

## ATTESTATO SULL'EFFICACIA DELLA TECNOLOGIA AIRLITE NELLA NEUTRALIZZAZIONE DEL SARS-COV2

### Premessa

Un test preliminare è stato condotto presso il Dipartimento Scientifico del Policlinico Militare di Roma "Celio", sotto la direzione del Generale Nicola Sebastiani, Ispettore Generale della Sanità Militare presso lo Stato Maggiore della Difesa e del Generale Florigio Lista, Responsabile Scientifico del Dipartimento, nell'ambito di progetti tesi a contrastare la pandemia di SARS-CoV2.

Per la realizzazione del test è stato utilizzato un ceppo virale di SARS-CoV2 isolato da un tampone nasofaringeo.

Per l'esecuzione del test sono stati allestiti appositi vetrini con la superficie ricoperta dal prodotto da testare e vetrini di controllo, esposti ad una lampada UVA (Osram Vitalux 300) per 1h e sui quali è stata dispensata una sospensione a concentrazione predeterminata di un ceppo di SARS-CoV2 per un tempo di 15 minuti.

### Risultati

Il saggio delle placche ha mostrato una significativa riduzione del numero delle placche nei campioni posti a contatto con Airlite rispetto al controllo. L'aggiunta del plastificante alla composizione dell'Airlite, richiesta per testare il prodotto, probabilmente ne riduce l'azione virucida poiché si osserva un aumento del numero delle placche all'aumentare della percentuale del plastificante.

	A	V	C
Pfu / Pozzetto	4	36	36,6
% di inattivazione	89,0 %	1,6 %	-

### Legenda

A: vetrino ricoperto con Airlite e 4% di plastificante

V: vetrino ricoperto con pittura tradizionale

C: vetrino senza aggiunta di nessun prodotto.

### Conclusioni

I dati ottenuti da questo primo test indicano una riduzione del 89,0 % del numero delle unità formanti placca del surtante virale posto a contatto con il vetrino ricoperto con Airlite addizionato con un 4% di plastificante, previa esposizione a lampada UVA, rispetto al controllo positivo. Si presume che il prodotto tal quale, abbia un'attività di riduzione del virus maggiore di quella riscontrata.

Roma, 21 luglio 2021



L'Ispettore Generale della Sanità Militare  
Ten.Gen. Nicola Sebastiani

Il Capo Dipartimento scientifico  
Brig. Gen. Florigio Lista

## DESCRIZIONE DEI TEST

Per la realizzazione del test è stato utilizzato un ceppo virale di SARS-CoV2 isolato da un tampone nasofaringeo.

Prima dell'esperimento i vetrini sono stati esposti alla lampada Osram Vitalux 300 per 1h al fine di preparare l'ambiente dell'esperimento. Successivamente le sospensioni virali sono state recuperate e titolate mediante il metodo delle placche. Sono inoltre stati effettuati controlli di citotossicità che sono risultati negativi.

Il virus è stato successivamente propagato in cellule Vero E6, adatte alla crescita del virus, allo scopo di produrre uno stock virale da utilizzare per gli esperimenti. Il terreno utilizzato per la crescita cellulare è MEM 1x addizionato al 10% con siero fetale bovino. Per la propagazione virale sono state infettate colture di cellule Vero E6, fatte crescere in fiasche T25, con una diluizione del ceppo virale diluito in terreno MEM senza siero. L'infezione è stata condotta a 37°C e dopo un'ora sono stati aggiunti 5 ml di terreno MEM con siero fetale bovino (FBS) 2%. L'infezione viene protratta finché è possibile osservare un esteso effetto citopatico (ECP) in circa il 90% del totale delle cellule. Al termine le cellule sono state raccolte e centrifugate per 5 minuti a 3000 rpm a 4°C per eliminare i residui cellulari. Il surnatante così ottenuto è stato quindi titolato.

