

Az antivírussal bevont olvadékfűvott rost SARS-CoV-2 elleni értékelése

Levéljelentés

az Aurabeat Technology Limited részére

2020. szeptember 4.

Roger Sze To
Pak Shek Kok, Hong Kong

Science Park W Ave
651, 6/F., 19-es épület

Tárgy: MRIGlobal Projekt azonosító: 311664.01.001. Végző jelentés

Kedves Mr. Sze To:

Az MRIGlobal örömmel küldi el Önnek az Aurabeat Technology Limited részére készült levéljelentést, melynek címe „Az antivírussal bevont olvadékfűvott rost SARS-CoV-2 elleni értékelése”. A projekt célja annak a kiderítése volt, hogy a Media szűrő Vírusfilter AG+™ vírusellenes légszűrő technikával ellátva képes-e *in vitro* meggátolni a SARS-CoV-2 növekedését. 200 µl vírustörzset adtunk hozzá kontrollként az X bevonattal ellátott vagy bevonat nélküli olvadékfűvott rost kuponokhoz. 30 perc elteltével a kuponokról begyűjtöttük a vírusokat (ha voltak) és Vero E6 sejtekhez adtuk őket. Majd 5 nappal a tesztelés után megvizsgáltuk őket, hogy mutatnak-e citopátiás hatásokat (CPE). Citotoxicitást az X kezeléskor tapasztaltuk, a kontroll mintáknál azonban nem. A citotoxicitást követő 30 perc elteltével nem figyeltünk meg CPE-t az X-kezelte minták mintáinál.

1. Eredmények összefoglalása

A 311664.01.001 számú projekt célja annak a kiderítése volt, hogy a Media szűrő Vírusfilter AG+™ vírusellenes légszűrő technikával ellátva képes-e *in vitro* meggátolni a SARS-CoV-2 növekedését. Az MRIGlobal a vírus USA-WA1 / 2020 törzset használta fel, amelyet a BEI Resources-tól szereztek be (NR-52281). Ez Vero E6 sejtekkel lett szaporítva (ATCC CRL-1586), továbbá ezek a sejtek a semlegesítési vizsgálat során is felhasználásra kerültek. A Vero E6 sejteket 5% FBS-sel (Fetal Bovine Serum- magzati szarvasmarha szérum) és PSN-vel (penicillin, sztreptomycin és neomicin) kiegészített Dulbecco-féle Eagle tápközeg / F12-ben tenyésztettük.

A Vero E6 sejteket a vizsgálatot megelőző napon 96 üregű lemezekre szétterítettük és hagytuk őket ~60-70% keresztesztetésig növekedni. A vizsgálat napján az olvadékfűvott rost kuponok beoltottuk 200 µl vírusállománnyal és 30 percig állni hagytuk őket egy biológiai biztonsági szekrényben. A 30 perc elteltével 2 ml DMEM / F12 táptalajt adtunk a kuponokhoz és a vírus újraszuszpendálásának elősegítése érdekében sejtkaparóval enyhén összekarcoltuk a sejteket. Egy üres 96 üregű lemezre mintákat helyeztünk és 1: 10 arányban hígítottuk a lemezen DMEM / F12-ben. Ezeket a hígításokat ezután egy Vero sejtlemezre vittük, eltávolítva a táptalajt. Minimum 15 perc elteltével FBS-sel kiegészített DMEM / F12-et adtunk a sejtekhez, hogy tápláljuk őket a következő 5 napban. Ez a legalább 15 perces

inkubációs periódus lehetővé teszi a vírus felszívódását a sejtekben az FBS beavatkozása nélkül. A tesztek citotoxicitási ellenőrzését vírus hozzáadása nélkül is elvégeztük. A vizsgálatot minden esetben öt ismétléssel végeztük el.

5 nap elteltével a sejteket megvizsgáltuk a vírus jelenlétével és replikációjával járó citopátiás hatás (CPE) jelenlétére. A vizsgálatot mikroszkóp segítségével végezzük (10-szeres objektív a teljes megtekintéshez) és a sejtek alakjának megfigyelésével. Az egészséges Vero sejtek kissé átlátszóak, csípett vagy lekerekített végekkel rendelkeznek, a sejtek között alig vagy egyáltalán nincs hely. A CPE-t mutató elhalt sejtek gyakran nem tapadnak a lemezre, kerekük és sokkal kisebbek, mint az élő sejtek. Jelentős üres hely látható a lemez alján, ahol a sejtek leváltak a felszínről. Bármely, a CPE-t megjelenítő mélyedés pozitívnak minősül, függetlenül attól, hogy az egész, vagy csak egy kis része érintett-e, mert ez az életképes vírus jelenlétére utal.

Az X-kezelt kuponokból kinyert minták első hígításakor citotoxicitást figyeltek meg. Amikor a táptalajt hozzáadták az X kuponokhoz, vörös színről lilára változott, ami a pH emelkedésére utal. A kontrollmintákon nem figyeltek meg citotoxicitást. Mivel a citotoxikus hatások megszűnése után nem figyeltek meg CPE-t, nem tudjuk biztosan megmondani, hogy volt-e vírus a mélyedésekben, amelyek citotoxicitást mutattak, ez pedig korlátozza a vírusredukció számszerűsítését ezekben a mintákban. Az 5. nap olvasásai nem mutattak CPE-t egyetlen teszten sem. Az összes nem fertőzött kontroll egészséges maradt és az 5 napos megfigyelési időszak alatt nem mutatott CPE-t. Az 1. táblázat ezeket a megfigyeléseket összegzi. Az eredményeket a Reed & Muench kalkulátor segítségével számítottuk ki (amit a BD Lindenbach gyártott: „Sejtkultúrában és in vivo termelt HCV fertőzőképesség mérése”. Methods Mol Biol. (2009) 510: 329-36). Az eredményeket Log csökkentéssel mutatjuk be az időzített kontrollokhoz, valamint a SARS-CoV-2 fertőzőképesség százalékos csökkenéséhez viszonyítva.

1. táblázat: A SARS-CoV-2 in vitro semlegesítésének eredményei bevont olvadékfúvott rostokkal.

Minta neve	Kapcsolat ideje (perc)	TCID50	Log10 TCID50	Átlagos TCID50	Átlagos Log10 TCID50	A víruskontrollok Log csökkentése	Százalékos Log csökkenés
X30-1	30	31.62	1.50	31.62	1.50	3.33	99.95%
X30-2	30	31.62	1.50				
X30-3	30	31.62	1.50				
C30-1	30	50118.72	4.70	75376.66	4.83		
C30-2	30	125892.54	5.10				
C30-3	30	50118.72	4.70				

A kísérlet alapján arra a következtetésre juttottunk, hogy az X kezeléssel bevont olvadékfúvott rost nagyon hatékonyan gátolja a Vero sejtek SARS-CoV-2 fertőzését. Fontos megjegyezni, hogy az X kezeléssel megfigyelt citotoxicitás korlátozza a vírus számát a legnagyobb koncentrációban, ezért nem mondható el, hogy volt-e vírus azokban a mintákban, amelyek citotoxicitást mutattak.