

# **REPORT TECNICO SCIENTIFICO: SANIFICAZIONE DI BIOAEROSOL CONTENENTI VIRUS RESPIRATORI (SARS-COV-2 & H1N1) MEDIANTE FENOMENOLOGIA SRET**

L'Università degli Studi di Milano si impegna a stendere un report descrittivo della procedura e dei risultati ottenuti in seguito ai test sperimentali di validazione del sanificatore MRA fornito da Elettronica S.p.A. Tali test sono volti allo studio dell'inattivazione di virus respiratori, quali SARS-CoV-2 e H1N1, in aerosol mediante fenomenologia SRET.

Qui di seguito vengono riportate le parti del contratto:

- Cliente: ELETTRONICA S.p.A (ELT).
- Fornitore: Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche (DIBIC).
- Consulente terzo: ViroStatics srl.

## **1. Stato dell'arte e obiettivo dello studio**

Lo studio in esame intende verificare le potenzialità della fenomenologia SRET (Structure Resonant Energy Transfer<sup>1</sup>) nell'inattivazione di virus respiratori quali SARS-CoV-2 e H1N1, in bioaerosol.

Nel 2013 è stato infatti dimostrato che è possibile effettuare l'inattivazione di particelle virali mediante uno specifico trasferimento energetico tra un segnale a radiofrequenza e i modi risonanti acustici associati proprio alla struttura fisica della particella virale<sup>1</sup>. La massimizzazione di tale trasferimento avviene nell'intorno di una determinata frequenza del segnale Elettromagnetico che varia per le differenti tipologie di virus in dipendenza delle loro caratteristiche (i.e. in primo ordine rispetto alla sua firma elettrostatica, dimensione fisica e forma della particella). È possibile quindi pensare di impiegare un segnale elettromagnetico alla giusta frequenza (i.e. la frequenza di risonanza dipolare descritta nello studio di Szu-ChiYang et al.<sup>1</sup>) e trasferire la giusta quantità di energia per inattivare le particelle di un particolare agente virale. Si è visto che, utilizzando un opportuno setting del segnale a microonde irradiato, è possibile arrivare ad una riduzione prossima a 1 Log del titolo virale di una soluzione aerosolizzata contenente SARS-CoV-2 o H1N1<sup>2</sup>.

L'obiettivo della presente campagna di test è quello di replicare i risultati di riduzione virale ottenuti in una precedente campagna di test effettuati in un differente laboratorio scientifico. Lo scopo è quindi quello di riprodurre e validare tali misure di inattivazione in un differente

laboratorio, nello specifico nei laboratori di Immuno-Biologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche (DIBIC) dell'Università Degli Studi di Milano.

## **2. Attività di validazione**

L'attività di validazione è inerente alla quantificazione dell'inattivazione dei virus SARS-CoV-2 e H1N1 in bioaerosol sottoposto ad irraggiamento di un'onda elettromagnetica (EM) a microonde (MW). Tale test è stato effettuato su più campioni impostando il setting dello strumento di sanificazione MRA fornito da ELT. L'obiettivo di tale campagna di test è stato quello di riprodurre i test ed i risultati di inattivazione ottenuti in precedenti campagne di misura presso altri laboratori scientifici. Il segnale a microonde è opportunamente generato dal sanificatore MRA con lo scopo di massimizzare l'accoppiamento energetico tra il segnale elettromagnetico irradiato ed il modo dipolare di vibrazione acustica della particella virale (secondo la fenomenologia SRET - Efficient Structure Resonance Energy Transfer from Microwaves to Confined Acoustic Vibrations in Viruses)<sup>1,3</sup>.

Per verificare l'attendibilità dei test effettuati, è di fondamentale importanza che il sistema di aerosolizzazione e recupero del virus in aerosol non vada ad inficiare la riproducibilità del test. Tale evidenza è stata ottenuta mediante l'effettuazione di cinque test indipendenti di controllo eseguiti utilizzando SARS-CoV-2 e H1N1. In pratica cinque campioni di soluzioni virali identiche (5 per SARS-CoV-2 e 5 per H1N1) sono stati aerosolizzati e recuperati tramite sistema impinger analogamente a quanto effettuato nel caso di trattamento con segnale a MW. Di tali campioni, denominati "controlli", è stata effettuata la misura di titolo virale (i.e. mediante metodo Reed & Muench<sup>4</sup>) a valle di tutto il processo di aerosolizzazione e recupero. Lo scarto tra le cinque misure è stato inferiore al 10% rispetto alla media del titolo virale ottenuto dalle cinque tornate a conferma della riproducibilità dei saggi condotti. Quindi, l'obiettivo di tale campagna di test è stato quello di misurare l'efficacia del dispositivo MRA nel sanificare bioaerosol contenenti SARS-CoV-2 o H1N1.