La titolazione del virus viene effettuata con il metodo delle placche utilizzando una piastra da 12 pozzetti ed utilizzando per l'infezione diluizioni 1/10 del ceppo virale in triplicato. Dopo 1h si aggiunge il terreno d'infezione contenente Tragacanth e si incuba per 5 giorni a 37°C. Al termine del periodo si asporta il terreno d'infezione, si colora e si procede al conteggio delle placche

### Allestimento del test

La natura porosa del prodotto Airlite non consente il recupero diretto della sospensione virale, al contrario dei controlli negativi rappresentati dal solo vetrino o da vetrini ricoperti con vernice.

Pertanto, per normalizzare il test, sono stati allestiti tre differenti preparati Airlite contenenti plastificante in concentrazione del 4, 16 e 24% e indicati rispettivamente come A1, A2 e A3. I test di controllo sono rappresentati da un vetrino coperto da uno strato di una pittura commerciale bianca, indicato come V e da un vetrino indicato come C+.

Per escludere possibili effetti citotossici dei vetrini da utilizzare nei test, abbiamo posto a contatto delle superfici delle differenti tipologie di vetrino il terreno MEM per un tempo di 30'. Successivamente abbiamo inoculato questo terreno nel monostrato cellulare di uno dei pozzetti del vassoio utilizzato per la titolazione del virus con il metodo delle placche.

### Esecuzione del test

L'esperimento è stato condotto nel Laboratorio di Biosicurezza di Livello 3 (BSL3) presente all'interno del Dipartimento Scientifico Celio. I singoli vetrini sono stati esposti ad una lampada UVA (Osram Vitalux 300) per 1h ad una distanza di 50 cm. Successivamente, dopo avere fatto raffreddare i vetrini per 10', si è proceduto a pipettare su ciascuna superficie un volume di 300µl di una sospensione di SARS-Cov2 con una concentrazione pari a  $2 \times 10^3$  pfu/ml. Ogni vetrino è stato quindi protetto con coperchio ed incubato per 15 minuti.

La temperatura e l'umidità all'interno della camera erano mantenute all'interno di uno stretto range, rispettivamente di  $20 \pm 4^\circ\text{C}$  e  $19 \pm 5\%$ . Al termine del periodo d'incubazione sono stati prelevati i surnatanti da ogni vetrino e si sono effettuate due diluizioni seriali 1/10.

Ogni diluizione è stata quindi inoculata in triplicato su un monostrato di cellule Vero E6 in una piastra da 12 pozzetti. Dopo 5 giorni, i pozzetti sono stati lavati con soluzione fisiologica e colorati con una soluzione di cristal violetto, dopodiché si è proceduto al conteggio delle unità formanti placca (PFU). L'attività antivirale viene calcolata come  $(100-NA/NO \times 100)$  dove NA è il numero di placche del campione sul vetrino ricoperto di vernice o del prodotto Airlite e NO è il conto delle placche del vetrino senza prodotto.

### Risultati

Il saggio delle placche ha mostrato una significativa riduzione del numero delle placche nei campioni posti a contatto con Airlite rispetto al controllo. L'aggiunta del plastificante alla composizione dell'Airlite, richiesta per testare il prodotto, probabilmente ne riduce l'azione virucida poiché si osserva un aumento del numero delle placche all'aumentare della percentuale del plastificante.

	A	V	C
<b>Pfu / Pozzetto</b>	4	36	36,6
<b>% di inattivazione</b>	89,0 %	1,6 %	-

### Legenda

A: vetrino ricoperto con Airlite e 4% di plastificante

V: vetrino ricoperto con pittura tradizionale

C: vetrino senza aggiunta di nessun prodotto.

### Conclusioni

I dati ottenuti indicano una riduzione del 89,0 % del numero delle unità formanti placca del surnatante virale posto a contatto con il vetrino ricoperto con Airlite addizionato con un 4% di plastificante rispetto al controllo positivo. Si presume che il prodotto tal quale, abbia un'attività di riduzione del virus maggiore di quella riscontrata.