

PROTOCOLLO STUDIO
STUDIO SULL’EFFICACIA DEL SISTEMA DI FILTRAZIONE ELETTROSTATICO
“AEROK 1.0” PER LA SANIFICAZIONE DELL’ARIA

Versione n. 2 del 17 dicembre 2021

Promotore/Coordinatore:

Prof.ssa Antonella Agodi, Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie avanzate – “G.F. Ingrassia”, Università degli Studi di Catania; AOU Policlinico “G. Rodolico – San Marco”, Catania.

Sperimentatore Principale:

Prof.ssa Antonella Agodi, Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie avanzate – “G.F. Ingrassia”, Università degli Studi di Catania; AOU Policlinico “G. Rodolico – San Marco”, Catania.

Co-sperimentatori:

Prof.ssa Martina Barchitta, Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie avanzate – “G.F. Ingrassia”, Università degli Studi di Catania.

Prof.ssa Natalia Trapani, Dipartimento di Ingegneria elettrica, elettronica e Informatica, Università degli Studi di Catania

1. INTRODUZIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stabilito che la trasmissione delle infezioni da coronavirus - incluso il SARS-CoV-2 - avviene attraverso *droplets* che, per le loro dimensioni (diametro $\geq 5 \mu\text{m}$), viaggiano nell'aria per brevi distanze raggiungendo soggetti suscettibili e/o si depositano su oggetti e superfici che diventano a loro volta fonte di diffusione del virus. In questo caso, infatti, il contatto con tali superfici contaminate può costituire una via di trasmissione per contatto indiretto. Studi su coronavirus (ad es. SARS e MERS), suggeriscono che il tempo di reperimento dell'RNA virale sulle superfici, in condizioni sperimentali, oscilla da poche ore fino ad alcuni giorni (Van Doremalen et al. 2013; Otter et al. 2016; Lai et al. 2005) in relazione al materiale interessato, alla concentrazione, alla temperatura e all'umidità (Kampf et al. 2020). Allo stesso modo, studi recenti confermano la persistenza del virus SARS-CoV-2 su plastica e acciaio inossidabile, mostrando un decadimento esponenziale nel tempo simile alla persistenza di altri coronavirus. Un ulteriore studio (Chin et al. 2020) ha valutato la stabilità del virus SARS-CoV-2 a differenti temperature, dimostrando che il virus risulta altamente stabile a 4°C, ma sensibile al calore. Per la valutazione della contaminazione virale, ad oggi non sono disponibili indicatori standard, tuttavia, recenti evidenze suggeriscono la possibilità di utilizzare i livelli di contaminazione di *Torque Teno Virus* come indicatore di contaminazione virale nell'ambiente e nei pazienti (D'Arcy et al. 2014; Ekundayo et al. 2021; Atabati et al. 2020). In particolare, è stato dimostrato che i livelli di tale indicatore, dosati in campioni salivari, si riducono nei soggetti positivi a SARS-CoV-2 seguendo il naturale decorso clinico dell'infezione e della malattia (Mendes-Correa et al. 2021).

Nonostante sia ampiamente dimostrato che l'igiene delle mani costituisce sempre il punto cardine delle strategie di prevenzione e controllo delle infezioni, la pulizia regolare degli ambienti, la disinfezione delle superfici e la sanificazione dell'aria rivestono un ruolo cruciale nella prevenzione e contenimento della diffusione dei microrganismi inclusi i virus. In particolare, il monitoraggio della qualità dell'aria *indoor* e la sanificazione diventano strategie necessarie per migliorare la sicurezza di ambienti pubblici, quali le scuole, le università, gli ospedali e altri ambienti domestici e non. In questo scenario, la Aersafe SRL ha sviluppato e brevettato un dispositivo che vuole introdurre un'innovazione nel campo della sanificazione dell'aria, attraverso l'utilizzo di un elettrofiltro in rame dotato di un sistema di autolavaggio con acqua sterile e distillata. Infatti, il rame metallico utilizzato nell'elettrofiltro garantisce un'elevata azione biocida e antimicrobica. L'autolavaggio con acqua sterile, invece, elimina la necessità di pulire il filtro, minimizzando così il rischio di contaminazione ambientale o di contagio del personale. Al fine di ridurre ulteriormente al minimo gli interventi umani, viene utilizzata una tecnologia di sterilizzazione UV che consente di riutilizzare e riciclare l'acqua presente nel dispositivo nella massima sicurezza.

