



**UNIVERSITÀ
DI TRENTO**

**Dipartimento di
Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata**



*Massimo Pizzato, Ph.D.
Professore Ordinario
Laboratory of Virus-Cell
interaction
tel. +39 0461 283286
massimo.pizzato@unitn.it*

October 27, 2021

**Sanificazione di un autobus mediante Technozono:
efficacia sul campo del trattamento con ozono contro il virus SARS-CoV-2**

Introduzione

La trasmissione del virus SARS-CoV-2, agente eziologico di COVID-19, avviene principalmente mediante inalazione di goccioline e aerosol di saliva così come attraverso il contatto con superfici contaminate. Comunemente, le superfici possono contaminarsi sia per deposito diretto delle goccioline di saliva che per trasferimento di virus presente sulle mani di soggetti infettati (Karia et al., 2020; Zhou et al., 2021).

Alla luce di queste considerazioni, gli ambienti chiusi che ospitano gruppi numerosi di persone in spazi limitati sono luoghi dove il contagio avviene con la massima efficienza. I mezzi pubblici dunque sono spesso identificati come importanti fonti di contagio con SARS-CoV-2, con particolare riferimento al trasporto di studenti, che inevitabilmente è associato a condizioni di altissima densità di occupazione (Chen et al., 2021; Moreno et al., 2021). È quindi molto importante poter disporre di una strategia di sanificazione che consenta, con una cadenza regolare, di decontaminare le superfici e l'atmosfera dei mezzi mediante una metodica efficace, pratica e veloce che al tempo stesso non lasci residui pericolosi per le persone e non danneggi i materiali e la strumentazione dei mezzi.

Abbiamo quindi testato la virucidità di trattamenti di un autobus con concentrazioni variabili di ozono contro il virus SARS-CoV-2. La vitalità del virus è stata valutata mediante saggi di TCID50 in coltura cellulare, in grado di misurare l'effettiva carica infettante del coronavirus.



Metodi utilizzati e risultati ottenuti

I saggi di vitalità virale su SARS-CoV-2 sono stati effettuati in condizioni che riproducessero il più possibile una situazione reale durante l'utilizzo di un mezzo pubblico. Un autobus di Trentino Trasporti (Pulmann My Way 18.25) è stato portato in prossimità dei laboratori dell'Università di Trento nei giorni a partire dall'8 settembre per un periodo di circa un mese. Un dispositivo Technozono è stato predisposto all'interno dell'autobus dalla ditta Technoagility, in posizione centrale (Figura 1, rettangolo verde). Il virus testato è stato precedentemente prodotto in coltura cellulare mediante infezione con l'isolato Wuhan-1 di SARS-CoV-2 e inizialmente titolato con saggio delle placche. È stato generato uno stock virale con una carica infettiva di 4×10^5 cfu/ml, successivamente aliquotato e conservato alla temperatura di -80°C fino al momento dell'utilizzo. In questo modo tutti gli esperimenti sono stati eseguiti usando il medesimo preparato e la medesima quantità di SARS-CoV-2.

Il virus è stato depositato sui braccioli dell'autobus in 9 punti distinti posizionati nella parte anteriore, centrale e posteriore dell'autoveicolo, come indicato in figura 1 (punti rossi). Per ciascun punto sono stati depositati $50\mu\text{l}$ di stock virale, contenenti dunque 20000 unità infettive di virus. Una volta chiuse le porte, il dispositivo Technozono è stato attivato da remoto tramite software dedicato e la concentrazione di ozono all'interno del mezzo è stata monitorata sia mediante ispezione visiva di un misuratore portatile posizionato in prossimità della porta anteriore (figura 1, triangolo giallo), sia tramite il sensore integrato nello strumento Technozono.

