



**Studio sperimentale sull'efficacia di un sanificatore di aria per ambienti confinati
(Fellowes AeraMax Professional™) nel neutralizzare la contagiosità del virus SARS-
CoV-2**

Prof. A. Izzotti, MD PhD,

Professore Ordinario di Igiene e Medicina Preventiva, Scuola di Medicina,
Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Genova



BASE DI PARTENZA SCIENTIFICA

Il virus SARS-CoV-2, agente patogeno della sindrome da coronavirus 19 (Covid-19), ha una tipica modalità di contagio per via aerodiffusibile. Il virus, essendo un organismo parassita intracellulare estremamente piccolo e semplice, sfrutta come vettore per passare da un soggetto all'altro e diffondersi negli ambienti l'aerosol salivare emesso da soggetti malati o con malattia in incubazione avanzata. Tale aerosol è denominato 'Flugge' dal nome dell'igienista tedesco Georg Friedrich Wilhelm Flügge che per primo lo identificò come vettore delle malattie infettive contagiose aerodiffusibili alla fine del 1800. La emissione di Flugge è quindi condizione necessaria tanto quanto la presenza di SARS-CoV-2 per sostenerne il contagio. Il Flugge si diffonde nell'aria in 2 principali componenti: il droplet di grandi dimensioni e l'aerosol di piccole dimensioni. Il droplet di grandi dimensioni è prevalentemente composto da particelle con diametro maggiore di 300 μm ; queste particelle non raggiungono grandi distanze rispetto al paziente che le emette (max 1-2 m). Tuttavia questa distanza dipende, come per ogni componente del Flugge, dalla 'vis a tergo' da cui l'aerosol viene propulso durante la fase espiratoria. Pertanto condizioni quali la tosse o la starnutazione, ma anche il parlare ad alta voce o l'attività fisica intensa, aumentano considerevolmente (a) la quantità totale di Flugge emesso; (b) la prevalenza della componente del droplet di grandi dimensioni; (c) la distanza raggiunta dalla particelle che può arrivare anche a 4-5 m. Per le sue notevoli dimensioni, il droplet contiene rilevanti quantità di cellule desquamate dalle mucose delle vie respiratorie superiori, soprattutto faringee, principali bersaglio dei virus aerodiffusibili. Lo stesso SARS-CoV-2 riconosce infatti la rinofaringe prima, l'oro- e la laringo-faringe poi come porta di ingresso nel nostro organismo. Poiché il virus è un parassita intracellulare incapace di vita autonoma, la presenza di grandi quantità di cellule ricche al loro interno di virioni e loro componenti rende il droplet di grandi dimensioni un vettore particolarmente efficace e quindi pericoloso per la trasmissione della sindrome da SARS-CoV-2.

L'aerosol di piccole dimensioni è composto da particelle con diametro prevalente inferiore ai 100 μm . Tale componente, quando emessa dal soggetto fonte di contagio, raggiunge distanze superiori rispetto al droplet. Inoltre, a causa della bassa spinta di Archimede del fluido aereo in cui queste particelle sono inserite, l'aerosol di piccole dimensioni tende a restare sospeso piuttosto a lungo nell'aria a seconda delle caratteristiche microclimatiche dell'ambiente dove esso insiste. Pertanto il droplet di grandi dimensioni è



molto contagioso ma induce un contagio su un'area limitata rispetto al paziente che lo emette; l'aerosol di piccole dimensioni è meno contagioso ma induce contagio in un'area ampia rispetto alla fonte di emissione ed inoltre resta sospesa nell'aria e quindi potenzialmente inalabile per tempi anche molto lunghi.

Queste necessarie premesse indicano come il contrasto alla pandemia da Covid-19 veda nella sanificazione del mezzo di contagio aereo (aria) uno strumento estremamente importante. La presenza di Flugge non sanificato è infatti una condizione altrettanto necessaria per sostenere il contagio quanto la presenza del virus.

Per questa ragione tutte le principali misure di profilassi aspecifica delle malattie infettive aerodiffusibili sono incardinate sulla diminuzione della immissione del Flugge nell'ambiente tramite (a) dispositivi di protezione individuale (mascherine); (b) distanziamento sociale per diminuire il Flugge che passa da un soggetto all'altro; (c) la diluizione del Flugge nell'ambiente. Tale diluizione corrisponde alla quota di ventilazione degli ambienti confinati. L'Igiene Ambientale fa corrispondere tale quota con il valore di 32 m³ pro capite. Tale valore è ricavato dall'Indice di Pettenkoffer, un indice che stabilisce il volume di aria necessario pro capite in un ambiente confinato per mantenere il valore di CO₂ al di sotto del valore soglia dell' 1x1000 vol/vol, rispetto al valore di 0.3x1000 normalmente presente nell'aria outdoor. Infatti oltre tale valore soglia (1x1000 vol/vol) possono comparire i primi sintomi legati all'esposizione a questo gas. Per questa ragione in era preantibiotica l'unico strumento di profilassi aspecifica delle malattie infettive era la diluizione dell'aria degli ambienti confinati realizzata mediante ampie fenestrate od ambienti con soffitti particolarmente elevati. Tali caratteristiche assumevano particolare rilevanza soprattutto nel caso di locali pubblici o in cui insistessero soggetti fragili o contagiosi. Attualmente il rispetto dell'indice di Pettenkoffer viene invece ottenuto con sistemi di ventilazione artificiale. Questo approccio permette di diminuire le perdite termiche aumentando l'efficienza energetica e di utilizzare in modo più efficiente gli spazi confinati.

La pandemia da Covid-19 ha dimostrato quanto i concetti finora esposti siano di rilevanza pratica ed indirizzino in modo concreto le decisioni tese a tutelare la Salute Pubblica. Tuttavia la gestione dell'aria negli ambienti confinati, con particolare riferimento a quelli pubblici o che ospitano soggetti fragili quali anziani e bambini, resta una criticità irrisolta. Infatti l'elevata contagiosità di SARS-CoV-2, dovuta alla straordinaria elettrofilicità della sua spike protein, rende questo virus (soprattutto nelle sue ultime varianti quali la delta) particolarmente contagioso e quindi in grado di realizzare catene di contagio anche con basse cariche infettanti. Non è quindi più sufficiente diluire la carica virale aerodiffusa tramite aumento della



ventilazione artificiale o naturale. E' invece necessario superare il mero concetto quantitativo di diluizione della carica virale aerodiffusa con interventi qualitativi di profilassi specifica tesi a diminuire la quantità di Flugge nell'aria e di conseguenza la quantità dei virioni aerodiffusi che sostengono la catena di contagio. Scopo del presente studio è appunto quello di verificare sperimentalmente la possibilità di raggiungere questo obiettivo con strumenti di sanificazione dell'aria.

