



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SANITÀ PUBBLICA E PEDIATRICHE
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH AND PEDIATRIC SCIENCES

DIRETTORE: PROF. ANNA MARIA CUFFINI
Piazza Polonia, 94 – 10126 Torino (Italia)
Codice Fiscale 80088230018 – P.IVA IT02099550010

Valutazione dell'attività antivirale del nebbiogeno
SanitySan-SanityFog

1. STATO DELL'ARTE E SCOPO DEL PROGETTO

Scopo dell'attività è stato valutare la replicazione virale in seguito a trattamento con nebbiogeno SanitySan-SanityFog. Come modello virale è stato utilizzato il Coronavirus umano OC43 (HCoV-OC43). HCoV-OC43 presenta una diffusione ubiquitaria, un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva (ssRNA+), dotato di un rivestimento proteico (capside) e di un ulteriore doppio strato fosfolipidico esterno (pericapside).

HCoV-OC43 è stato scelto come prototipo dei Betacoronavirus umani, sottofamiglia a cui appartiene anche il virus Sars-CoV-2, responsabile dell'attuale pandemia. E' disponibile sul mercato e abitualmente utilizzato come modello di infezione *in vitro*, sicuro ed efficace, in alternativa al più pericoloso virus wild-type, per test di screening di molecole o dispositivi ad attività antivirale.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparazione dello stock virale

Lo stock di HCoV-OC43 (ATCC® VR-1558), impiegato per gli esperimenti, è stato preparato infettando cellule MRC-5 (linea di fibroblasti di origine polmonare, ATCC® CCL-171), cresciute in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), a 33°C. Dopo la comparsa di un effetto citopatico completo, le cellule e i surnatanti sono stati raccolti e lisati con tre cicli di congelamento-scongelo (azoto/37°C). I virus sono stati aliquotati e conservati a -80°C.

2.2. Campioni sperimentali

Per i saggi di attività antivirale è stato utilizzato il nebbiogeno SanitySan-SanityFog.

500 µl di inoculo virale è stato posto su piastra da 24 pozzetti ed esposto alla nebulizzazione per 10 o 30 minuti e raccolto 10 o 30 minuti dopo lo spegnimento dello strumento.

I campioni sono stati raccolti e sono stati utilizzati 50 µl di campione per la determinazione del titolo virale mediante saggio standard di formazione delle placche. In parallelo, come controlli, sono stati utilizzati gli stessi campioni, non sottoposti al trattamento.

2.3. Saggio standard di formazione delle placche

La titolazione di HCoV-OC43 è stata eseguita con il metodo standard di formazione delle placche su cellule MRC-5, in piastre a 96 pozzetti. La sospensione virale è stata serialmente diluita (da 10^{-1} a 10^{-10}) in terreno DMEM, addizionato con il 10% di FBS e inoculata, 100 µl per pozzetto; le infezioni sono state effettuate a 33°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, le piastre sono state fissate con una soluzione costituita da acetone:metanolo=50:50 (v/v) e sottoposte alla tecnica immunoenzimatica streptavidina-perossidasi, che permette la rilevazione dell'antigene virale nucleoproteina (N). A tale scopo è stato utilizzato l'anticorpo primario diretto verso la proteina N di HCoV-OC43 (clone 541-8F, MAB9012, Sigma-Aldrich), seguita dall'applicazione del kit "VECTASTAIN® Universal Quick HRP" (Vector Laboratories). Il titolo virale è stato calcolato come unità formanti placche ("Plaque Forming Units", PFU) per mL.

$$\text{Titolo virale (PFU/mL)} = \text{numero di placche} * 0.1 \text{ mL} / \text{fattore di diluizione}$$

3. RISULTATI

3.1. Analisi della replicazione di HCoV-OC43 in seguito al trattamento con il nebbiogeno SanitySan-SanityFog.

Per determinare l'attività antivirale nebbiogeno SanitySan-SanityFog, sono stati analizzati 50 µl di campione contenente HCoV-OC43, ottenuto dopo 5 o 10 minuti di trattamento, mediante saggio standard di formazione delle placche, realizzato come descritto nella sezione 2.3. In **Figura 1** sono riportati i risultati (PFU/mL) della media di due esperimenti.

