



Medizinische Universität Graz

Diagnostik & Forschungszentrum für

Molekulare BioMedizin

Diagnostik & Forschungs- (D&F) Institut für Pathologie

Innova Solutions GmbH
Siemensstraße 6,
88048 Friedrichshafen,
Deutschland

Univ. Prof. Dr. Kurt Zatloukal
Mag. Dr. Martina Loibner
Medizinische Universität Graz
Diagnostik und Forschungsinstitut für Pathologie
Neue Stiftingtalstraße 6
8020 Graz
kurt.zatloukal@medunigraz.at
martina.loibner@medunigraz.at

Zusammenfassung / Wirksamkeit von Fog-it Plus SF gegen SARS-CoV-2

Das Produkt: Fog-It Plus SF wurde auf seine Wirksamkeit gegen das Virus SARS-CoV-2 / Human 2019-nCoV auf unterschiedlichen Materialien getestet.

Die Ausbringung von Fog-It Plus SF erfolgte durch Vernebelung von 1100ppm Fog-It Plus SF in der Sprühschleuse des BSL-3 Hochsicherheitslabors am Diagnostik- und Forschungsinstitut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz / Österreich.

Bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten und nachfolgender Inkubation über 72 Stunden wurden bei allen Proben, die auf einer Polystyrol-Matrix aufgebracht wurden Ct Werte von 36,3 bis 39,2 und höher detektiert (siehe Abbildung 2 des beigefügten Berichtes). Laut den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) werden Ct Werte ab 34 als SARS-CoV-2 negativ gewertet.

Im Vergleich dazu reduziert sich der Ct Wert der unbehandelten Probe von 27 auf 20 und weist somit eine Virusvermehrung auf. Dies ist gleichzeitig ein Nachweis dafür, wie viele vermehrungsfähige Viren eingesetzt wurden.

Somit wurde in diesem Experiment im Vergleich zu den unbehandelten Viren durch 1100ppm Fog-It Plus SF Vernebelung eine Reduktion von SARS-CoV-2 Viren von >14 Ct Werten erzielt, was einer Inaktivierung um einen Faktor von mehr als 1.10^4 entspricht.

Für die Prüfergebnisse im Detail siehe den im Anhang befindlichen Bericht.

Graz, am 16.07.2020


Univ. Prof. Dr. Kurt Zatloukal

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ
Institut für Pathologie
Med-Campus
A-8010 Graz, Neue Stiftingtalstraße 6


Dr. Martina Loibner

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, 8036 Graz, www.medunigraz.at

Die Wirksamkeit von Fog-it Plus SF wurde gegen folgenden Virusstamm getestet:

Human 2019-nCoV Isolate

Product Description Ref-SKU: 026V-03883 infectious cell culture supernatant of human 2019-nCoV
Product Risk Group: RG3 ICTV Taxonomy: ssRNA(+) / Nidovirales / Coronaviridae / Coronavirinae / Betacoronavirus
Virus name: Human 2019-nCoV ex China Strain: BavPat1/2020 Isolate: Germany ex China

Aus der Stocksolution aus $2,2 \times 10^6$ PFU/ml of Human 2019-nCoV Isolate wurde ein Virusarbeitsstock auf VeroE6 Zellen in serumfreiem Medium angezüchtet und für die folgenden Experimente verwendet.

Vernebelung von Fog-it Plus SF (Chlordioxid, 2200ppm) in einer Sprühschleuse (PEA Pharma- und Elektrotechnik- Anlagenbau GmbH, Neuwieder Str. 80, 56566 Neuwied, Deutschland)

Volumen der Probenschleuse: $0,32 \text{ m}^3$
Vernebeltes ClO_2 : 200 ml in 30 sec

Da SARS-CoV-2 laut WHO in Risikogruppe 3 eingestuft ist und mit Virusisolaten und hochkonzentrierten Viruskulturen getestet werden muss, wurden alle Arbeiten mit aktiven Viren unter BSL-3 Laborbedingungen und erhöhtem Personenschutz aufgrund des Übertragungsweges durch Tröpfchen und Aerosole am Diagnostik und Forschungsinstitut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Durchführung der Analysen

1) Virussuspension auf Latexmatrix.

50µl Virussuspension wurden auf eine Matrix (Latexhandschuh, 2-3 cm Durchmesser) aufgetragen, mit der Pipettenspitze gut verteilt, in der Laminar Air Flow Werkbank 5 min angetrocknet und danach in der Sprühschleuse der Fog-it Plus SF Vernebelung für 5 min ausgesetzt. Jeweils drei voneinander unabhängige Proben wurden mit 2200ppm, 1100ppm und 550ppm Fog-it Plus SF vernebelt.