MATERIALI E METODI

Campioni di tamponi faringei contenenti virus SARS-CoV-2 selvaggio vitale sono stati utilizzati per generare aerosol e droplet (aerosol). Tale aerosol riproduce quindi il vettore dei virioni infettanti. L'aerosol infettante prodotto è stato inserito in un flusso d'aria canalizzato raccogliendolo su campioni fluidi costituiti da miscele saline tamponate che riproducono il fluido faringeo del soggetto accettore. E' stata quindi verificata la persistenza o meno della capacità di tali campioni di infettare cellule suscettibili dotate di recettori specifici per questo virus. La presenza o meno del virus all'interno di tali cellule è stata valutata mediante PCR (reazione di polimerizzazione a catena per amplificare e quantificare l'RNA virale). Il test biologico utilizzato è stato il 'challenge test' descritto in una nostra recente pubblicazione (Izzotti et al., *J. Personalized. Medicine*, 2021). Tale test utilizza cellule di rene con elevata espressione di membrana del recettore ACE2 che lega specificatamente la spike protein di SARS-CoV-2 ed è pertanto in grado di verificare non solo la presenza del virus ma anche e soprattutto la sua capacità infettante e patogenetica.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in laboratorio di biosicurezza BSL3 ed effettuati da personale dotato di adeguati dispositivi di protezione individuale ed idoneo al rischio biologico Covid-19 (**Figure 1-4**).







Le cellule esprimenti il recettore ACE2 ad alta affinità per la spike protein di SARS-CoV-2 sono state incubate overnight a 37°C con i campioni ad alta carica virale variamente trattati. Un esempio delle colture cellulari utilizzate è riportato in **Figura 5**.

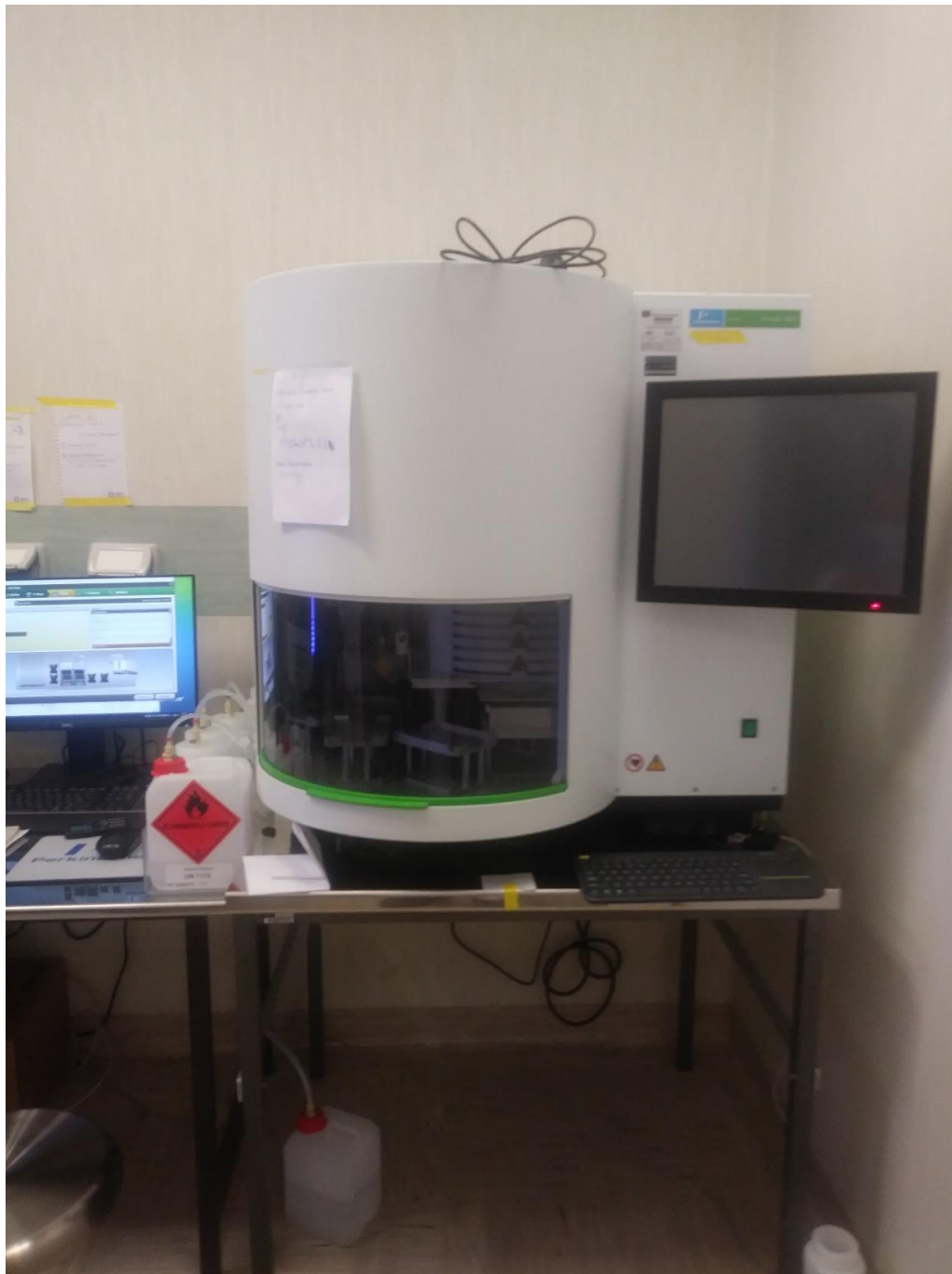




Al termine dell'incubazione le piastre sono state sottoposte a riscaldamento a 57°C per 30 min al fine di inattivare il virus extracellulare e di staccare le cellule dal piano di adesione. La sospensione cellulare è stata quindi raccolta mediante scraping ed aspirazione con pipette Pasteur monouso e quindi centrifugata per 15 min a 3000 g. Il pellet cellulare raccolto è stato risospeso e lavato 2 volte con tampone fosfato (PBS) e ricentrifugato. Il pellet finale raccolto è stato quindi risospeso in acqua bidistillata sterile RNase-free molecular grade e congelato.

L'estrazione dell'RNA intra-cellulare è stata effettuata mediante apparecchiatura robotizzate ad elevata performance utilizzando il robot preparatore Janus G3 (Perkin Elmer) ed estrazione con microsfere magnetiche utilizzando l'apparecchiatura automatizzata Chemagic 360 D (Perkin Elmer) (**Figure 6-7**).







La presenza di RNA virale SARS-CoV-2 nell'RNA intracellulare estratto è stata verificata mediante retro-trascrizione RNA-DNA e reazione di polimerizzazione a catena (PCR) utilizzando l'apparato ad alta sensibilità Light Cycler II (Roche) (**Figura 8**).