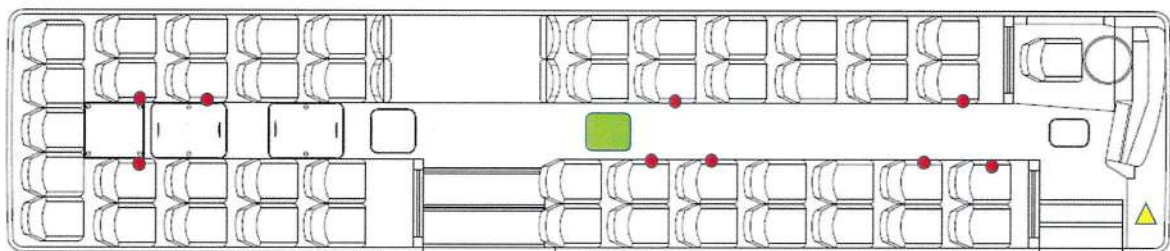


Figura 1. Schema del veicolo usato e della strategia sperimentale

Rosso: punti in cui sono stati depositati gli inoculi virali

Verde: dispositivo Technozono

Giallo: misuratore portatile ozono

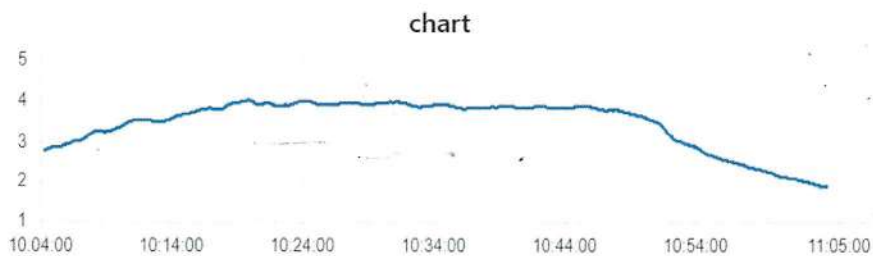
La concentrazione di ozono rilevata dal dispositivo Technozono è stata tracciata tramite il software (figura 2). La durata del trattamento con l'ozono è stata protratta per il tempo stabilito a partire dal raggiungimento della concentrazione desiderata, alla fine del quale il software determinava lo spegnimento del dispositivo. Dopo aver atteso l'abbassamento del livello della concentrazione di ozono, il virus è stato raccolto con terreno di coltura cellulare per essere poi titolato mediante TCID₅₀ su cellule Vero. Per ogni sessione, è stato effettuato un esperimento di controllo per stabilire la misura dell'inattivazione basale del virus in assenza di ozono, da usare come riferimento.



UNIVERSITÀ
DI TRENTO



Dipartimento di
Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata



LEGGI CONFIGURAZIONE

```
{"start_time": "09:55 ", "start_day": [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7],
```

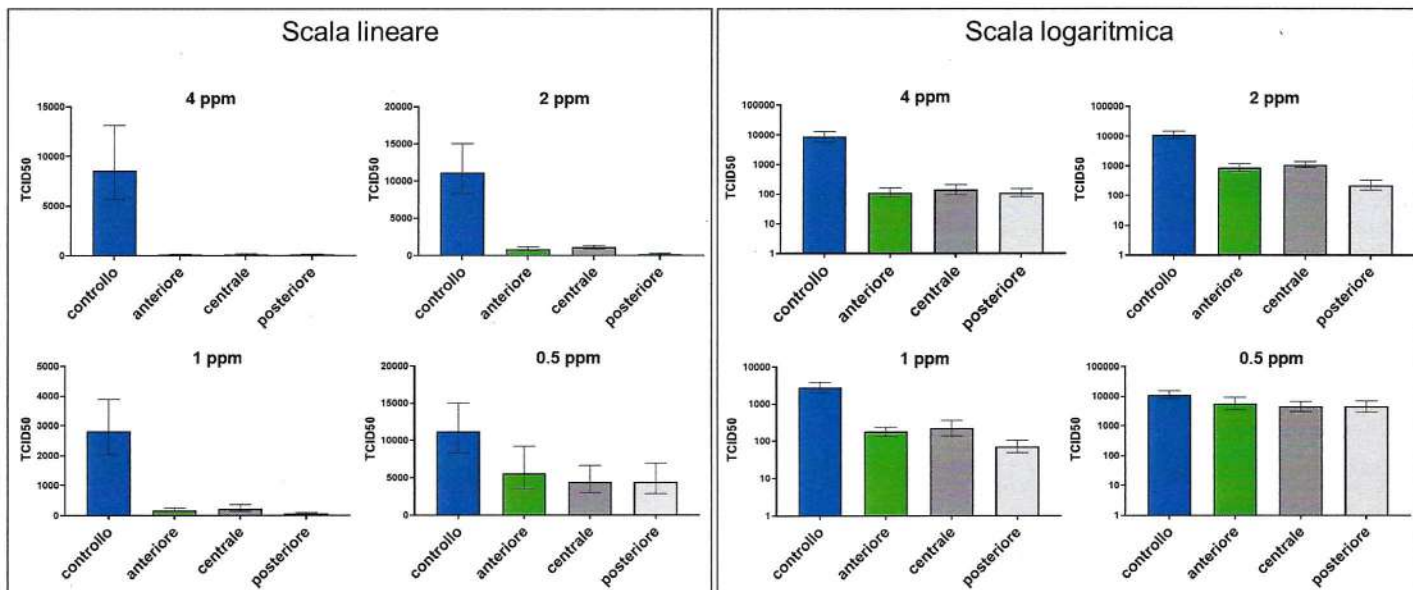
```
Configurazione "ozone_max": 4000, "ozone_min": 3900, "time_cycle_ozone": 30,  
"time cycle uv": 2, "monitor": true}
```