Die Matrizes wurden nach der Behandlung mit Fog-it Plus SF Vernebelung in 1 mL kaltes Zellkulturmedium in ein Reaktionsgefäß gelegt und 1 min gevortext. Davon wurden Proben für die Virus-RNA Isolierung und anschließende qRT-PCR entnommen (Virusinput-Wert) und das restliche Aliquot zur Überprüfung der Infektionsfähigkeit an VeroE6 Zellen in 48 Well Platten verwendet und 1 h inkubiert. Das Infektionsmedium wurde nach 1 Stunde entfernt und die Zellen 3x mal mit PBS gewaschen.

2) Virussuspension auf Polystyrolmatrix.

20µl Virussuspension und eine 1:10 verdünnte Virussuspension wurden auf eine Polystyrolmatrix (2-3 cm Durchmesser) aufgetragen, mit der Pipettenspitze gut verteilt und in der Laminar Air Flow Werkbank 10 min angetrocknet. Davon wurden jeweils 2 biologische Replikate hergestellt. Diese Proben wurden in der Sprühschleuse der Vernebelung von Fog-it Plus SF 1100ppm für 10 min ausgesetzt. Die Oberflächen jeder Probe wurden mit je 1ml Zellkulturmedium gespült. Von dieser Spüllösung wurden Proben für die Virus-RNA Isolierung und qRT-PCR entnommen (Virusinput Wert) und das restliche Aliquot wurde zur Überprüfung der Infektionsfähigkeit an VeroE6 Zellen in 48 Well Platten verwendet. Die virushältige Spüllösung wurde nach 1 Stunde entfernt und die Zellen 3x mal mit PBS gewaschen.

3) Analyse der Virusvermehrung mittel qRT-PCR (für beide Ansätze):

Nach dem Waschen mit PBS wurde frisches Zellkulturmedium auf die Zellen aufgetragen. Aus diesem wurde der t 0 Wert entnommen. Nach 72 Stunden Inkubation wurden weitere 140 µL Mediumüberstand entnommen und ein Virusnachweis mittels qRT-PCR durchgeführt, wobei die Differenz zwischen t 72 h und dem Virusinput Wert der Virusvermehrung bei Ct Wert-Reduktion, bzw. Virusreduktion bei Ct Wert-Erhöhung entspricht.

Die RNA Isolierung wurde mit folgendem von der CDC empfohlenem Extraktionskit durchgeführt:

QIAamp® Viral RNA Mini Kit

Die qRT-PCR wurde mit folgendem von der CDC gelistetem Primerset und mittels QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit am Rotor Gene Q durchgeführt:

2019-nCoV_N1-F 2019-nCoV_N1 Forward Primer 5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'

2019-nCoV_N1-R 2019-nCoV_N1 Reverse Primer 5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'

2019-nCoV_N1-P 2019-nCoV_N1 Probe 5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3' FAM, BHQ-1

Ergebnisse:

Ad 1) Virussuspension auf Latexmatrix.

Die eingesetzte Virusmenge (Positivkontrolle pos Ko, Virusinput) mit Ct Wert 17 erreicht nach 72 Stunden durch aktive Virusvermehrung einen Ct Wert von 13. Die eingesetzten Virusmengen (Virusinput t0) der behandelten Proben weisen einen Ct Wert von 20 bis 22,5 auf (siehe Abbildung 1 unten). Die nach 72 Stunden nachgewiesenen Viruspartikel werden bei Ct Werten von 28,6 bis 30,9 detektiert, was einer Erhöhung von 15,4 bis 17,7 PCR Zyklen im Vergleich zur Positivkontrolle und somit einer Virusreduktion um einen Faktor von $>3 \cdot 10^4$ entspricht. Eine Probe (1100ppm_1) weist einen niedrigeren t 72 Wert auf, der höchstwahrscheinlich durch einen technischen Fehler verursacht wurde. Die Probe pos Ko 515 bezeichnet einen internen PCR Standard und bestätigt eine ordnungsgemäße PCR Analyse (Primerfunktion und mittlere Ct Werte als Kontrolle). Laut CDC werden Ct Werte ab 34 als Sars-CoV-2 negativ gewertet.