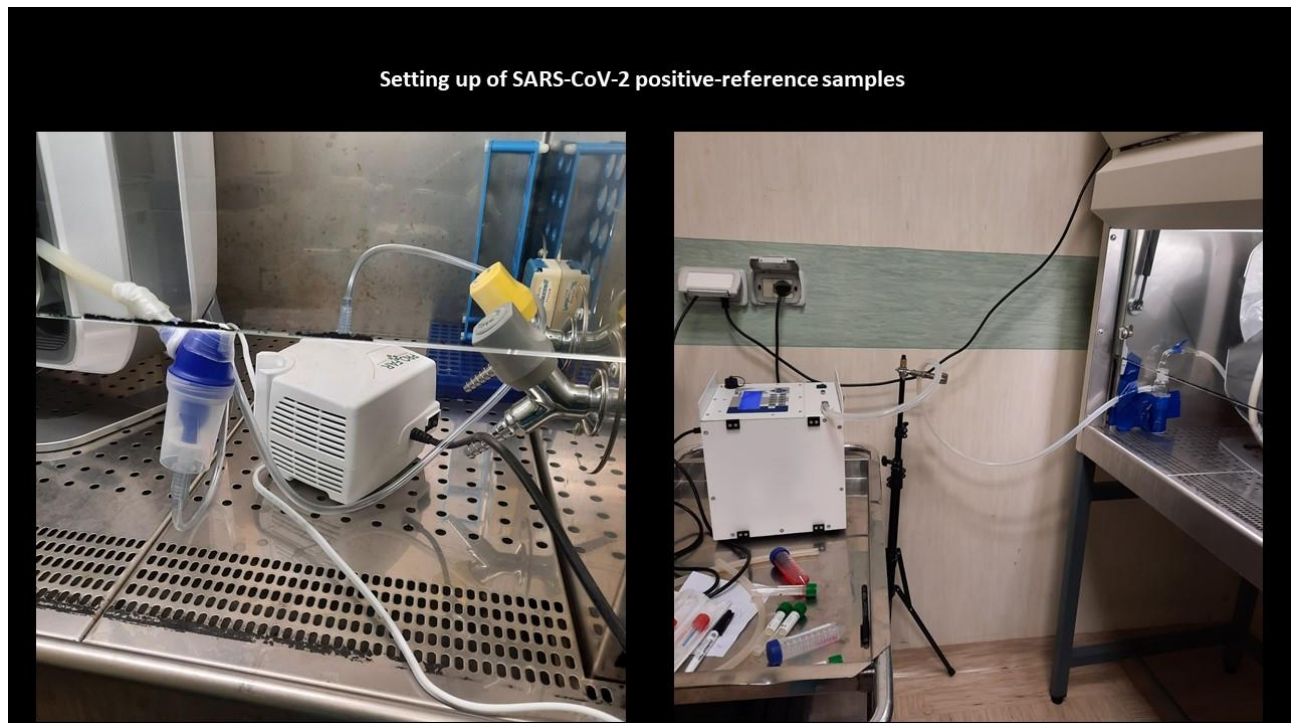
Per l'analisi di ciascun campione sono state utilizzate sonde molecolari fluorescenti per i seguenti geni: (a) Gene house keeping Ribonuclease P/MRP Subunit P30 [RPP30] utilizzato come controllo interno positivo per verificare la presenza di RNA e la corretta attuazione della reazione PCR; (b) gene virale SARS-CoV-



2 Opening Reading Frame (Orf) Orf1ab marcato con sonda fluorescente Vic; (c) gene virale SARS-CoV-2 N marcato con sonda fluorescente FAM. Sono state usate le seguenti condizioni tempo/temperatura di amplificazioni PCR: 50 °C x 15 min, 95 °C x 2 min, 45 cicli a 95 °C x 3 sec e 60 °C x 30 sec.

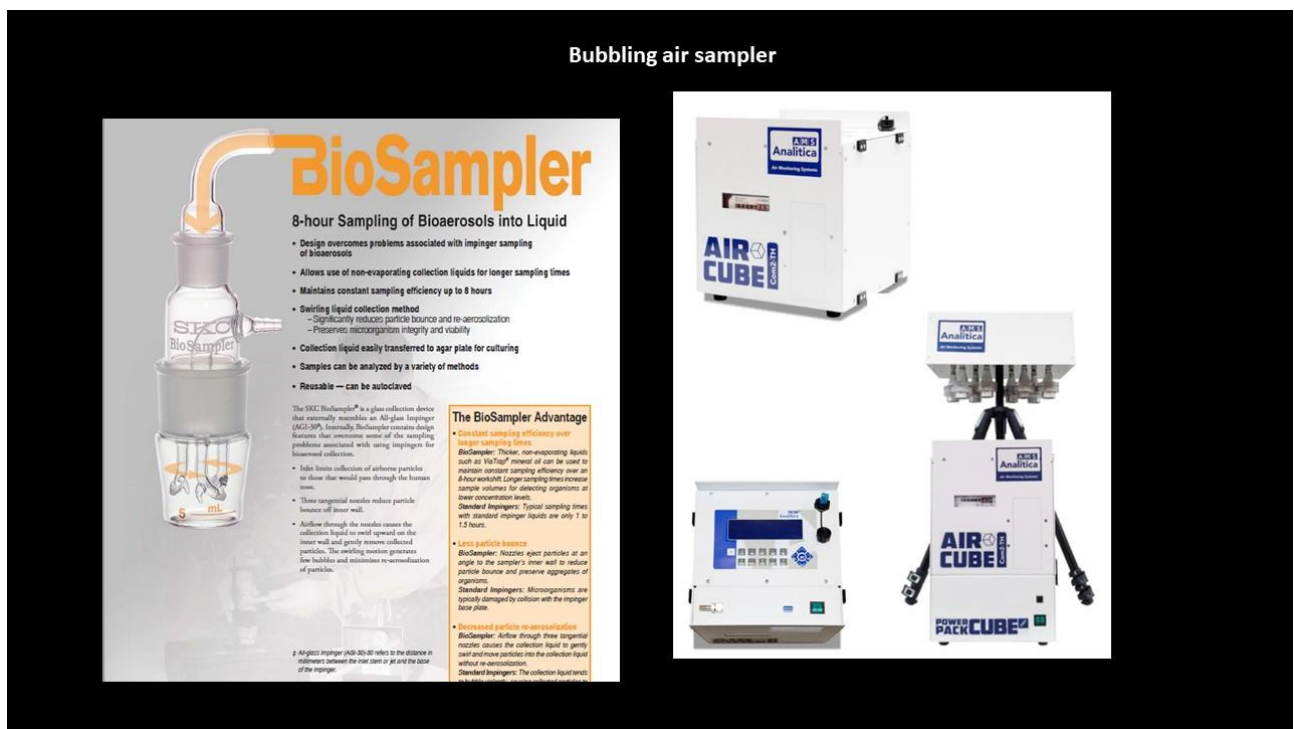
La procedura sperimentale utilizzata è uguale a quella correntemente utilizzata per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 e ne rispetta tutti i criteri qualitativi, di sensibilità, specificità ed accuratezza.