Figura 2. Monitoraggio della concentrazione di ozono rilevato da Techozono

La TCID50 è la titolazione del virus mediante diluizione seriale dell'inoculo in piastra da 96 pozzetti contenenti cellule Vero, altamente suscettibili all'infezione, monitorando l'effetto citopatico causato dal virus alle varie diluizioni e quantificando la diluizione in grado di produrre infezione nel 50% dei pozzetti (Patterson et al., 2020).

Gli esperimenti sono stati eseguiti il mattino, anticipando l'aumento della temperatura nell'autobus per effetto dell'esposizione all'irraggiamento solare, evitando così temperature troppo elevate e poco realistiche. Tutte le prove sono state effettuate con temperature ambientali in un range che è variato tra i 14 e 32°C all'interno dell'autobus, come misurato da apposito termometro.

Determinazione della virucità di diverse concentrazioni di ozono e di tempi di trattamento In una prima sessione di esperimenti è stata mantenuta costante la durata del trattamento (30 minuti) testando quattro diverse concentrazioni di ozono: 0.5, 1, 2, 4 ppm. Come osservabile in figura 3 (dati mostrati sia in scala lineare che logaritmica), l'attività virucida del trattamento generalmente aumenta con l'aumentare della concentrazione di ozono con attività massima a 4 ppm e attività minima a 0.5ppm. In questa serie di esperimenti non si notano differenze significative tra l'effetto di 1ppm e 2ppm, un risultato che potrebbe essere influenzato da molteplici variabili che non potevano essere controllate, quali le condizioni ambientali di temperatura e umidità diverse da un giorno all'altro. Si nota comunque che alla concentrazione massima testata (4ppm), la carica virale viene abbattuta di circa il 97%. Si può notare che il livello di abbattimento del virus risulta indipendente dalla posizione dell'inoculo all'interno del mezzo,



con risultati simili ottenuti nella parte anteriore, centrale e posteriore del veicolo.

Figura 3. Virucità dell'ozono a concentrazioni diverse

Inoculi virali sono stati depositati in posizioni diverse dell'automezzo ed esposti alle concentrazioni indicate di ozono per 30 minuti. Il virus è stato posizionato in 3 punti nella parte anteriore, centrale e posteriore dell'automezzo. Dopo il trattamento, gli inoculi relativi ad ogni area del mezzo sono stati raccolti in un unico campione che è poi stato titolato sulle cellule. I valori costituiscono la media rilevata tra sette replicati tecnici con la relativa deviazione standard. Sulla sinistra i dati sono mostrati in scala lineare, sulla destra in scala logaritmica.

Al fine di valutare l'effetto della durata del trattamento, si sono testati tre tempi diversi di esposizione alla stessa concentrazione di ozono (4ppm): 15, 30, 60 minuti. Come si osserva dalla figura 4 (dati mostrati sia in scala lineare che logaritmica) la durata del trattamento ha un'influenza non determinante sull'attività virucida dell'ozono che risulta similmente efficace nei diversi tempi di trattamento.