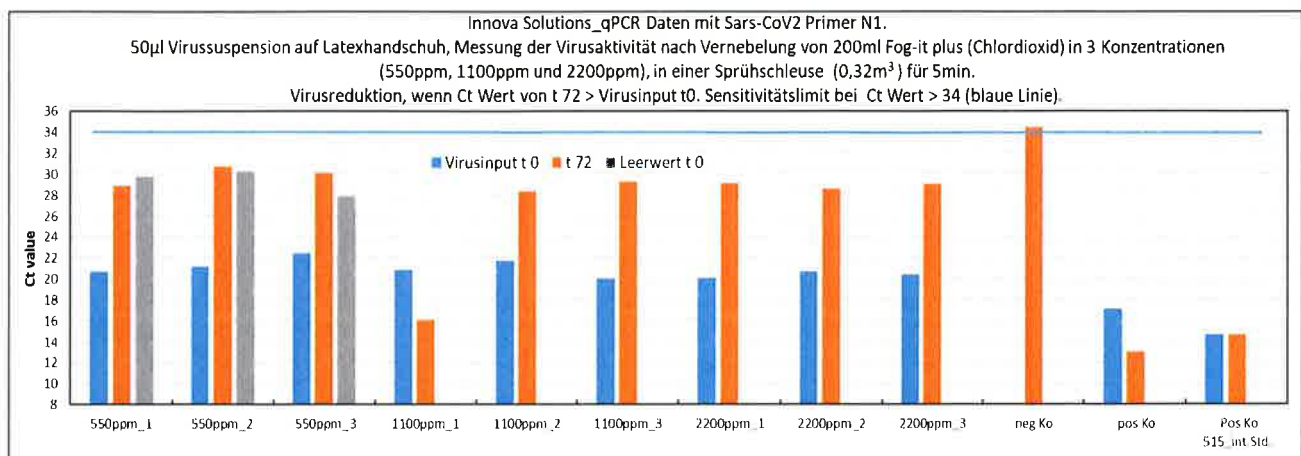


Abbildung 1: Virusreduktion auf Latexmatrix.

Ad 2) Virussuspension auf Polystyrolmatrix.

Die eingesetzten Virusmengen der Positivkontrollen (pos Ko 1 und 1:10, Virusinput t 0) mit Ct Werten von 27, bzw. 29 erreichen nach 72 Stunden durch aktive Virusvermehrung einen Ct Wert von 20, bzw. 22,8.

Die eingesetzten Virusmengen (Virusinput t 0) der behandelten Proben weisen Ct Werte von 29,5 bis 34 auf (siehe Abbildung 2 unten). Die höheren Ct Werte in diesem Ansatz begründen sich auf geringere eingesetzte Virusmengen (hier 20µl) und die 1:10 Verdünnung, die im Vergleich zu den Latexprouben eingesetzt wurde. Die nach 72 Stunden nachgewiesenen Viruspartikel werden bei Ct Werten von 36,3 bis 39,2 und höher detektiert, was im Vergleich zu den positiven Kontrollen einer Virusreduktion um einen Faktor von $>1.10^4$ (pos Ko 1) beziehungsweise $>1.10^3$ (pos Ko 1:10) entspricht. Die Probe pos Ko 515 bezeichnet einen internen PCR Standard und bestätigt eine ordnungsgemäße PCR Analyse (Primerfunktion und mittlere Ct Werte als Kontrolle). Laut CDC werden Ct Werte ab 34 als Sars-CoV negativ gewertet.

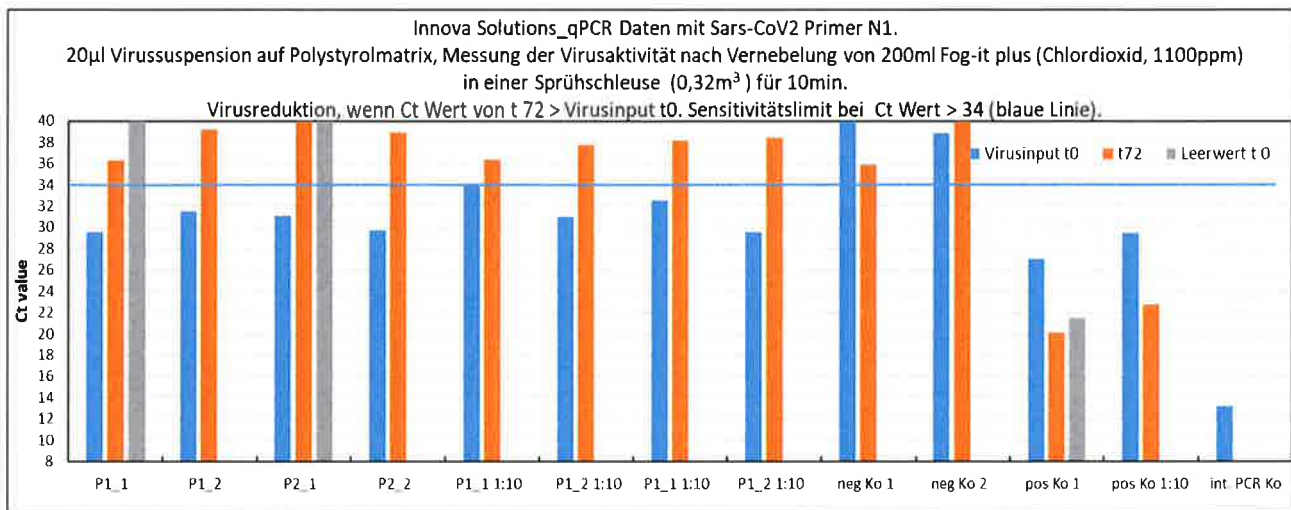


Abbildung 2: Virusreduktion auf Polystyrolmatrix.