I campioni contenenti alte cariche di virus SARS-CoV-2 selvaggio sono stati utilizzati per generare aerosol aerodiffusibile convogliato in un in flusso d'aria canalizzato. Per la generazione dell'aerosol è stato utilizzato l'apparecchio Pro Farma RF7. Tale aerosol è normalmente utilizzato per veicolare farmaci nell'apparato respiratorio dei pazienti. 5 ml di campione sono stati utilizzati per generare aerosol nebulizzato per un tempo pari a 1 ora. L'aerosol generato è stato convogliato mediante tubi in plastica flessibile al campionatore a gorgogliatore. Il sistema è stato allestito sotto cappa di biosicurezza in modalità chiusa per evitare spargimenti e diffusioni accidentali del virus nell'ambiente (**Figura 9**).





Per la raccolta dell'aerosol generato è stato utilizzato un campionatore a gorgogliamento. Tale campionatore aspira con flusso costante definito l'aria contenente l'aerosol e lo immette con flusso turbolento in un ampolla di vetro contenente il liquido di conservazione e raccolta. Questa situazione riproduce il metodo di trasmissione delle malattie infettive aerodiffusibile in quanto anche l'acettore è costituito da un substrato liquido così come accade per la faringe umana la cui mucosa è ricoperta da fluido. Il flusso di aspirazione utilizzato è stato pari a 12,5 l/min. Il campionatore a gorgogliamento utilizzato è stato l' Air Cube Com 2-TH (AMS Analitica, Italia) (**Figura 10**).

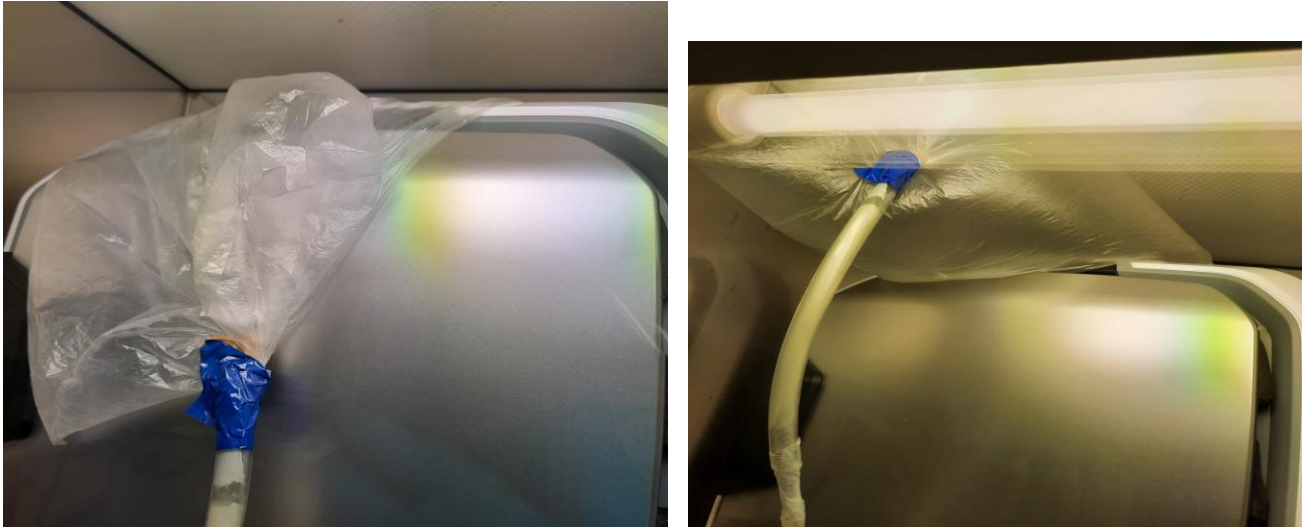


Per la generazione dei campioni positivi di riferimento, l'aerosol generato è stato canalizzato mediante tubi di polipropilene sigillati nelle giunzioni con gli apparecchi di generazione (aerosol) e raccolta (campionatore a gorgogliamento) che hanno posto in diretta connessione i due apparecchi.



E' stata quindi verificata la capacità del dispositivo di sanificazione in esame Fellowes AeraMax Professional™ (d'ora in poi riportato come "AeraMax™") di abbattere la carica virale aerodiffusa contenuta nell'aerosol generato. Per questo scopo il flusso di aerosol è stato canalizzato nelle bocchette di aspirazione del dispositivo. L'aria emessa è stata quindi raccolta in una sacca posta a rivestire e sigillare i margini dello strumento circostanti le griglie di emissione dell'aria processata. La sacca risultava sgonfia ad apparecchio spento e gonfia con apparecchio in funzione, permettendo così di controllare in modo diretto la corretta emissione del flusso di aria processata dallo strumento (**Figura 10-11** riferite a prove di allestimento del sistema in assenza di virus).





La macchina è stata impostata con settaggio manuale, velocità 5, ionizzatore spento.

La configurazione operativa del sistema allestito sotto cappa di biosicurezza in laboratorio BSL3 per la processazione dell'aerosol contenete SARS-CoV-2 È riportata nelle **Figure 12-14**.







