



### **Analisi attività virucida su superficie trattata (codice interno 2003197-001)**

#### **Scopo del lavoro e metodo sintetico**

Scopo del lavoro era testare la stabilità del virus SARS-CoV-2 (inattivato al calore, ATCC VR-1986HK, batch 70035039) su superfici trattate con vernici contenenti “catalizzatore”.

L’approccio attuato è stato il seguente: le superfici trattate sono state inoculate con una quantità nota di virus ( $7,5 \cdot 10^5$  copie genomiche), lasciate incubare per differenti tempi (0, 1, 3 e 6 ore), quindi il virus residuo è stato recuperato mediante swab (in tampone contenente PBS e 70% etanolo).

I campioni sono stati dunque processati per prelevare l’RNA virale e dosarlo mediante Real-Time PCR, applicando un kit commerciale distribuito da Generon, specifico per il gene RdRp di SARS-CoV-2 (COVID 19 (Gene RdRp) detection + Process control, PMB00C\_M2). Per ogni punto sperimentale, l’attività è stata eseguita in triplicato. Come controllo, in parallelo alla superficie con “catalizzatore”, è stata testata una superficie analoga per consistenza e morfologia, ma senza additivo.

## Risultati

I risultati di tale test sono riportati nella tabella seguente, in cui, per ogni punto sperimentale, vengono riportati i Ct (cycle threshold) medi per il segnale del gene RdRp del virus SARS-Cov-2. Valori bassi di Ct corrispondono a maggior quantità di RNA virale presente sui provini; Ct più elevati corrispondono a quantità minori di RNA virale.

Prova su superficie	Ct Vernice + Catalizzatore	Ct Vernice “mock”	Reciproco di $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
T= 0h	31.46	28.69	6.8
T= 1h	31.93	29.42	5.7
T= 3h	32.08	29.44	6.2
T= 6h	32.38	29.97	5.3
Media	31.96	29.38	6.0
Dev Std	0.38	0.53	0.65
RSD %	1.20	1.79	10.80

Andando ad analizzare la differenza tra Ct dei vetrini di controllo (senza catalizzatore) ed i Ct dei vetrini del campione in esame, è possibile determinare il  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , indicatore di una differenza di espressione dell'RNA virale sulla vernice con “catalizzatore” rispetto alla sola vernice. Questa differenza è stimabile in circa 6 volte.

Questo risultato evidenzia l'azione virucida della vernice con catalizzatore. Non si evidenzia però un andamento nel tempo di questo fenomeno, in quanto esso è evidente anche al “tempo 0” (che per effetto dell'impianto sperimentale si traduce in un tempo di contatto virus-vernice di circa 10-15 minuti).

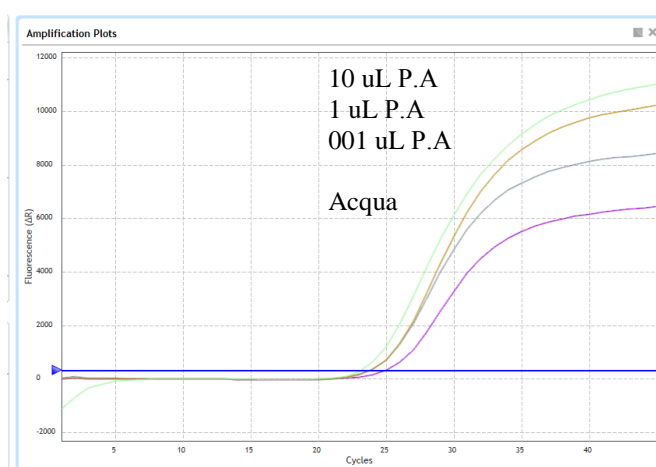
In prima battuta, questo comportamento potrebbe essere attribuibile ad una ridotta efficienza di estrazione del virus dalla superficie contenente catalizzatore oppure da una possibile interferenza del catalizzatore sulle fasi di estrazione del materiale nucleico.