Nel complesso sono stati effettuati 5 test di inattivazione con MW e 5 test di controllo, per ciascuno dei due virus. Tale trattamento è stato condotto all'interno di un'area BSL3 ed è stato condotto esclusivamente da personale autorizzato. Il personale ELT ha assistito in remoto (mediante collegamento video tramite Skype) a tali test con finalità di supporto e supervisione.

## **3. Test Set-up**

Di seguito sono riportate le parti costituenti il sistema di aerosolizzazione e recupero del Bioaerosol.

- a. Generazione della soluzione virale vaporizzata contenente SARS-CoV-2 o H1N1 mediante generatore di aerosol (un dispositivo medico professionale con MMAD, Diametro Aerodinamico Mediano di Massa, tra 0.5 e 5 micron). E' stata utilizzata una sospensione di partenza di virus concentrato di circa 1 mL;
- b. Contenitore trasparente per il trattamento dell'aria e virus aerodisperso generato;
- c. Trattamento tramite il dispositivo di sanificazione a microonde ELT per un tempo stabilito da Elettronica SpA, utilizzando l'apposita antenna per irradiare il segnale;
- d. Sistema impinger per il campionamento del virus aerosolizzato e successiva analisi del titolo virale.

Nella Figura 1 è riportato in foto un esempio di test set-up con impattore sopra descritto.

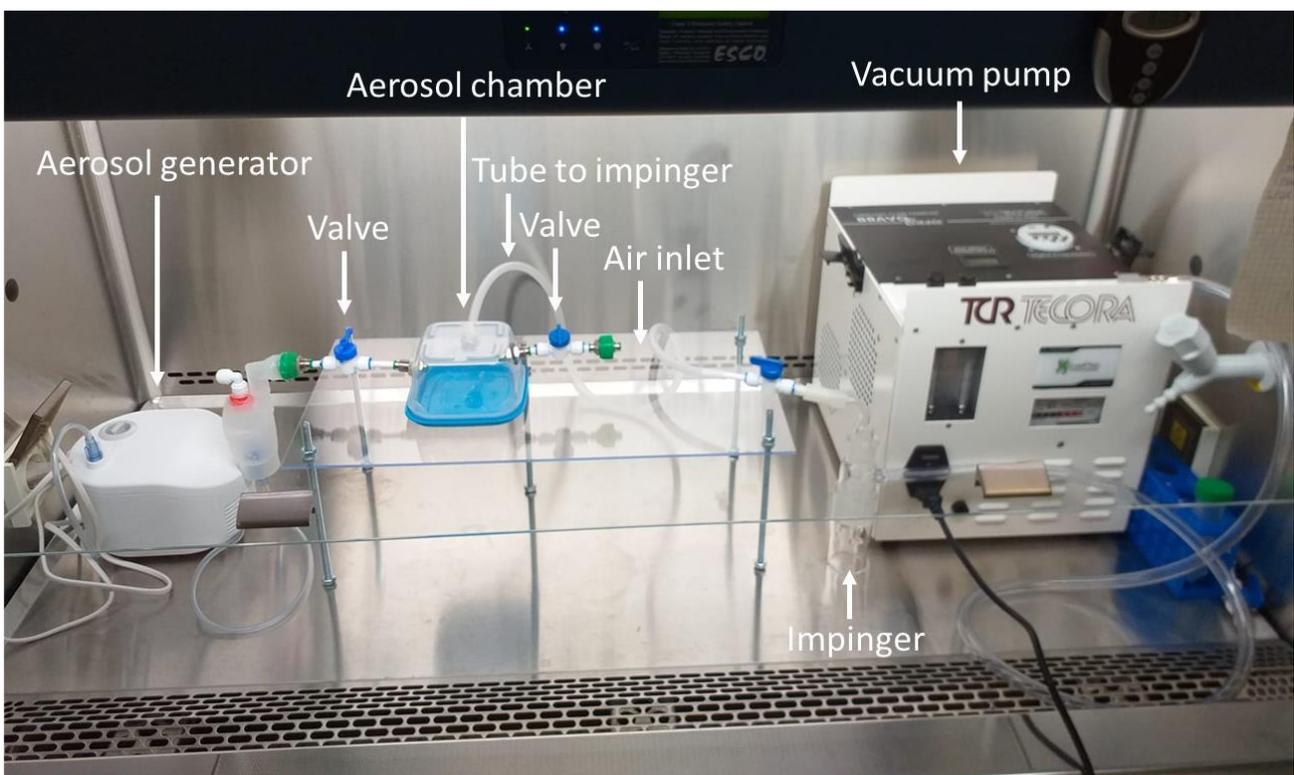


Figura 1: Set-up per test di trattamento Aerosol contenente SARS-CoV-2 o H1N1 con Sanificatore MRA.