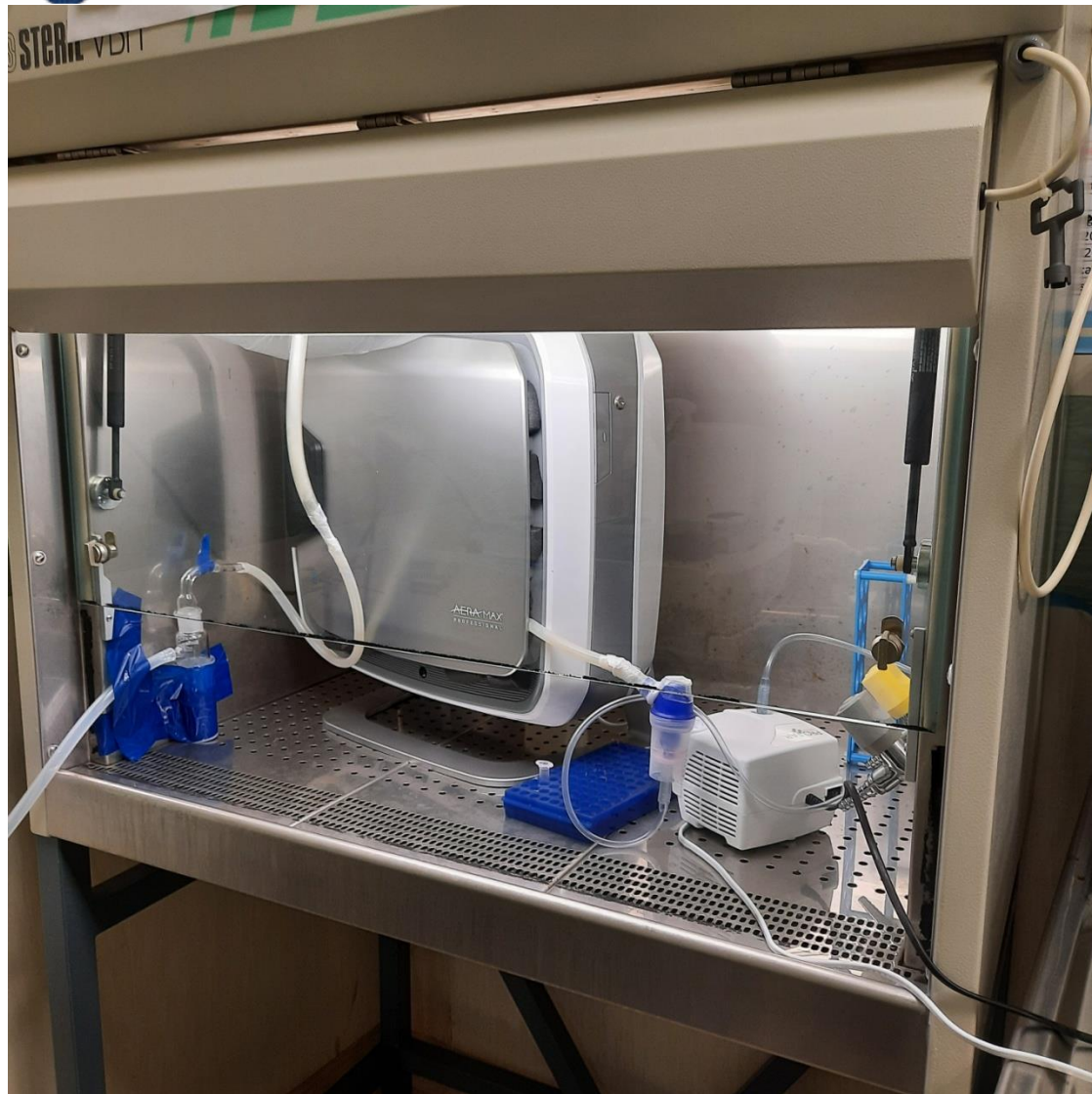
La reale immissione dell'aerosol all'interno dell'apparecchio di sanificazione è stata controllata anche visivamente (**Figura 15**).

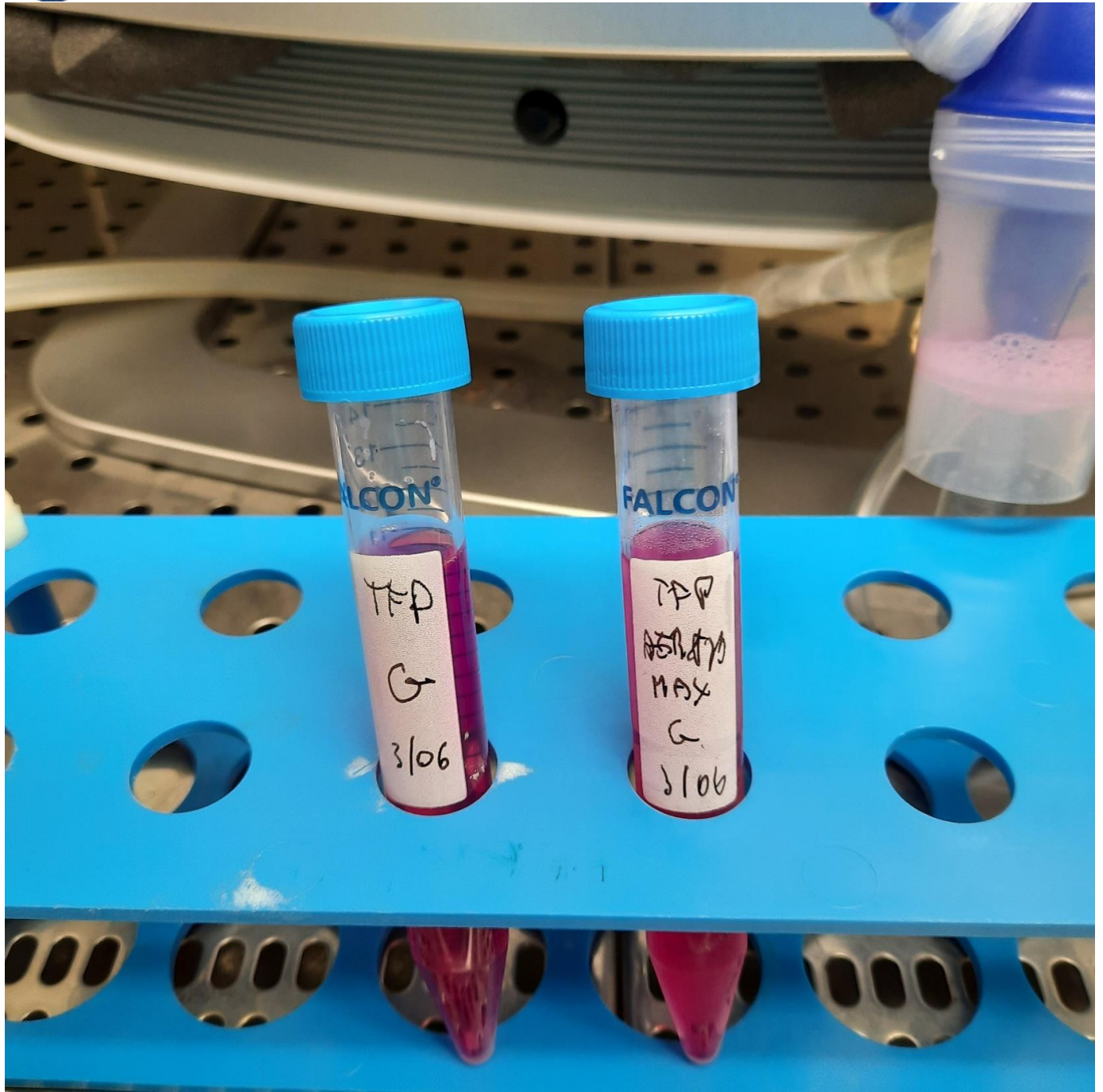




Sono stati quindi raccolti ed analizzati comparativamente due tipologie di campioni: (a) aerosol contenente SARS-CoV-2 senza processazione; (b) aerosol contenente SARS-CoV-2 processato da AeraMax™. I campioni sono stati raccolti in liquido di coltura cellulare DMEM (vol 10 ml) (**Figure 16-18**).





