

---

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

**Dott. A. Botarelli**  
**Dott. O. Alessandrini**

BIO MEDICAL PHARMA  
Branch of Power Metal Italia Srl  
Via Fiorentina, 8 - 59100  
Prato (PO) – Italy

**RELAZIONE SULL'ATTIVITA' VIRUCIDA PHOTO ACTIVE E PHOTO ACTIVE AG**

**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 del prodotto Photo Active ( $\text{TiO}_2$ ) e Photo Active Ag ( $\text{TiO}_2+\text{Ag}$ ) nei confronti del virus SARS-Cov-2. I campioni Photo Active e Photo Active Ag sono stati messi a contatto in concentrazione del 40% con il virus SARS-Cov-2 a concentrazione nota per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo filtrazione su colonnina Micro-Spin S400 HR, il filtrato è stato utilizzato per infettare le cellule Vero E6 sensibili al virus, secondo UNI EN14476 (luglio 2019).

Identificazione dei campioni:

**CAMPIONE 1 ( $\text{TiO}_2$ )**

- nome: PhotoACTIVE®
- numero di lotto: 200709
- produttore: L&G Holding srl, Italy
- conservazione: temperatura ambiente

**CAMPIONE 2 ( $\text{TiO}_2$  Ag)**

- nome: PhotoACTIVE® Ag
- numero di lotto: 200731
- produttore: L&G Holding srl, Italy
- conservazione: temperatura ambiente

---

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*

**TEST CITOTOSSICITA'**

Le cellule Vero E6 (ATCC CRL-1586) sensibili al virus sono state inoculate ( $2 \times 10^5$  /ml) in una piastrina a 96 e incubate a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Dopo 24 ore, i campioni Photo Active e Photo Active Ag sono stati diluiti al 40% in terreno D-MEM (SS) e filtrati (100 µl), in una colonnina Micro-Spin S400 HR (2' a 2000 rpm). 100 µl di filtrato sono stati ulteriormente diluiti con 130 µl di D-MEM (SS) (1/2,3).

Quindi, 50µl del prodotto sono stati distribuiti per pozzetto (in quadruplicato) nella piastrina a 96 pozzetti con monostrato di cellule Vero E6, dopo aver tolto terreno di coltura. Successivamente, vengono aggiunti 50 µl di D-MEM (SS) per pozzetto.

La piastrina viene osservata tutti i giorni al microscopio ottico (10x). La lettura finale viene effettuata dopo 3 giorni, per evidenziare eventuale effetto citotossico.

**RISULTATI CITOTOSSICITA' CAMPIONE 1:**

<b>CAMPIONE 1: PhotoACTIVE®</b>	
TiO <sub>2</sub> diluito come descritto	Non Tossico

**RISULTATI CITOTOSSICITA' CAMPIONE 2:**

<b>CAMPIONE 2: PhotoACTIVE® Ag</b>	
TiO <sub>2</sub> Ag diluito come descritto	Non Tossico

---

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

---

**ATTIVITA' VIRUCIDA**

Le cellule Vero E6 (ATCC CRL-1586) sensibili al virus sono state inoculate ( $2 \times 10^5$  /ml) in una piastrina a 96 e incubate a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Dopo 24 ore, 60 µl di virus SARS-Cov-2 ( $2 \times 10^6$  TICD<sub>50</sub>/pozzetto) vengono messi a contatto con 40µl di ciascun prodotto per 30 minuti a temperatura ambiente. Per il controllo virus, il prodotto in esame è stato sostituito con il medium di coltura, ed il virus è stato trattato nello stesso modo dei campioni saggiati.

100 µl della sospensione vengono filtrati in una colonnina Micro-Spin S400 HR (2' a 2000 rpm) e diluiti con 130 µl di D-MEM (SS) (1/2,3).

Viene quindi eseguita titolazione del virus dopo trattamento. Vengono distribuiti 50µl delle diluizioni del campione per pozzetto (in quadruplicato) nella piastrina a 96 pozzetti su cui è presente il monostato di cellule Vero E6, da cui è stato allontanato il terreno di coltura. Successivamente, vengono aggiunti 50 µl di D-MEM (SS) per pozzetto.

La piastrina viene osservata tutti i giorni al microscopio ottico (10x). La lettura finale viene 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).

Il test è stato eseguito in triplicato in data 09/10/2020, 20/10/2020 e 10/11/2020.

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

**RISULTATI ATTIVITA' VIRUCIDA**

CAMPIONE 1: PhotoACTIVE	Tempo	Campione virale dopo trattamento	Diluizione							Titolo (TCID <sub>50</sub> /ml)
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
TiO <sub>2</sub>	30'	+++	----	----	----	----	----	----	----	75% infettività nel campione iniziale
K Virus	30'	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	--	2 x 10 <sup>6</sup>

+ = presenza effetto citopatico in ciascun pozzetto analizzato

CAMPIONE 2 : PhotoACTIVE Ag	Tempo	Campione virale dopo trattamento	Diluizione							Titolo (TCID <sub>50</sub> /ml)
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
TiO <sub>2</sub> Ag	30'	+++	----	----	----	----	----	----	----	50% infettività nel campione iniziale
K Virus	30'	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	--	2 x 10 <sup>6</sup>

+ = presenza effetto citopatico in ciascun pozzetto analizzato

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

**CONCLUSIONE**

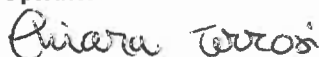
Entrambe i prodotti, Photo Active Ag e Photo Active presentano attività virucida verso il virus SARS-Cov-2, come si può evincere dalla tabella. Il trattamento con entrambe i prodotti è risultato efficace contro il virus SARS CoV-2 a partire dalla diluizione  $10^{-1}$ .

Il prodotto viene considerato virucida quando, dopo il tempo di contatto, si osserva nel campione trattato una riduzione del titolo TCID<sub>50</sub> di 4 log<sub>10</sub> rispetto a quello riscontrato nel controllo 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 2156422, Scad. 2020-12-31)
- FBS (Fetal Bovine Serum) Euroclone (n.cat. ECS0180L, Lotto EUS00AY, Scad.04/2024)
- Incubatore a CO<sub>2</sub> Heraeus (Hera cell240)
- Piastrine 96 pozzetti, Cyto One (n.cat. CC7682-7596, Lotto 1481802)
- Microspin S-400 HR Columns (n.cat.275114001, Lotto 17150989, GE Healthcare) Scad: 1.10.2022

**Operatore: Chiara Terrosi**



Data 13.11.2020

**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