

Milano, 09/07/2020

## Report dell'Attività

### QUANTIFICAZIONE DEL SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2 (SARS-COV-2) DOPO TRATTAMENTO CON FOTOCATALIZZATORE A BASE DI TRIOSSIDO DI TUNGSTENO ( $WO_3$ )

#### Laboratorio

Patogenesi Virale e Biosicurezza

Ospedale San Raffaele, Milano

#### Responsabile

Elisa Vicenzi, PhD

Lo scopo di questo studio è stato di valutare l'utilizzo di un fotocatalizzatore a base di  $WO_3$  nella inibizione del virus SARS-CoV-2. Il fotocatalizzatore è stato deposto su un filtro composto da una rete metallica al fine di permettere la realizzazione del test in fase liquida. E' stato altresì aggiunto, in modalità per cui sarà possibile valutare l'effetto separato, un tessuto di cotone che è stato impregnato di una soluzione a base di nanocluster metallici (CuNh) di rame (sospensioni colloidali). Il tessuto di cotone impregnato della soluzione di rame, in alcune applicazioni di trattamento dell'aria, viene abbinato al filtro metallico su cui è depositato il fotocatalizzatore per aumentare gli effetti di abbattimento di alcuni microorganismi ed in particolare per i virus.

Tre dispositivi sono stati forniti al laboratorio di Patogenesi Virale e Biosicurezza dell'Ospedale San Raffaele da NANOHUB. Il ceppo virale SARS-CoV-2, ottenuto dall'isolamento da tampone faringeo di paziente COVID-19 in cellule Vero<sup>1</sup>, è stato inoculato in ciascun dispositivo appositamente disegnato dal committente.

Lo stock virale è stato diluito 1:100 al fine di ottenere 80 ml di inoculo contenente un titolo infettante teorico di  $2,2 \times 10^5$  plaque forming unit (PFU) /ml. La sospensione virale è stata introdotta nel dispositivo e aliquote di essa sono state raccolte a tempi progressivi da 10 minuti a 1 ora. La sospensione virale raccolta è stata testata per presenza di unità virali infettanti mediante il test delle placche e quantificazione dell'RNA virale.

Le cellule Vero sono state piastrate a  $2,5 \times 10^5$  cellule per pozzetto in piastre da 24 pozzetti, in presenza di terreno di cultura EMEM integrato con siero fetale al 10% (v/v) (terreno completo). 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 dopo 10, 15, 20, 30, 60 minuti dall'attivazione del sistema sono state testate in duplicato.

Dopo un'incubazione di 1 ora a 37°C, i surnatanti sono stati eliminati e sono stati aggiunti 500 µl 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.

Il materiale raccolto è stato testato per:

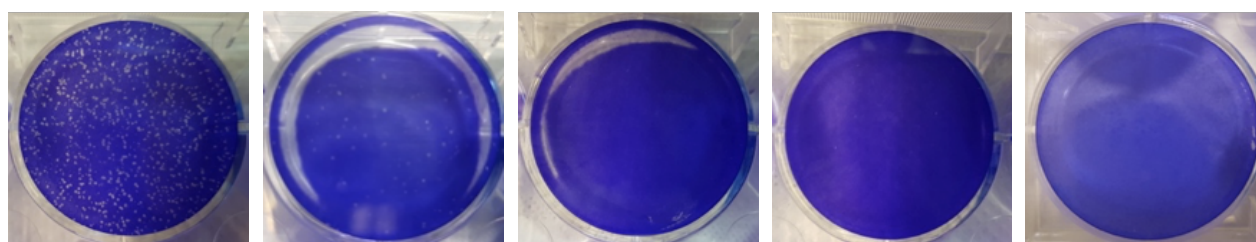
1. Abbattimento della carica virale infettante attraverso un dosaggio di placche in cellule Vero.
2. Quantificazione del genoma di SARS-CoV-2 mediante PCR in real time.

1. I risultati dell'infettività virale espressi in PFU/ml sono riassunti nella seguente tabella:

Tempo (minuti)	Esperimento 1	Esperimento 2	Esperimento 3
0	12.200	13.766	11.683
10	ND	283	30
15	2000	ND	ND
20	ND	30	30
30	0	0	0
60	0	0	0

I risultati sono la media dei valori ottenuti dalla diluzione dell'inoculo virale nel plaque assay moltiplicato per il fattore di diluizione utilizzato.