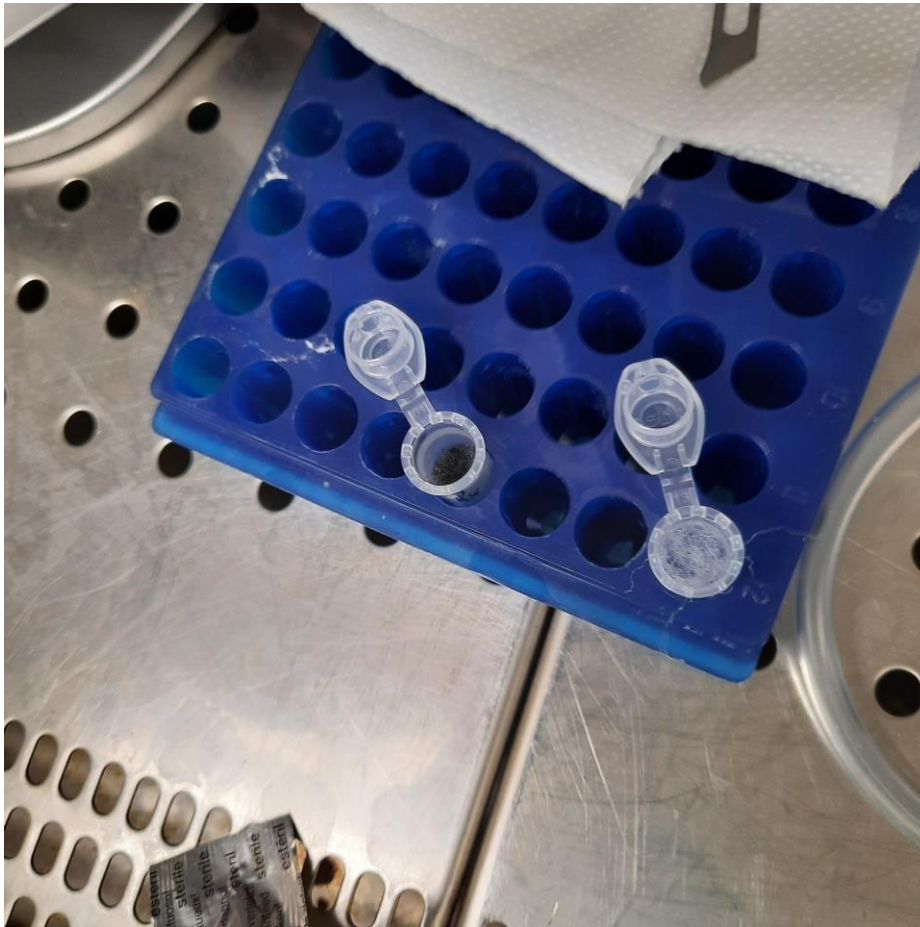


Al fine di verificare le dinamiche con cui l'apparecchio di sanificazione AeraMax™ interagisce con l'aerosol contenente il virus SARS-CoV-2, dopo l'utilizzo l'apparecchio è stato aperto e sono state campionati



mediante escissione con bisturi frammenti dei due filtri: rispettivamente prefilto nero (guarnizione in gommapiuma) e pre-filtro bianco (**Figure 19-21**).



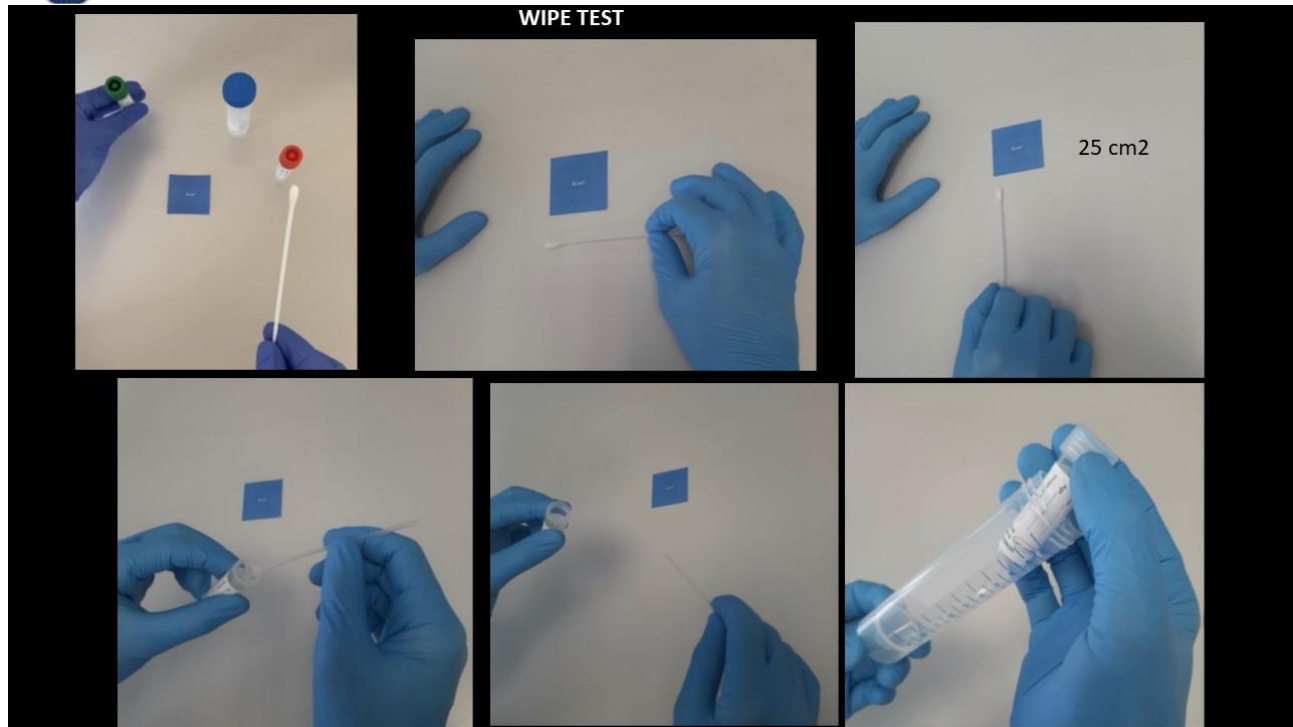


La presenza di virus nei frammenti raccolti è stata quindi valutata mediante challenge test con infezione di cellule suscettibili e PCR come precedentemente descritto.

Il limite del campionamento su frammento è di essere inferenziale. Viene infatti solo campionata una porzione del filtro e non il filtro nella sua interezza. Pertanto, al fine di ottenere una valutazione più complessiva relativa all'interazione con l'aerosol contenente virus di un'ampia porzione del terzo filtro HEPA (**Figura 22**), è stata applicato un campionamento mediante wipe test.