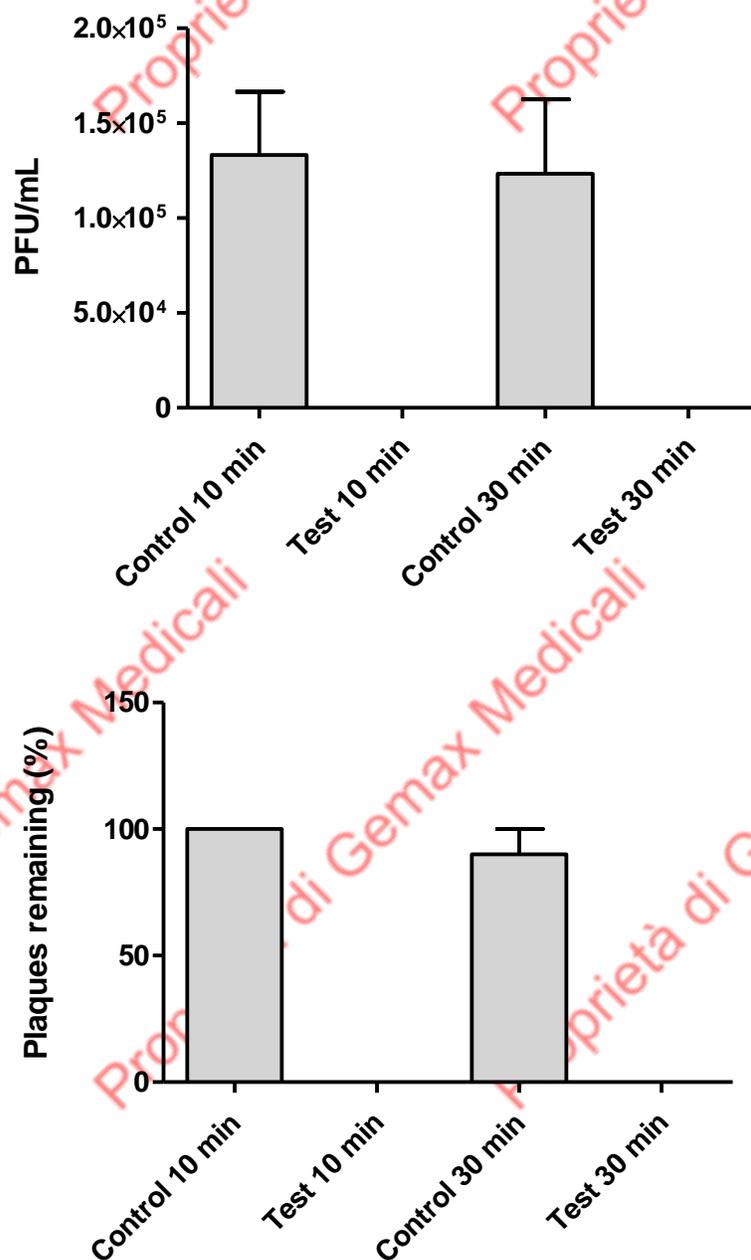


Figura 1. Saggio standard di formazione delle placche per la determinazione dell'attività antivirale del nebbiogeno SanitySan-SanityFog, dopo 10 o 30 minuti di trattamento. HCoV-OC43 (500 μ l) è stato esposto al trattamento ("Test") e il virus non trattato (denominato "Control") è stato usato come controllo positivo. Le placche di infezione sono state contate al microscopio e il valore medio espresso come "plaque forming unit"/mL (PFU/mL), grafico in alto, oppure come percentuale di placche residue, grafico in basso.

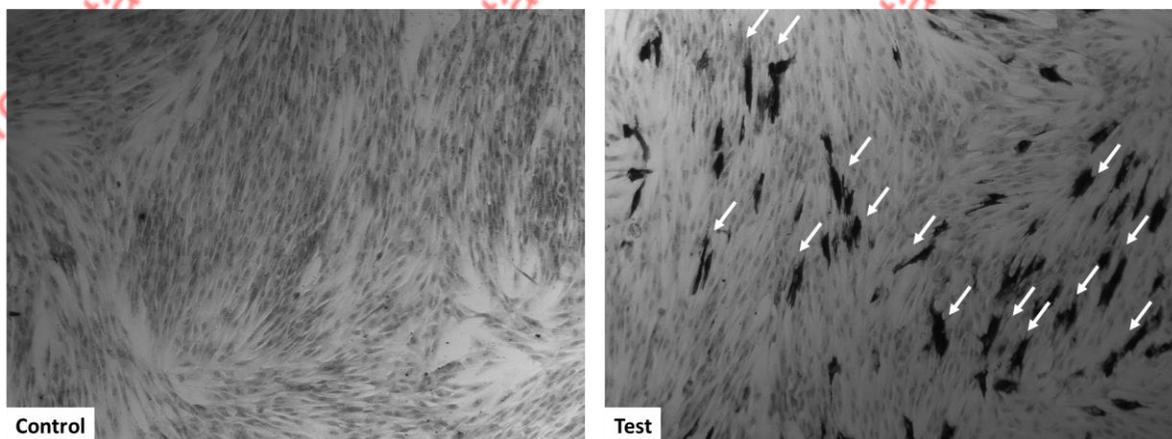


Figura 2. Immagini rappresentative del saggio standard di formazione delle placche. I campioni (Control e Test) sono stati trattati come descritto in Figura 1 e nella sezione Metodologia, poi fissati e processati con la tecnica immunoenzimatica streptavidina-perossidasi. Zone esemplificative di positività alla reazione, corrispondenti alla proteina N di HCoV-OC43, sono indicate dalla frecce.

4. Conclusioni

L'attività antivirale del nebbiogeno SanitySan-SanityFog è stata determinata verso HCoV-OC43, utilizzando il saggio standard di formazione delle placche, seguito dal saggio immunoenzimatico streptavidina-perossidasi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato, dopo 10 minuti di esposizione, la capacità del nebbiogeno di inibire la replicazione di HCoV-OC43 (oltre il 90% rispetto al controllo non trattato).