Avvio                      10 min                      20 min                      30 min                      60 min



Fotografia che rappresenta la presenza delle placche all'avvio e ai tempi successivi come descritto sopra.

## 2. Quantificazione del genoma di SARS-CoV-2 mediante PCR in real time

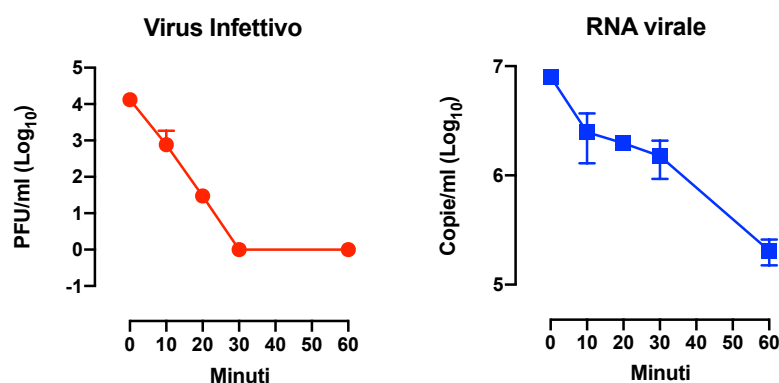
Il materiale raccolto ai diversi tempi è stato sottoposto ad estrazione dell'RNA virale a cui è seguita una PCR in real-time per determinare la quantità di RNA virale presente dopo inattivazione. La quantificazione dell'RNA è stata eseguita con il Kit Quany COVID-19 della Clonit (Milano) che include una curva standard di riferimento di RNA virale a numero di copie note. Il gene amplificato dal sistema è quello del nucleocapside (N).

Tempo (minuti)	Esperimento 1	Esperimento 2	Esperimento 3
0	7.253.850	8.718.142	10.909.490
10	ND	3.337.014	5.400.451
15	1.641.266	ND	ND
20	ND	1.972.495	4.433.552
30	1.910.394	1.097.204	2.783.446
60	165.987	243.029	669.995

I risultati sono espressi in numero di copie di RNA virale/ml.

### Figura riassuntiva

Il pannello a sinistra mostra il time course d'inattivazione dell'infettività virale misurata nel dosaggio delle placche (dati riportati in PFU/ml) mentre il pannello di destra mostra il time course dell'inattivazione dell'RNA virale misurato con PCR quantitativa in real time.



## Riassunto e Conclusioni

Il dispositivo NANOHUB è in grado d'inattivare la carica infettante di SARS-CoV-2 in tempi molto rapidi. A 10 minuti post-trattamento, si osserva una riduzione della carica infettante del 98.2% per arrivare al 100% dopo appena 30 minuti.

Abbiamo inoltre misurato la quantità di RNA virale presente nell'inoculo mediante PCR real time. La misura dell'RNA virale nell'inoculo è più elevata rispetto alla carica infettante in un rapporto 1000:1, ossia sono necessarie 1000 molecole di RNA virale per ottenere 1 particella infettante. Questi dati confermano quanto precedentemente osservato per SARS-CoV<sup>2,3</sup> e sono spiegati dalla presenza di virioni difettivi che contengono RNA ma che non sono infettivi. Tuttavia, il dispositivo NANOHUB è in grado di ridurre la quantità di RNA di circa 1,5 logaritmi in base 10, suggerendo che la fotocatalisi altera l'integrità del virione anche nella sua componente genomica sebbene meno efficientemente rispetto all'infettività.

## Referenze

1. Mycroft-West CJ, Su D, Pagani I, et al. Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the surface protein (spike) S1 receptor binding domain with heparin. *bioRxiv* 2020.
2. Vicenzi E, Canducci F, Pinna D, et al. Coronaviridae and SARS-associated coronavirus strain HSR1. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**(3): 413-8.
3. Pacciarini F, Ghezzi S, Canducci F, et al. Persistent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in human tubular kidney cells selects for adaptive mutations in the membrane protein. *J Virol* 2008; **82**(11): 5137-44.

Dr. Elisa Vicenzi



Capo dell'Unità di Patogenesi Virale e Biosicurezza