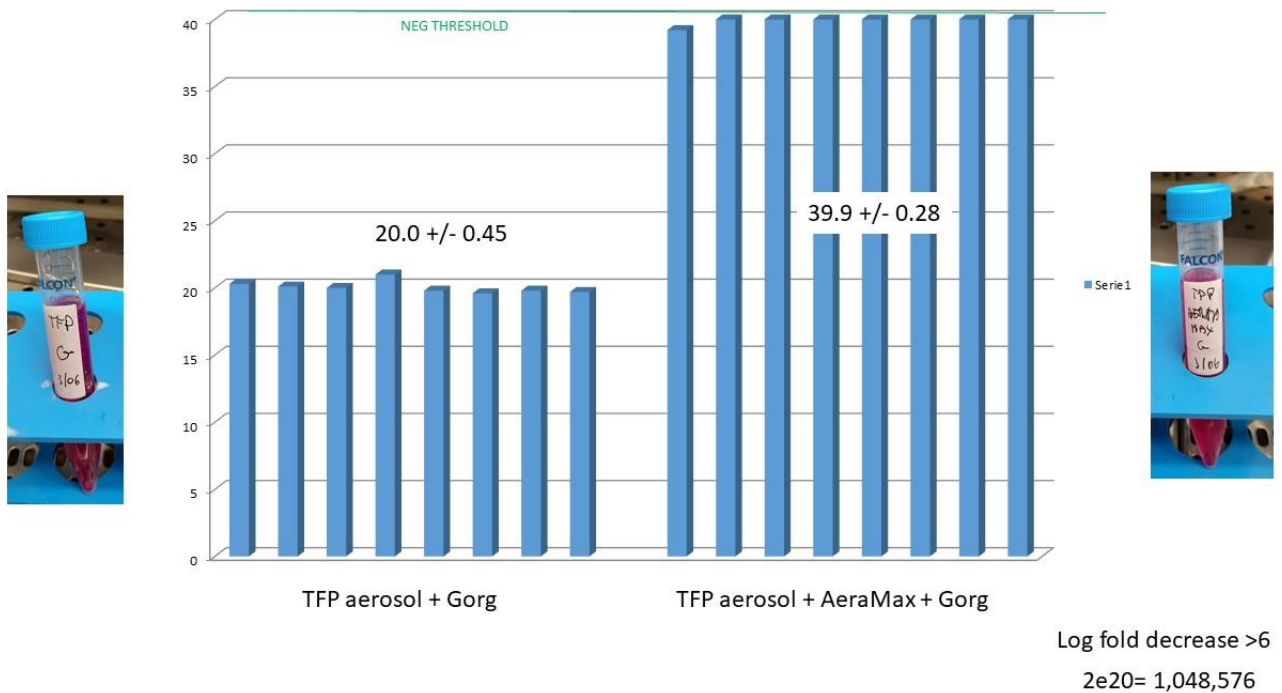
Wipe test è una procedura è usata correntemente per il campionamento ambientale di SARS-CoV-2. E' stato utilizzato un bastoncino ricoperto di fluff assorbente imbevuto in uno specifico tampone di raccolta (Biocomma, Hong Kong, Cina). Il tampone è stato fatto scorrere sul filtro e quindi direttamente utilizzato per la valutazione della presenza dell'RNA virale mediante PCR. La procedura di campionamento utilizzata è riportata in **Figura 20**.





RISULTATI

I valori del ciclo di positività PCR ottenuti nei campioni in esame è riportato in **Figura 21**.



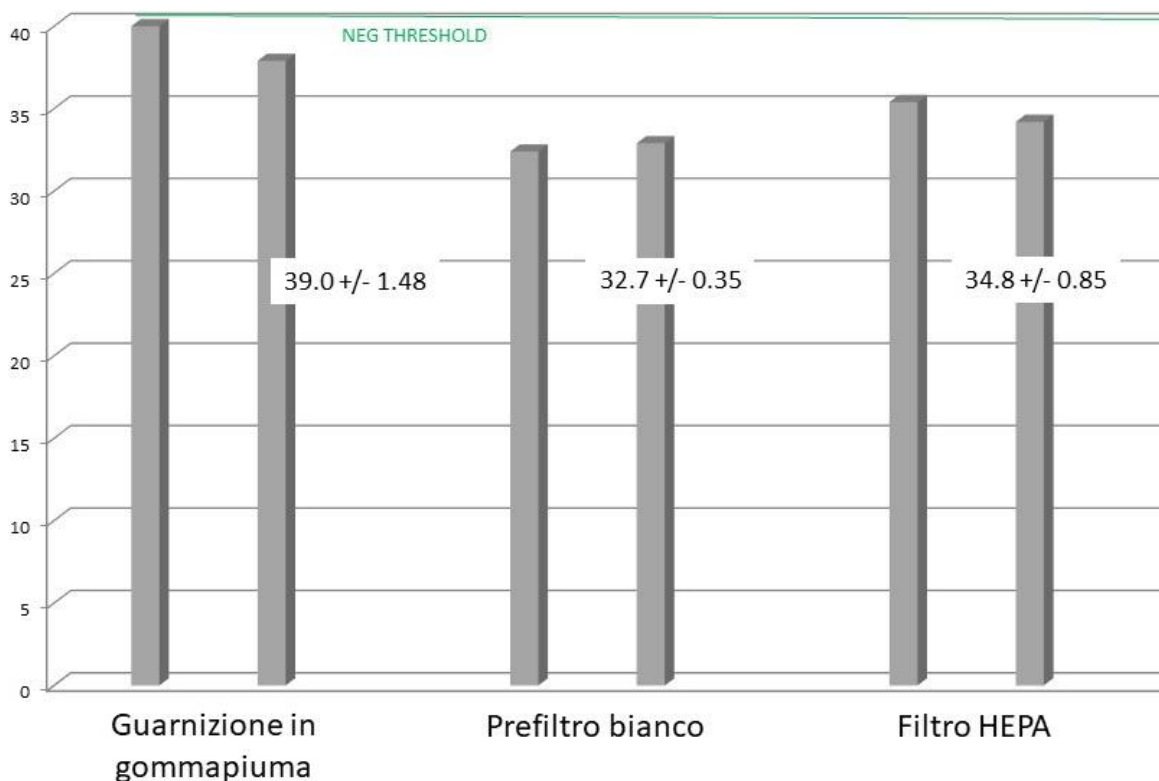
Ogni colonna fa riferimento all'analisi di un singolo campione. Sono stati analizzate due tipologie di campioni: (a) aerosol contenente SARS-CoV-2 senza processazione (8 colonne a sinistra in Figura); (b) aerosol contenente SARS-CoV-2 processato da AeraMaxTM (8 colonne a destra in Figura). Come riportato in Figura 21, ciascuno dei due campioni è stato analizzati in ben 8 replicati. L'altezza delle colonne riportate in Figura indica il valore del ciclo PCR di positività (asse verticale). Tanto maggiore è la carica virale tanto minore è il numero di cicli PCR necessari per rilevare il virus. Pertanto una maggiore carica virale corrisponde ad una minore altezza delle colonne e viceversa. Cariche virali molto elevate sono considerate quelle con positività intorno al ciclo 20. I campioni sono invece negativi (assenza di virus) se anche dopo 39 cicli di amplificazione il segnale della sonda non viene rilevato.



Il campione contenente in sospensione virus vivo selvaggio, trasformato in aerosol e raccolto mediante campionatore a gorgogliamento ha costituito il campione di riferimento positivo senza sanificazione. La carica virale di SARS-Cov-2 nel campione positivo in esame (colonne a sinistra in Figura 21) è risultata particolarmente elevata con una positività media al ciclo 20 (20 ± 0.45 , media \pm deviazione standard di 8 replicati).

