

Dipartimento di Biotecnologie Mediche

F.LLI RAZETO E CASARETO

Via Caorsi 38

16031 - Sori (Genova)

RELAZIONE SULL'ATTIVITA' VIRUCIDA PLACCHE F.LLI RAZETO E CASARETO

Eseguito da: Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Biotecnologie Mediche,

Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena

INTRODUZIONE

Questo studio ha lo scopo di dimostrare l'attività virucida delle placche sottoposte a trattamento ESI A e ESI B prodotte dalla ditta F.lli Razeto e Casareto nei confronti del virus SARS-Cov-2. Le placche sono state messe a contatto con il virus SARS-Cov-2 (a concentrazione nota) per 15 minuti o 1 ora, a temperatura ambiente. Il virus trattato è stato utilizzato per infettare le cellule Vero E6 sensibili al virus.

LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Dipartimento di Biotecnologie Mediche
Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena
Tel 0577 233866 – Email: microvir@libero.it
microvir.dbm.unisi.it

Dipartimento di Biotecnologie Mediche

PRE-TRATTAMENTO PLACCHE

Le placche in studio e le placche di controllo sono state trattate, come da accordi, con carta vetrata a grana di 320. Sono state quindi lasciate per 2 ore sotto raggi UV per sterilizzazione. Tutti i processi sono stati svolti in 2 stanze separate in modo che le placche trattate e di controllo non interagissero tra loro.

ATTIVITA' VIRUCIDA

Le cellule Vero E6 (ATCC CRL-1586) sensibili al virus sono state inoculate (2×10^5 /ml) in una piastrina a 96 pozzetti e incubate a 37°C, 5% CO₂.

Dopo 24 ore, 200 µl di virus SARS-Cov-2 (4.3×10^8 TCID₅₀/ml) sono stati messi a contatto con le placche cercando di distribuire il virus uniformemente sulla superficie per 15 minuti o 1 ora, a temperatura ambiente.

Il virus è stato quindi raccolto e le placche sono state lavate per 2 volte con 500 µl di D-MEM (SS). La sospensione virale è stata centrifugata per 1 minuto a 5000 g per eliminare i detriti di placca scartavetrata.

E' stata eseguita quindi la titolazione del virus, per verificarne la presenza, dopo trattamento. Sono stati distribuiti 100µl del campione (diluizioni in base 10) per pozzetto (in quadruplicato) nella piastrina a 96 pozzetti, su cui era presente il monostrato di cellule Vero E6, da cui è stato allontanato il terreno di coltura.

La piastrina è stata osservata tutti i giorni al microscopio ottico (10x). La lettura finale è stata effettuata dopo 3 giorni, alla evidenza di effetto citopatico nel controllo virus. Il titolo virale è stato calcolato in base alla formula di "Reed and Muench" (Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938;27:493-497) TCID₅₀/ml e in Unità Formanti Placche (PFU).

Il test è stato eseguito in duplicato in data 03/05/2022 e 13/05/2022.

RISULTATI ATTIVITA' VIRUCIDA

	Tempo di contatto	Diluizione virus 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Titolo (TCID ₅₀ /ml)	Titolo (PFU/cm ²)
Placche trattate	15'	++++	++++	++++	++++	+++	----	----	2×10^6	56000
Placche non trattate	15'	++++	++++	++++	++++	+++	+++	----	3.4×10^6	95200
Placche trattate	1 h	++++	++++	++++	----	----	----	----	6.3×10^4	1764
Placche non trattate	1 h	++++	++++	++++	++++	+++	----	----	2×10^6	56000

+ = presenza effetto citopatico in ciascun pozzetto analizzato

LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Dipartimento di Biotecnologie Mediche
Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena
Tel 0577 233866 – Email: microvir@libero.it
microvir.dbm.unisi.it



UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240



Dipartimento di Biotecnologie Mediche

CONCLUSIONE

Le placche sottoposte a trattamento ESI A e ESI B prodotte dalla ditta F.lli Razeto e Casareto, in base al calcolo dell'attività antivirale che utilizza il valore R riportato nell'ISO 21702:2019, non presentano attività virucida verso il virus SARS-Cov-2 dopo 15' di contatto

(R = 0.23), ma presentano una riduzione del 90% del titolo virale rispetto al controllo placche non trattate, dopo contatto per 1 h (R = 1.5).

$R = \log_{10} \text{Placche non trattate (PFU/cm}^2) - \log_{10} \text{Placche trattate (PFU/cm}^2)$

R di 1 = riduzione del 90% di virus

R di 2 = riduzione del 99% di virus

R di 3 = riduzione del 99.9% di virus

MATERIALI E REAGENTI UTILIZZATI

- Virus Sars-Cov-2 Vero E6 (2) (SARS-CoV-2 Siena-1/2020, Accession no. MT531537) (Stock del 27/07/2020)
- D-MEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco (n. cat. 41965-039, Lotto 2436484, Scad. 2023-03-31)
- FBS (Fetal Bovine Serum) Euroclone (n.cat. ECS0180L, Lotto EUS00AY, Scad.04/2024)
- Incubatore a CO₂ Heraeus (Hera cell240)
- Piastrine 96 pozzetti, Cyto One (n.cat. CC7682-7596, Lotto 1481802)

Operatore: Chiara Terrosi

Data 23/05/2022

FIRMA

Prof.ssa Maria Grazia Cusi

LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Dipartimento di Biotecnologie Mediche
Policlinico Le Scotte, Lotto 5, Piano 2, 53100 Siena
Tel 0577 233866 – Email: microvir@libero.it
microvir.dbm.unisi.it