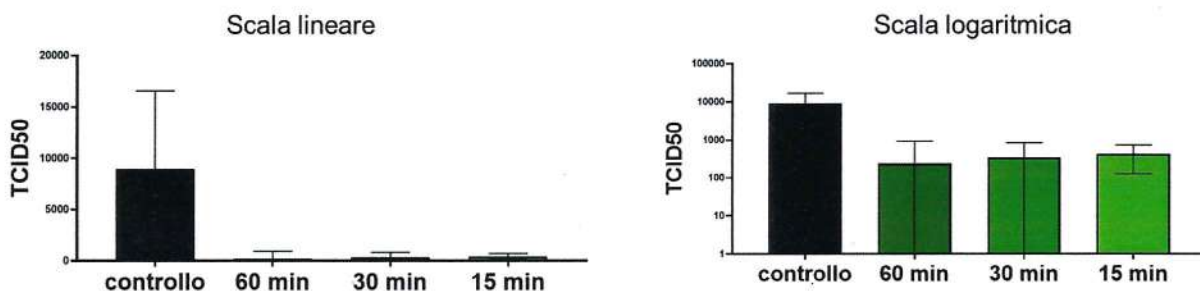


Figura 4. Virucidità dell'ozono con trattamenti di diversa durata

Inoculi virali sono stati depositati in posizioni diverse dell'automezzo ed esposti alla concentrazione di ozono di 4ppm per 60, 30 o 15 minuti. Il virus è stato posizionato in 3 punti nella parte anteriore, centrale e posteriore dell'automezzo. Dopo il trattamento, gli inoculi relativi ad ogni area del mezzo sono stati raccolti in un unico campione che è poi stato titolato sulle cellule. I valori costituiscono la media di tutti gli inoculi virali depositati nell'autobus con la relativa deviazione standard.

Sulla sinistra i dati sono mostrati in scala lineare, sulla destra in scala logaritmica.

Conclusioni

- la variazione della concentrazione di ozono ha un impatto critico maggiore rispetto alla durata del trattamento sull'attività virucida.
- Tra le condizioni testate, il trattamento con 4ppm di ozono per 30 minuti risulta in un abbattimento della carica virale efficace e maggiore del 96%.
- Il trattamento assicura l'inattivazione di SARS-CoV-2 indipendentemente dalla distanza del virus dal dispositivo Technozono all'interno del mezzo.

Osservazioni aggiuntive

- 1) Lo studio è stato realizzato cercando di riprodurre al meglio le condizioni reali sul campo. Tuttavia, l'unico modo per testare la vitalità del virus è quello di misurarne la capacità infettiva in coltura cellulare, un saggio che richiede una quantità minima di virus elevata. Questo ha comportato la necessità di usare un inoculo virale molto più concentrato e sotto forma di una goccia di fluido di dimensioni molto maggiori rispetto a quanto si avrebbe in condizioni reali per effetto del deposito di aerosol o altra contaminazione naturale. Ci si potrebbe attendere che l'ozono possa essere più efficace nella situazione reale, dovendo interagire e penetrare in un volume molto ridotto rispetto a quello sperimentato con una goccia artificiale di sospensione virale.
- 2) La durata dei trattamenti è stata calcolata a partire dal momento in cui l'ozono ha raggiunto il livello desiderato, senza considerare il tempo necessario allo strumento per generare tale concentrazione di gas. Abbiamo riscontrato che questo tempo può variare



UNIVERSITÀ
DI TRENTO



Dipartimento di
Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata

in media tra i 10 e i 20 minuti. Il trattamento, quindi, comprende questo periodo non computato.

- 3) Le condizioni ambientali in cui si è svolto lo studio presentano molte variabili impossibili da controllare e da valutare. Queste includono la temperatura, il tasso di umidità, l'irraggiamento UV. Questi fattori contribuiscono alla variabilità dei risultati osservata.

Bibliografia

- Chen, L., Ban, G., Long, E., Kalonji, G., Cheng, Z., Zhang, L., & Guo, S. (2021). Estimation of the SARS-CoV-2 transmission probability in confined traffic space and evaluation of the mitigation strategies. *Environmental Science and Pollution Research* 28:31, 28(31), 42204–42216. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-13617-Y>
- Karia, R., Gupta, I., Khandait, H., Yadav, A., & Yadav, A. (2020). COVID-19 and its Modes of Transmission. *SN Comprehensive Clinical Medicine* 2020 2:10, 2(10), 1798–1801. <https://doi.org/10.1007/S42399-020-00498-4>
- Moreno, T., Pintó, R. M., Bosch, A., Moreno, N., Alastuey, A., Minguillón, M. C., Anfruns-Estrada, E., Guix, S., Fuentes, C., Buonanno, G., Stabile, L., Morawska, L., & Querol, X. (2021). Tracing surface and airborne SARS-CoV-2 RNA inside public buses and subway trains. *Environment International*, 147, 106326. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106326>
- Patterson, E. I., Prince, T., Anderson, E. R., Casas-Sanchez, A., Smith, S. L., Cansado-Utrilla, C., Turtle, L., & Hughes, G. L. (2020). Methods of inactivation of SARS-CoV-2 for downstream biological assays. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.108035>
- Zhou, L., Ayeh, S. K., Chidambaram, V., & Karakousis, P. C. (2021). Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions. *BMC Infectious Diseases* 2021 21:1, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12879-021-06222-4>

Sincerely,