La carica virale di SARS-Cov-2 dello stesso campione ma processato con AeraMax™ (colonne a destra in Figura 21) è risultata invece assente (positività media al ciclo 39.9 ± 0.28 , media \pm deviazione standard di 8 replicati).

Abbiamo quindi indagato quale fosse la componente dell'apparecchio in esame maggiormente in grado di intrappolare e trattenere il virus valutandone la carica virale sulle guarnizioni in gommapiuma nere, sul pre-filtro bianco e sul filtro a carboni attivi. I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 22**.





I risultati ottenuti indicano che la guarnizione in gommapiuma non ha un ruolo attivo nell'intrappolamento non venendo il virus rilevato in questa sede (ciclo positività PCR 39). Le successive componenti dell'apparecchio hanno invece entrambe un ruolo molto attivo nella captazione e nell'intrappolamento del virione infettante. Il virus viene infatti rilevato sia sul prefiltro bianco (ciclo positività PCR 32.7) che sul filtro HEPA (ciclo di positività PCR 34.8).

DISCUSSIONE

La sperimentazione effettuata ha riscontrato che l'apparecchio di sanificazione AeraMaxTM è in grado di abbattere completamente una carica virale aerodiffusa di virus SARS-CoV-2 selvaggio anche molto elevata con un solo passaggio d'aria.

Va notato che le condizioni sperimentali applicate sono state estreme. Abbiamo infatti utilizzato una carica virale estremamente alta (positività PCR al ciclo 20). Tale livello di positività si osserva solo nei pazienti estremamente contagiosi; tali livelli non sono ad esempio mai stati raggiunti nella nostra esperienza di laboratorio di diagnostica molecolare per Covid-19 nella seconda ondata pandemica quando le positività erano sempre superiori al ciclo 25 e molto spesso anche al 30. A titolo di confronto, i livelli di positività da noi rilevati nei reparti di degenza Covid-19 dell'Ospedale San Martino mediante monitoraggio ambientale con campionamento a gorgogliatore (uguale cioè a quello usato nel presente studio) non sono mai stati inferiori al ciclo PCR 32.

Inoltre, nella condizione di operatività ambientale sul campo, il Flugge emesso dal paziente non impatta direttamente ed in modo totale sull'apparecchio di sanificazione. Viene bensì notevolmente diluito nell'aria dell'ambiente prima di raggiungere la bocchetta di aspirazione. Invece, nella nostra situazione sperimentale, l'aerosol contenente l'elevata carica virale era convogliato in modo diretto e nella sua totalità all'interno dell'apparato di sanificazione. Tali considerazioni portano a concludere che l'apparecchio AeraMaxTM è stato valutato in condizioni operative estreme di laboratorio, certamente molto più critiche e difficili rispetto alla reale situazione ambientale. Ovviamente tale situazione era quella desiderata poiché è necessario che



l'efficacia di simili apparecchi di sanificazione sia testata in condizioni di criticità molto superiori a quelle reali al fine di garantirne la performance di efficacia.

Nonostante le condizioni estreme utilizzate, l'apparecchio di sanificazione è riuscito a neutralizzare in modo totale la carica virale aerodiffusa negativizzando il valore ciclo PCR rispetto al valore di 20 presente nel campione non sanificato. Dal punto di vista quantitativo questo risultato indica un'efficacia di abbattimento pari a 2^{20} e cioè pari a 1.048.576 (un milione quarantottomila cinquecentosettantasei). Pertanto l'entità della diminuzione della carica virale è superiore a $\log 6$ e cioè corrispondente al 99,9999%. Nelle condizioni sperimentali utilizzate, le uniche che permettono di valutare la capacità infettante del virus SARS-CoV-2 selvaggio, non è possibile riscontrare livelli superiori di inibizione poiché il delta osservato di 20 cicli tra il campione non trattato e quello sanificato è il massimo differenziale possibile.

Il risultato ottenuto è piuttosto sorprendente vista le piccole dimensioni del virione (<100 nm). Tuttavia va considerato che il virione è contagioso quando veicolato da Flugge, soprattutto se di grandi dimensioni. Pertanto il sanificatore esaminato, sebbene non dotato di filtri con pori di diametro inferiore ai 100 nm (che renderebbero peraltro impossibile la sanificazione di adeguate quantità di aria in tempi ragionevoli), abbatte in modo molto efficace il droplet e l'aerosol che permette a SARS-CoV-2 di concretizzare la sua catena di contagio. Tale abbattimento viene operato sia dal pre-filtro bianco che dal filtro a carboni attivi propriamente detto.

E' verosimile che la canalizzazione forzata del Flugge aerodiffuso all'interno dei filtri avvenga con moti fortemente turbolenti a causa della notevole velocità di flusso che l'apparecchio è in grado di realizzare e della potenza della sua ventola di aspirazione. Questa situazione fa sì che l'aerosol impatti in modo ripetuto e violento sulle pareti che rivestono la canalizzazione dei filtri. Inoltre tale canalizzazione appare particolarmente convoluta e non lineare. La presenza di canalizzazione convoluta e flusso turbolento fa sì che il Flugge si depositi in modo massiccio sui filtri e non riesca a superarli.

E' inoltre possibile che la elevata velocità e l'elevata turbolenza del flusso aereo, impattando sui materiali sintetici che costituiscono i filtri, generi in essi una carica elettrostatica negativa. Tale carica attrae in modo selettivo la componente recettoriale di SARS-CoV-2 denominata spike protein. Questa componente è infatti caratterizzata da una straordinaria elettrofilicità che la rende quindi particolarmente affine al legame con i substrati a carica elettrica negativa. In vivo questa situazione si verifica nell'interazione tra spike protein



virale (carica positiva) e recettore cellulare ACE2 (carica negativa). Nell'apparecchio di sanificazione in questione questa situazione si verifica nei rivestimenti dei filtri. E' quindi verosimile che la filtrazione effettuata dall'apparecchio non sia solo passiva ma anche attiva.

I due filtri dell'apparecchio sembrano agire in modo molto sinergico tra loro, essendo la carica virale trattenuta molto elevata sia sul primo che sul secondo filtro. Queste considerazioni spiegano la grande efficacia di abbattimento rilevata.

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che l'apparecchio esaminato AeraMax™ ha notevoli performance di abbattimento della carica virale contagiosa del virus SARS-CoV-2 umano selvaggio. Tale risultato è ottenuto grazie alla sinergia dei meccanismi operanti nell'apparecchio esaminato.

Pertanto tale apparecchio di sanificazione rappresenta un presidio particolarmente utile ed efficace quale misura di prevenzione aspecifica del contagio da malattie aerodiffusibili negli ambienti confinati, con specifico riferimento alla diffusione del virus SARS-CoV-2.

Genova 23/07/2021

Prof. ALBERTO IZZOTTI
MEDICO CHIRURGO
N° 11494