### 3.1. Calibrazione ed Impostazione del Sanificatore ELT

Per tutti i test è stata effettuata una definizione dei parametri da impostare per il dispositivo ELT, presso la sede del Fornitore. In particolare le attività a carico ELT sono state le seguenti:

- a) Disponibilità del Sanificatore a Microonde;
- b) Impostazione del Sanificatore rispetto al test da effettuare;
- c) Calibrazione del set-up di misura;
- d) Addestramento del personale del Fornitore per poter effettuare il trattamento mediante sanificatore a microonde all'interno dell'area BSL3 (area preclusa al personale ELT).

Inoltre, in tutte le fasi laboratoriali, il fornitore è stato affiancato da un consulente fornito da ViroStatics srl. che ha fornito supporto tecnico-scientifico.

Il primo giorno si è proceduto allo studio dell'effetto esercitato dal sanificatore MRA su SARS-CoV-2; il giorno immediatamente successivo le stesse analisi sono state condotte su H1N1.

Per entrambi i modelli virali sono stati effettuati 5 test indipendenti di trattamento MRA seguendo i parametri indicati dal Cliente. Nello specifico, ognuno dei 5 trattamenti è stato condotto adottando i seguenti parametri:

- Intervallo di frequenza = Fmin 8000 MHz, Fmax 10000 MHz;
- Salto di Radio-Frequenza = 10 MHz;
- Attenuazione = 12 dB;
- Durata del trattamento = 600 s.

Per ciascuno dei due modelli virali, al termine dei 5 test di trattamento, sono stati effettuati 5 test di controllo adottando i seguenti parametri:

- Intervallo di frequenza = Fmin 0 MHz, Fmax 0 MHz;
- Salto di Radio-Frequenza = 0 MHz;
- Attenuazione = 0 dB;
- Durata del trattamento = 600 s.

### **3.2. Misura dell'inattivazione di bioaerosol contenenti SARS-CoV-2 e H1N1**

Tutti i test sono stati effettuati in ambiente BSL3, sotto cappa biologica ad elevato biocontenimento. Per determinare l'efficacia virucida del sanificatore MRA si è proceduto a stimare la differenza del titolo virale ottenuto dai test sottoposti a radiazione MW rispetto ai test di controllo (virus non sottoposto a radiazione). Per la determinazione del titolo virale è stato utilizzato un sistema cellulare adatto, suscettibile all'infezione con SARS-CoV-2 e

H1N1. Nello specifico sono state utilizzate le cellule Vero E6 per i saggi di infezione *in vitro* con SARS-CoV-2 e le cellule MDCK per i saggi di infezione *in vitro* con H1N1. Entrambe le linee cellulari sono state mantenute in coltura in incubatore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> alla loro densità ottimale in base alle indicazioni indicate dall'azienda fornitrice ATCC fino al momento dell'utilizzo per il protocollo sperimentale. Il giorno 1 dell'esperimento le cellule sono state trasferite in piastre da 96 pozzetti (20.000 cellule per pozzetto). Il giorno 2 dell'esperimento le cellule sono state infettate utilizzando diluizioni seriali (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>...) della sospensione di virus raccolta tramite dispositivo impinger, in seguito a trattamento/non trattamento con sanificatore MRA. Per ciascuna diluizione virale sono state seminate 8 repliche. Dopo 3 giorni, è stata determinata l'avvenuta o mancata infezione in ciascun pozzetto della piastra, tramite rilevazione dell'effetto citopatico al microscopio rovesciato con fotocamera digitale. I dati raccolti sono stati utilizzati per calcolare il titolo delle diverse sospensioni virali raccolte, applicando il metodo descritto da Reed & Muench<sup>4</sup>.

#### 4. Risultati dei test e interpretazione dei dati

Come sopra riportato, l'analisi dei risultati è stata effettuata tramite quantificazione del titolo virale per mezzo del modello proposto da Reed & Muench<sup>4</sup>, ossia tramite la stima della TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose) delle piastre infettate con le sospensioni virali raccolte nei diversi test effettuati. Quindi, per ciascuno dei 5 test di trattamento e 5 test di controllo è stato calcolato un valore TCID<sub>50</sub>, qui di seguito riportato.