2. OBIETTIVI

Lo studio qui descritto si propone di valutare l'innovazione apportata dal prodotto "Aerok 1.0", misurando l'efficacia del dispositivo di filtrazione nel ridurre la contaminazione biologica in ambienti confinati di vita e di lavoro in attività, come i locali dell'Università degli Studi di Catania. In particolare lo studio si propone di valutare la presenza di SARS-CoV-2, di *Torque Teno Virus* quale indicatore di contaminazione virale e la relazione tra contaminazione virale dell'aria e quella individuale, e di caratterizzare eventuali variazioni nel microbioma dell'aria anche tenendo conto dell'esposizione a fattori di rischio e alla presenza del dispositivo di sanificazione dell'aria. Inoltre, sarà valutata qualitativamente e quantitativamente la presenza di SARS-CoV-2 e *Torque Teno Virus* in campioni salivari di studenti, operatori e docenti afferenti alla struttura dell'Università degli Studi di Catania individuata, per studiare la relazione tra contaminazione virale nell'aria e isolamento dei microrganismi negli individui volontariamente partecipanti.

3. METODOLOGIA

3.1 Disegno dello studio

Lo studio sarà condotto in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki. Sarà individuato un locale presso l'Università degli Studi di Catania adibito ad uso mensa, quale quello della Scuola Superiore dell'Università degli Studi di Catania, occupato da studenti, operatori e docenti, in cui sarà installato il dispositivo da testare che verrà fornito in comodato d'uso gratuito dalla Aersafe SRL che lo produce. Sarà effettuato il campionamento attivo microbiologico dell'aria, mediante lo strumento Sartorius, per la determinazione della presenza di SARS-COV-2, per la quantificazione di *Torque Teno virus* (indicatore di contaminazione virale) e per la caratterizzazione del microbioma, secondo le modalità descritte ai punti successivi. Inoltre, a ciascun soggetto che volontariamente frequenterà il locale individuato, dopo richiesta di consenso informato a partecipare allo studio, sarà richiesto di compilare un questionario *web-based* per la raccolta di informazioni relative alle proprie condizioni di salute, allo stato vaccinale e all'esposizione a fattori di rischio per l'infezione da SARS-CoV-2. Inoltre, a ciascun soggetto sarà richiesto il prelievo di campioni di saliva per la determinazione della presenza di SARS-CoV-2 e di *Torque Teno virus*. La partecipazione allo studio avverrà su base volontaria e i partecipanti non riceveranno alcun compenso. La fase di rilevazione dei dati epidemiologici nei soggetti e della contaminazione dell'aria avrà la durata di due settimane.

3.2 Raccolta dati

A ciascun soggetto afferente alla struttura in esame sarà somministrato un questionario *web-based* sviluppato *ad hoc* per la raccolta di informazioni relative alle condizioni di salute, allo stato vaccinale e all'eventuale esposizione a fattori di rischio per l'infezione da SARS-CoV-2. Il questionario sarà somministrato all'inizio e al termine delle due settimane dello studio. Inoltre, per ciascun

campionamento microbiologico dell'aria, saranno raccolti i dati relativi al numero di persone presenti nella sala, ai loro comportamenti in merito all'utilizzo di DPI, sistemi di ventilazione, apertura e chiusura porte, finestre, e altre informazioni utili a caratterizzare l'ambiente oggetto dello studio.

3.3 Campioni biologici

Per ciascun soggetto incluso, saranno prelevati due campioni salivari, all'inizio e al termine dello studio. I campioni salivari saranno ottenuti mediante tamponi di cotone Salivette® in accordo alle indicazioni della azienda produttrice. Il DNA e l' RNA virali saranno estratti mediante kit disponibili in commercio su un estrattore automatico e la quantificazione di Torque Teno Virus e di SARS-CoV-2 sarà effettuata mediante Real-Time PCR.

3.4 Modalità di trattamento e conservazione dei campioni biologici e trattamento dei dati personali

La Prof.ssa Antonella Agodi, Promotore dello Studio nonché titolare del trattamento, che ha proposto lo studio descritto, in accordo alle responsabilità previste dalle norme della buona pratica clinica (d.l. 211/2003), tratterà i dati personali, in particolare quelli sulla salute e, soltanto nella misura in cui sono indispensabili in relazione all'obiettivo dello studio, nonché gli altri dati raccolti esclusivamente in funzione della realizzazione dello studio. Inoltre, il Promotore redigerà il registro dei trattamenti come da art.30 Regolamento U.E. GDPR n. 679/2016.

