

Milano, 9. juuli, 2020

Tegevuse aruanne

RASKEKIJULISE ÄGEDA RESPIRATOORSE SÜNDROOMI KORONAVIIRUS 2 (SARS-COV-2) KVANTIFIKATSIOON PÄRAST VOLFRAMTRIOKSIIDIL (WO₃) PÕHINEVAT FOTOKATALÜÜTILIST TÖÖTLUST

Katseasutus

Viirusliku patogeneesi ja bioturbe üksus

San Raffaele Haigla, Milano

Uuringu juht

Elisa Vicenzi, PhD

Ospedale San Raffaele S.r.l.
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

Via Olgettina 60 – 20132 Milano (MI) | Tel. +39 02.26431 | info@hsr.it
C.F., P.IVA e Reg. Imp. Milano 07636600962 – C.C.I.A.A. 1972938
Capitale Sociale € 60.817.200 i.v.

www.hsr.it

Sistema Sanitario  Regione
Lombardia



UniSR
Università Vita-Salute
San Raffaele

Selle uuringu eesmärk oli hinnata, kas WO_3 -põhine fotokatalüütiline süsteem inhibeerib SARS-CoV nakkavust. Fotokatalüsaator pandi metallist võrkfiltrile, et võimaldada vedelfaasis katsetamist. Peale selle lisati metalli nanoklastritel (CuN_h) põhinevas vaselahuses leotatud puuvillane kangas, et parandada SARS-CoV-2 inaktiveerimist.

San Raffaele haigla viirusliku patogeneesi ja bioturbe üksuse labor sai NANOHUBilt kolm seadet. COVID-19 patsiendi ninaneelust vatipulgaga võetud proovi SARS-CoV-2 isolaat Vero rakkudes¹ inokuleeriti konkreetselt tellija kujundatud seadmetes.

Viirusvaru lahjendati 1:100, et saada 80 ml viiruse suspensiooni teoreetilise nakkavustitriga $2,2 \times 10^5$ lüüsilaike moodustavat ühikut (PFU) /ml. Viiruse suspensioon viidi seadmesse selle pealt ja alikvoote koguti alt 10 minuti kuni ühe tunni pärast. Viiruse suspensiooni testiti nakkusliku viiruse tiitrite suhtes lüüsilaiigu testiga Vero rakkudes ja viiruse RNA kvantifitseerimisega reaallaja PCRiga.

Vero rakud plaaditi 24-augulistele plaatidele, $2,5 \times 10^5$ rakku igasse auku EMEM söötmesse, millele oli lisatud 10% (v/v) vasika loote seerumit (täissööde). Rakke infitseeriti 24 tundi hiljem inaktiveerimisseadmest mitme ajavahemiku tagant kogutud viirusega. 10,15, 20, 30 ja 60 minuti pärast kogutud viiruse seerialahuseid (1:10 alates lahjendamata kuni 10^{-5}) testiti kahekordselt.

Pärast inkubatsiooniperioodi (1 tund 37 °C juures) supernatandid eemaldati ja 500 µl metüülselluloosi (1%, p/v) lisati igasse auku täissöötmel. Kolme päeva pärast fikseeriti rakud formaldehüüdiga 6% (v/v) soolalahusega, puhverdati fosfaadiga ja värviti 1% (p/v) kristallvioletsega 70% (v/v) metanoolis.

Lüüsilaike loendati stereoskoop-mikroskoobiga (SMZ-1500, Nikon).

Viiruse tiitri arvutus lüüsilaike moodustavates ühikutes (PFU/l) määrati lüüsilaiikude loendamisega aukudes, kus oli alla 100 lüüsilaiigu, ja korrutati see väärtusvastava lahjendusteguriga.

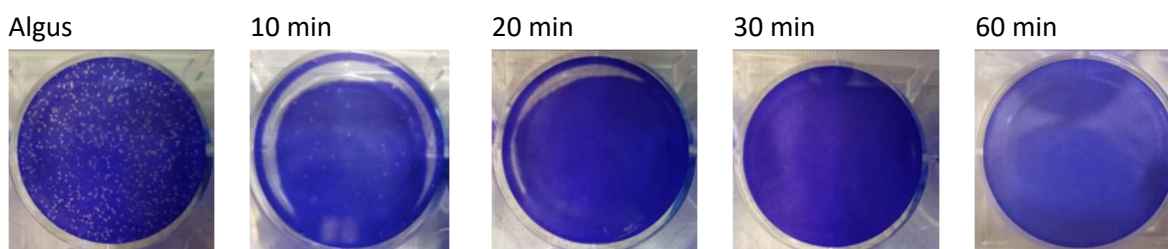
Kogutud materjali testiti järgmise suhtes:

1. Nakkusliku viiruse tiitrite inaktivatsioon lüüsilaiigu testiga Vero rakkudes
2. SARS-CoV-2 genoomi kvantifikatsioon reaallaja PCRi kaudu

1. Viiruse nakkavuse tulemused (ühikutes PFU/ml) on kokkuvõtlikult esitatud järgmises tabelis.

Ajavahemik, minutit	Katse 1	Katse 2	Katse 3
0	12,200	13,766	11,683
10	Määramata	283	30
15	2000	Määramata	Määramata
20	Määramata	30	30
30	0	0	0
60	0	0	0

Tulemused on lüüsilaiuga testiga saadud väärtuste keskmised



Lüüsilaiude moodustumine alguses ja pärast ülalpool kirjeldatud aega.