- Per **SARS-CoV-2**, i risultati ottenuti sono stati i seguenti (Tr=trattato, CTR=controllo):

Test	TCID50/mL
<b>Tr1</b>	<b>2,68E+03</b>
<b>Tr2</b>	<b>1,58E+04</b>
<b>Tr3</b>	<b>2,01E+04</b>
<b>Tr4</b>	<b>4,64E+03</b>
<b>Tr5</b>	<b>1,95E+04</b>

<b>CTR1</b>	<b>1,31E+05</b>
<b>CTR2</b>	<b>1,00E+05</b>
<b>CTR3</b>	<b>1,31E+05</b>
<b>CTR4</b>	<b>6,31E+04</b>
<b>CTR5</b>	<b>4,39E+04</b>

La media dei valori ottenuti dai Test Tr corrisponde a **1,25E+04 TCID<sub>50</sub>/mL** mentre la media dei valori ottenuti dai Test CTR corrisponde a **9,38E+04 TCID<sub>50</sub>/mL**. Di

conseguenza la percentuale di abbattimento stimata per un aerosol contenete SARS-CoV-2 è risultata essere pari all' **87%**.

- Per H1N1, i risultati ottenuti sono stati i seguenti:

Test	TCID <sub>50</sub> /mL
<i>Tr1</i>	<b>3,16E+02</b>
<i>Tr2</i>	<b>3,72E+02</b>
<i>Tr3</i>	<b>1,58E+03</b>
<i>Tr4</i>	<b>1,58E+03</b>
<i>Tr5</i>	<b>6,31E+02</b>

<i>CTR1</i>	<b>7,94E+03</b>
<i>CTR2</i>	<b>1,00E+04</b>
<b><i>CTR3</i></b>	<b>6,31E+02</b>
<i>CTR4</i>	<b>6,31E+03</b>
<i>CTR5</i>	<b>6,31E+03</b>

La media dei valori ottenuti dai Test Tr corrisponde a **8,98E+02 TCID<sub>50</sub>/mL** mentre la media dei valori ottenuti dai Test CTR corrisponde a **7,64E+03 TCID<sub>50</sub>/mL**. Di conseguenza la percentuale di abbattimento stimata per un aerosol contenete H1N1 è risultata essere pari all' **88,25%**.

Si segnala che il Test di controllo 3 (CTR3), riportato in rosso, è stato escluso dall'analisi in quanto invalidato da un errore sperimentale dovuto a fattori esterni.

## 5. Conclusione

Presso il laboratorio di Immuno-Biologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche (DIBIC) dell'Università degli Studi di Milano sono stati effettuati diversi test per verificare la capacità di inibizione della replicazione virale dei virus SARS-CoV-2 e H1N1 applicando la tecnologia a microonde fornita da ELT nell'intervallo 8-10 GHz.

Per tutti i test effettuati è stato misurato il titolo virale (cioè il conteggio delle particelle infettive) sia di SARS-CoV-2 che di H1N1 sottoposti a radiazione rispetto ai virus non esposti a radiazione (controllo). Brevemente, in seguito al trattamento microonde si è proceduto con un saggio di infezione su un modello cellulare suscettibile all'infezione, al fine di valutare l'inibizione della capacità infettiva/replicativa del virus.

L'Università degli Studi di Milano, nella qualità di fornitore considera il set-up degli esperimenti opportunamente calibrata e pianificata. Il risultato degli esperimenti dimostra l'efficacia del dispositivo MRA impiegato nel sanificare bioaerosol contaminati con SARS-

CoV-2 o H1N1. Mediamente si apprezza una riduzione del titolo virale prossima a un log (TCID<sub>50</sub>) nei campioni trattati con tecnologia ELT rispetto ai controlli non trattati (virus non sottoposto a microonde) in tutti i test eseguiti.

## 6. References

1. Szu-ChiYang, Huan-Chun Lin, Tzu-Ming Liu, Jen-Tang Lu, Wan-Ting Hung, Yu-Ru Huang, Yi-ChunTsai, Chuan-Liang Kao, Shih-YuanChen & Chi-Kuang Sun «Efficient Structure Resonance Energy Transfer from Microwaves to Confined Acoustic Vibrations in Viruses»; Nature Scientific Reports, April, 2015.
2. Davide De Forni, Barbara Poddesu, Giulia Cugia, Giovanni Gallizia, Massimo La Licata, Julianna Lisziewicz, James G. Chafouleas, Franco Lori “Low Ozone Concentration and Negative Ions for Rapid Sars-Cov-2 Inactivation”, Preprint from bioRxiv, 11 Mar 2021.
3. Chi-Kuang Sun, Yi-Chun Tsai, Yi-Jan E. Chen, Tzu-Ming Liu, Hui-Yuan Chen, Han-Ching Wang & Chu-Fang Lo «Resonant Dipolar Coupling of Microwaves with Confined Acoustic Vibrations in a Rod-Shaped Virus»; Nature Scientific Reports, July, 2017.
4. Reed LJ, Muench H. “A simple method of estimating fifty per cent endpoints”. Am J Hyg. 1938;27:493–497