Al fine di indagare ulteriormente l'azione del "catalizzatore", abbiamo verificato l'effetto diretto dell'additivo -----, contenente circa il 40% di Principio Attivo di Umana .

Innanzitutto, è stato valutato l'effetto diretto del Principio Attivo di Umana sulla reazione di polimerizzazione. A tal fine, l'additivo è stato addizionato in quantità crescenti direttamente alla mix di reazione (contenente la polimerasi ed i substrati necessari alla polimerizzazione), insieme ad un controllo positivo per il gene RdRp.

Dalle curve di amplificazione e dai valori di Ct, appare evidente che il Principio Attivo di Umana incrementa l'efficienza della reazione di polimerizzazione. Tale valutazione è stata eseguita anche in presenza di dosaggi differenti del controllo positivo del gene RdRp.

Qui di seguito, sono presentati i dati grezzi ottenuti, in cui appare evidente l'effetto di incremento della reazione di polimerizzazione per effetto del Principio Attivo di Umana (P.A). Pertanto non è stato evidenziato un effetto inibente, bensì il contrario.



Mix di reazione +	Ct (Livello 1)	Ct (Livello 2)	Ct (Livello 3)	Ct (Livello 4)
Acqua	24.00	24.43	25.48	26.32
0,01 uL P.A	22.35	23.27	24.48	25.24
1 uL P.A	22.33	23.33	24.92	25.30
10 uL P.A	20.59	22.72	23.89	24.56

Infine, è stato valutato l'effetto diretto del Principio Attivo di Umana sul recupero del virus direttamente in soluzione. Il virus SARS-CoV-2 inattivato al calore è stato addizionato con un quantitativo crescente di P.A ed incubato per 0, 1, 3 o 6 ore, per simulare i tempi di contatto richiesti per gli swab.

I campioni sono stati dunque processati per l'estrazione dell'RNA virale e analogamente analizzati mediante Real-Time PCR.

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Prova in soluzione	Ct Controllo (Acqua)	Ct 1 uL P.A	Ct 5 uL P.A
T= 0h	28.53	Assente	Assente
T= 1h	28.12	Assente	Assente
T= 3h	28.59	Assente	Assente
T= 6h	28.45	Assente	Assente
Media	28.42	-	-
Dev Std	0.21	-	-
RSD %	0.74	-	-

A fronte di questi dati, si conferma un marcata azione del Principio Attivo di Umana (P.A) sul materiale virale: in presenza di P.A non si ottiene alcun recupero, non si evidenzia alcuna coppia genomica in soluzione. Sebbene tali prove eseguite in soluzione non permettano una quantificazione dell'abbattimento del virus per effetto del catalizzatore, supportano le ipotesi formulate precedentemente, suggerendo un possibile effetto del catalizzatore sul recupero del materiale virale dalle superfici, evidente anche a tempi brevi di contatto. Tali dati risultano però insufficienti per determinare l'esatto meccanismo d'azione del catalizzatore sulle particelle virali (azione diretta sulle proteine, sull'RNA o sequestro meccanico).

## Conclusioni

Da quanto sopra riportato, possiamo concludere che depositando una quantità nota di virus SARS-CoV-2 inattivato al calore su una superficie trattata con vernice UMANA contenente il catalizzatore, il recupero del materiale nucleico virale risulta essere circa 6 volte inferiore rispetto a quanto avviene su una superficie analogamente trattata con vernice non contenente catalizzatore.

Questo effetto si evince già a tempi di contatto nell'ordine dei minuti e tendenzialmente rimane costante nel tempo.

Tale risultato è avvalorato dal fatto che non solo il Principio Attivo di Umana è attivo contro il materiale genomico virale direttamente in soluzione ma anche dal fatto che questo additivo svolge un'azione promuovente l'efficienza della reazione di polimerizzazione.

Questo ultimo fatto porterebbe pure a supporre che la differenza in Ct tra i campioni con e senza catalizzatore sia addirittura sottostimata e che dunque l'effetto di abbattimento possa essere superiore a valore di 6.