I soggetti verranno identificati con un codice: i dati raccolti nel corso dello studio, ad eccezione del nominativo, saranno trasmessi al Promotore dello Studio, registrati, elaborati e conservati unitamente a tale codice. Soltanto i soggetti autorizzati potranno collegare questo codice al nominativo. I dati, trattati mediante strumenti anche elettronici, saranno diffusi solo in forma rigorosamente anonima, ad esempio attraverso pubblicazioni scientifiche, statistiche e convegni scientifici. La partecipazione allo studio implica che il Comitato etico e le autorità sanitarie italiane e straniere potranno conoscere i dati che riguardano le singole pazienti, contenuti anche nella documentazione clinica originale, con modalità tali da garantire la riservatezza dell'identità. Nel caso di trasferimento dei dati verso Paesi terzi, il Promotore si impegna a garantire livelli di protezione pari a quelli del Regolamento U.E. GDPR 679/2016 e dal D.Lgs. n. 101/2018. I soggetti arruolati potranno esercitare i diritti di cui all'art. 7 del Codice (es. accedere ai dati personali, integrarli, aggiornarli, rettificarli, opporsi al loro trattamento per motivi legittimi, ecc.) rivolgendosi direttamente al centro di sperimentazione e potranno interrompere in ogni momento e senza fornire alcuna giustificazione la partecipazione allo studio: in tal caso, i campioni biologici e correlati verranno distrutti. Non saranno inoltre raccolti ulteriori dati ferma restando l'utilizzazione di quelli eventualmente già raccolti per determinare, senza alterarli, i risultati della ricerca. Alla fine dello studio e comunque per non oltre 20 anni tutti i

campioni biologici raccolti verranno distrutti e non saranno utilizzati per scopi diversi da quelli dichiarati. I soggetti inclusi non riceveranno alcun compenso per la partecipazione allo studio.

3.5 Modalità di campionamento microbiologico

Il campionamento microbiologico dell'aria avverrà in un periodo complessivo di due settimane a diverse condizioni, come descritto di seguito.

Durante la prima settimana (lunedì, mercoledì e venerdì), verranno effettuati i campionamenti a strumento Aerok 1.0 spento. Ogni giorno saranno effettuati quattro campionamenti attivi di 20 minuti (flusso di 50 l/min) prima del servizio a locale vuoto, durante la colazione, durante il pranzo e durante la cena.

Nel corso della seconda settimana (lunedì, mercoledì e venerdì), verranno effettuati i campionamenti a strumento Aerok 1.0 acceso. Ogni giorno saranno effettuati quattro campionamenti attivi di 20 minuti (flusso di 50 l/min) prima del servizio a locale vuoto, durante la colazione, durante il pranzo e durante la cena.

Al termine della fase di campionamento, saranno quindi raccolti 24 campioni di gelatina (4 campionamenti per 6 giorni, tre a strumento spento e tre a strumento acceso). In ciascuna giornata di campionamento, si provvederà a raccogliere informazioni aggiuntive relative al numero di persone presenti nella sala, i loro comportamenti in merito all'utilizzo di DPI, sistemi di ventilazione, apertura e chiusura porte, finestre, ecc, come sopra descritto.

3.6 Gestione del campione microbiologico e estrazione acidi nucleici

Le gelatine saranno disciolte in 4-5 ml di acqua deionizzata e incubate in un termo-agitatore per 10 min a 37°C. In seguito, sarà prelevata un'aliquota (140 µl) inattivata con buffer AVL (560 µl). Dai campioni così ottenuti, saranno estratti l'RNA virale utilizzando il QIAamp Viral RNA mini-kit e il DNA utilizzando il QIAamp DNA mini kit (Qiagen).

3.7 Determinazione della presenza di SARS-CoV-2

La determinazione della presenza di SARS-CoV-2 sarà effettuata dall'RNA estratto dai campioni microbiologici mediante Real-Time PCR e Digital PCR (dPCR), utilizzando il ViroBOAR 4.0 RT-PCR Kit (SARS-CoV-2) (Eurofins Genomics) basato sulle sonde indicate dal *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

3.8 Quantificazione di Torque Teno Virus (indicatore di contaminazione virale)

La quantificazione di Torque Teno Virus sarà effettuata dal DNA estratto mediante Real-Time PCR utilizzando protocolli, primer e sonde precedentemente validati in letteratura (Ekundayo et al. 2021; Mendes-Correa et al. 2021).

3.9 Caratterizzazione del microbioma

Il DNA estratto dai campioni microbiologici, come precedentemente descritto, sarà anche utilizzato per la caratterizzazione del microbioma, sia in termini qualitativi che quantitativi. La caratterizzazione del microbioma sarà effettuata in *service*, mediante sequenziamento della regione 16S.

3.10 Dimensione Campionaria

L'end-point primario per il calcolo della dimensione campionaria è l'eventuale riduzione nei livelli di Torque Teno Virus nei campioni salivari al termine dello studio. L'ipotesi nulla è che non vi sia differenza nei livelli di Torque Teno Virus a strumento Aerok 1.0 spento e acceso. L'ipotesi alternativa, invece, prevede che vi sia una differenza media di 0.5 con una deviazione standard di 1. A tal fine, assumendo un potere statistico dell'80%, un livello di significatività di 0.05 e un attrition rate del 15%, sarà necessario reclutare 40 soggetti per rifiutare la suddetta ipotesi nulla e accettare quella alternativa.

