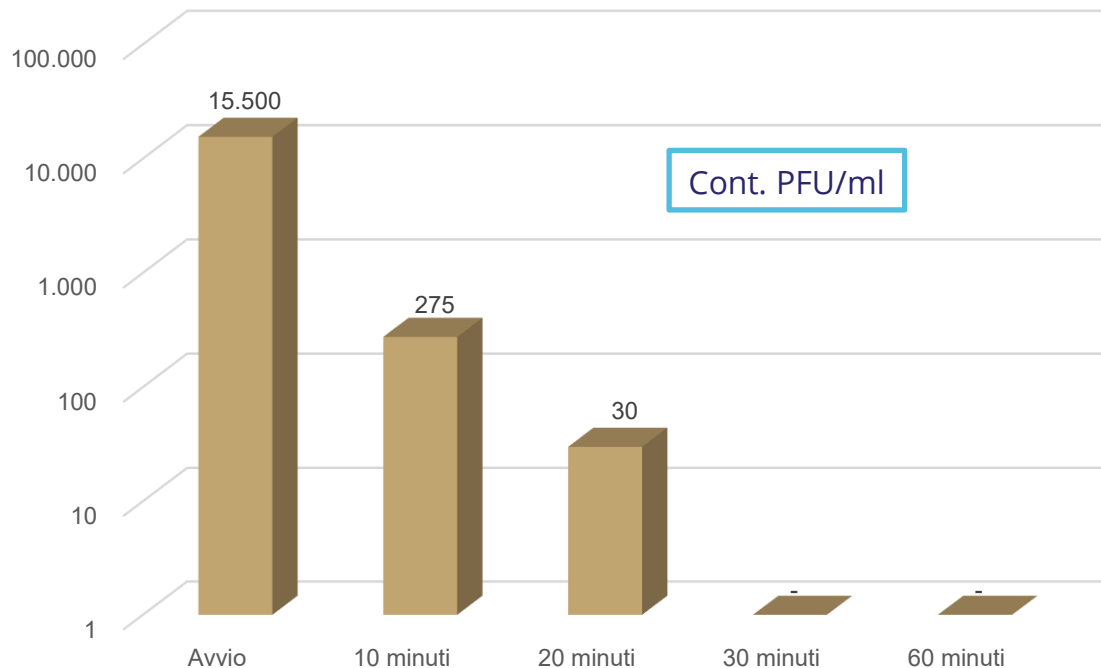
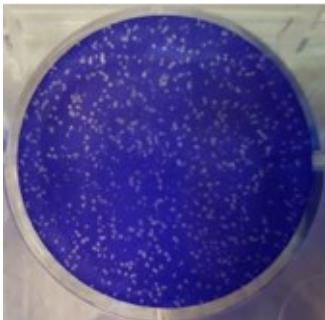
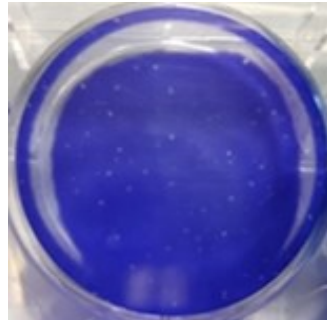


FOTO DELLE PLACCHE – ESPERIMENTO

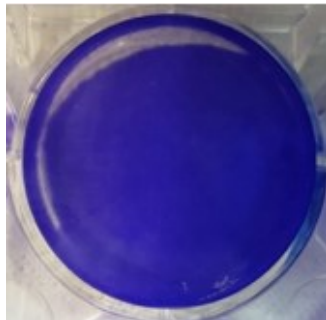
AVVIO



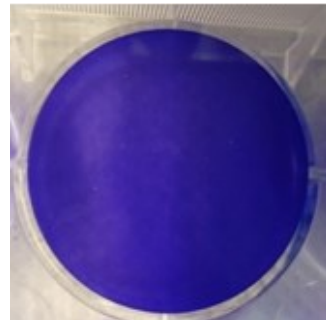
10 MINUTI



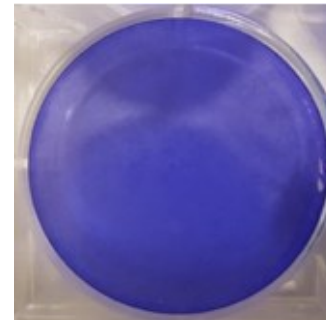
20 MINUTI



30 MINUTI



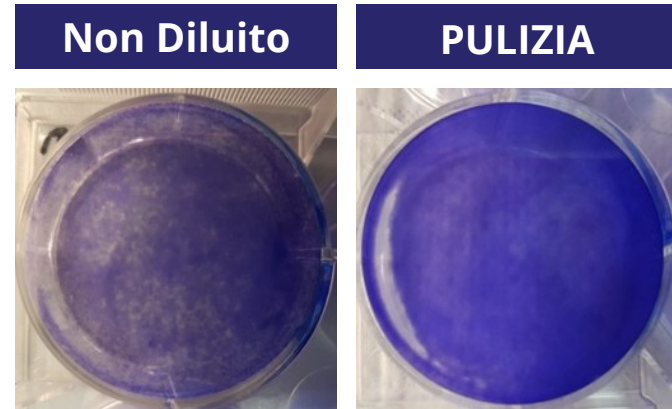
60 MINUTI



TOSSICITÀ DELLA SOLUZIONE NON DILUITA

L'evidenza della tossicità sulle cellule della soluzione non diluita è determinata dalle alte concentrazioni di ossidril, perossido e radicali liberi dell'ossigeno (ROS) prodotti dal reattore fotocatalitico. Tale evidenza è prova dell'efficacia del reattore fotocatalitico.

La soluzione di pulizia del dispositivo non ha evidenziato presenza di unità di virus infettanti a dimostrazione della completa inattivazione del virus.



CONCLUSIONI

Nella applicazione pratica della tecnologia di sanificazione dell'aria negli ambienti indoor tutte le reazioni si generano sul filtro e solo le sostanze presenti in aria, compresi i virus, vengono distrutte e/o inattivate, mentre nessun danno è prodotto per le persone presenti nell'ambiente.

The image features a stylized background of light blue curved lines with scattered blue and brown dots. A white circle with a black outline contains the text 'N·A·N·O HUB'. A dark blue circle overlaps the bottom right of the white circle, containing contact information.

N·A·N·O HUB

Via Cosenz 35, 20158 - Milano (Mi)
Tel. 0331-1930704 / Fax 0331-1930705
P. I. 10417700969
Iscritta alla CCIAA di Milano
n. REA MI 2529785
Capitale sociale € 1.000.000,00 i.v.