2. SARS-Cov-2 genoomi kvantifikatsioon reaalaja PCRiga.

Viiruse RNA eraldati erinevates ajapunktides kogutud materjalist. Järgmisena viidi läbi reaalaja PCR, et määrata kindlaks pärast inaktiveerimist leiduvad viiruse RNA koopiad. RNA kvantifikatsioon viidi läbi Cloniti (Milaano) Quanty COVID-19 komplektiga – komplektis on viiruse RNA standardne viiteköver teadaoleva koopiate arvu juures. SARS-CoV-2 sihtgeen oli nukleokapsiid (N).

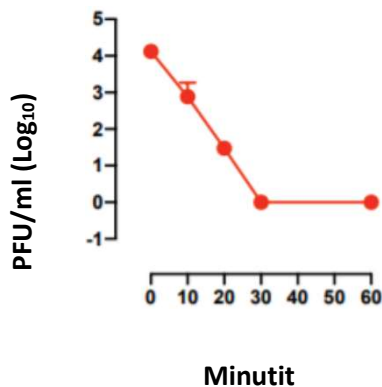
Ajavahemik, minutit	Katse 1	Katse 2	Katse 3
0	7 253 850	8 718 142	10 909 490
10	Määramata	3 337 014	5 400 451
15	1 641 266	Määramata	Määramata
20	Määramata	1 972 495	4 433 552
30	1 910 394	1 097 204	2 783 446
60	165,987	243,029	669,995

Tulemused on väljendatud viiruse RNA/ml koopiate arvuna.

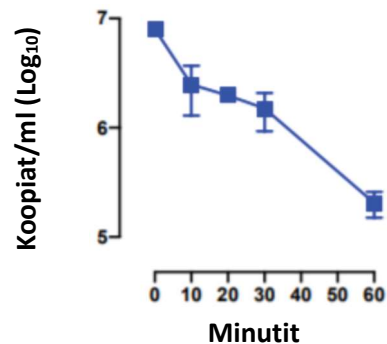
Kokkuvõttev diagramm

Vasak paneel kujutab viiruse nakkavuse inaktiveerimise kineesi, mõõdetuna lüüsilaiigu testiga (andmed on ühikutes PFU/ml), parem paneel kujutab viiruse RNA inaktiveerimise kineesi, mõõdetuna reaalkva kvantitatiivse PCRiga.

Nakkav viirus



Viiruse RNA



Ospedale San Raffaele S.r.l.
 Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

Via Olgettina 60 – 20132 Milano (MI) | Tel. +39 02.26431 | info@hsr.it
 C.F., P.IVA e Reg. Imp. Milano 07636600962 – C.C.I.A.A. 1972938
 Capitale Sociale € 60.817.200 i.v.

www.hsr.it

Kokkuvõte ja lõppmärkused

NANOHUBi seade inaktiveerib kiiresti SARS-CoV-2 nakkuskoormuse. Kümme minutit pärast töötlemist täheldati nakkusliku tiitri vähenemist 98,2% ja 100% inaktiveerimine saavutati kõigest 30 minuti pärast.

Lisaks testiti viiruse RNA leidumist inokulaadis reaalaja PCRi kaudu. Viirusliku RNA koormuse ja nakkusliku tiitri paralleelne kvantifitseerimine andis suhte 1000:1, s.t 1000 viiruse RnA molekuli on vaja ühe nakkava osakese saamiseks. Need andmed kinnitavad ja laiendavad meie varasemat tähelepanekut SARS-CoV^{2,3} kohta, mille alusel saab oletada defektsete virionide tohutut hulka nakkuslike üle. NANOHUBi seade suudab siiski vähendada RNA koormust ligikaudu 1,5 log₁₀, mille alusel saab oletada, et meie fotokatalüüsi süsteem mõjutab virioni terviklikkust isegi selle genoomses komponendis, kuigi vähem tõhusalt võrreldes nakkavusega.

Viited

1. Mycroft-West C. J., Su D., Pagani I. jt. Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the surface protein (spike) S1 receptor binding domain with heparin. *bioRxiv* 2020.
2. Vicenzi E., Canducci F., Pinna D. jt. Coronaviridae and SARS-associated coronavirus strain HSR1. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**(3): 413-8).
3. Pacciarini F., Ghezzi S., Canducci F, jt. Persistent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in human tubular kidney cells selects for adaptive mutations in the membrane protein. *J Virol* 2008; **82**(11): 5137-44).

Dr Elisa Vicenzi,



viirusliku patogeneesi ja bioturbe üksuse juhataja

Ospedale San Raffaele S.r.l.
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

Via Olgettina 60 – 20132 Milano (MI) | Tel. +39 02.26431 | info@hsr.it
C.F., P.IVA e Reg. Imp. Milano 07636600962 – C.C.I.A.A. 1972938
Capitale Sociale € 60.817.200 i.v.

www.hsr.it

Sistema Sanitario  Regione
Lombardia



UniSR
Università Vita-Salute
San Raffaele