3.11 Analisi statistiche

La statistica descrittiva sarà utilizzata per caratterizzare qualitativamente e quantitativamente ciascun momento, giornata e settimana di campionamento, attraverso il calcolo delle frequenze (percentuali), medie e deviazione standard, mediana e range. Per valutare l'efficacia dello strumento Aerok 1.0 nel sanificare l'aria *indoor*, saranno confrontati i dati raccolti a strumento spento nella prima settimana con quelli ottenuti a strumento acceso nella seconda settimana. I dati saranno confrontati con test parametrici e/o non parametrici in relazione alle variabili di interesse (presenza/assenza o variabili quantitativi). Inoltre, sarà effettuata un'analisi di correlazione tra i livelli di Torque Teno Virus nei campioni microbiologici dell'aria con i livelli misurati nei campioni salivari. Le analisi saranno condotte utilizzando il software SPSS v. 26 e a tutti i test sarà applicato un livello di significatività di 0.05.

4. FORNITURA APPARECCHIATURA E FONDI

Il sistema di filtrazione elettrostatico "Aerok 1.0" sarà messo a disposizione in comodato d'uso gratuito da Aersafe SRL e anche i costi relativi alle analisi saranno a carico della stessa Società, nell'ambito di una loro richiesta di collaborazione scientifica tra l'Università degli Studi di Catania, nell'interesse del Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie avanzate "G. F. Ingrassia" e Aersafe nell'ambito del Progetto "Studio sull'efficacia del sistema di filtrazione elettrostatico "AEROK 1.0" per la sanificazione dell'aria" per il quale la sottoscritta Prof.ssa Antonella Agodi ha manifestato interesse. Tale manifestazione di interesse e il relativo progetto è stato approvato dal Consiglio del Dipartimento "GF Ingrassia" nella seduta del 15 settembre 2021.

Lo studio non comporta alcun costo aggiuntivo a carico del Sistema Sanitario Nazionale e dell'Azienda.

5. RISULTATI ATTESI

I risultati attesi al termine dello studio permetteranno di valutare l'innovazione apportata dal prodotto "Aerok 1.0", in termini di efficacia del dispositivo di filtrazione nel ridurre la contaminazione biologica nei locali dell'Università degli Studi di Catania, attraverso la quantificazione di SARS-CoV-2, di *Torque Teno Virus* quale indicatore di contaminazione virale e mediante la caratterizzazione del microbioma.

5. BIBLIOGRAFIA

- Chin A.W. H., et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions *The Lancet Microbe* DOI:[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3) 2 aprile 2020
- D'Arcy N, Cloutman-Green E, Klein N, Spratt DA. Environmental viral contamination in a pediatric hospital outpatient waiting area: implications for infection control. *Am J Infect Control*. 2014 Aug;42(8):856-60. doi: 10.1016/j.ajic.2014.04.014. PMID: 25087137.
- Ekundayo TC. Prevalence of emerging torque teno virus (TTV) in drinking water, natural waters and wastewater networks (DWNWWS): A systematic review and meta-analysis of the viral pollution marker of faecal and anthropocentric contaminations. *Sci Total Environ*. 2021 Jun 1;771:145436. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145436. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33736166.
- Kampf G, et al. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents *J Hosp Infect*. 2020 Mar;104(3):246-51.
- Lai MYY, Cheng PKC, Lim WWL. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clinical Infectious Diseases* 2005;41(7):e67-e71.
- Mendes-Correa MC, Tozetto-Mendoza TR, Freire WS, Paiao HGO, Ferraz ABC, Mamana AC, Ferreira NE, de Paula AV, Felix AC, Romano CM, Braz-Silva PH, Leal FE, Grespan RMZ, Sabino EC, Costa SF, Witkin SS. Torquetenovirus in saliva: A potential biomarker for SARS-CoV-2 infection? *PLoS One*. 2021 Aug 24;16(8):e0256357. doi: 10.1371/journal.pone.0256357. PMID: 34428230; PMCID: PMC8384193.
- Otter JA et al. *The Journal of hospital infection*. 2016 Mar;92(3):235-50. tabati E, Dehghani-Samani A, Mortazavimoghaddam SG. Association of COVID-19 and other viral infections with interstitial lung diseases, pulmonary fibrosis, and pulmonary hypertension: A narrative

review. *Can J Respir Ther.* 2020 Nov 26;56:1-9. doi: 10.29390/cjrt-2020-021. PMID: 33274259; PMCID: PMC7690312.

- Van Doremalen N et al. *Eurosurv.* 2013 Sep 19;18(38).