

ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЁТ

Вирулицидная активность на поверхностях, обработанных краской содержащей фотокатализатор, системы S.A.R.C.®

Технический отчет № 2003197-001

| | | |
|----------------------------|--|---|
| Заказчик: | ООО «Лоджиа Индустрия Верничи» Ул. Колле-Д'Альба-ди-Леванте 1, 04016 Сабаудиа Латина | (Loggia Industria Vernici s.r.l.) (Via Colle D'alba di Levante 1) (04016 Sabaudia LT) |
| Испытательная лаборатория: | ООО «ЛабАнализиз» Ул. Европы 5 27041 Казанова-Лонати (PV) Италия | (LabAnalysis s.r.l.) (Via Europa 5) (27041 Casanova Lonati (PV) Italy) |
| Представленный образец: | покровные стёкла, окрашенные образцом исследуемого материала | |
| Код лаборатории: | 2003197-001 | |
| Отчет отредактирован: | Сарой Биси (Sara Bisi OPTVCF) | |
| Отчет заверен: | Гвидо Премоли (Guido Premoli DTAM) | |

Этот документ не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения руководителя лаборатории LabAnalysis srl.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | | |
|---|------------------------------|---|
| 1 | Цель настоящей работы..... | 3 |
| 2 | Экспериментальный план | 3 |
| 3 | Материалы | 3 |
| 4 | Результаты | 3 |
| 5 | Заключение | 6 |

Этот документ не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения руководителя лаборатории LabAnalysis srl.

1 Цель настоящей работы

Целью настоящей работы явилось исследование вирулицидной активности добавки AERODISP W740X (40% диоксид титана (TiO_2)), используемой в качестве “катализатора” в исследуемом красителе. В частности, заказчик был заинтересован в тестировании активности добавки в отношении вируса SARS-CoV-2; по соображениям биобезопасности был использован термически инактивированный вирус SARS-CoV-2, предоставленный и сертифицированный американской компанией «Коллекция культур американского типа» (American Type Culture Collection - ATCC).

2 Экспериментальный план

Для проверки вирулицидной активности исследуемого красителя заказчик предоставил покровные стёкла для микроскопа, предварительно покрытые красителем. В качестве негативного контроля был предоставлен набор покровных стекол, обработанных красителем, не содержащим “добавки”, но сходным по характеристикам и морфологии. Покровные стёкла были заражены (инокулированы) известным количеством вируса (соответствующим $7,5 \cdot 10^5$ геномным копиям) и инкубированы при комнатной температуре под световым воздействием с прохождением установленных временных интервалов (0, 1, 3 и 6 часов). Для каждого экспериментального условия проводился трехкратный анализ. Остаточная вирусная нагрузка была восстановлена с помощью обработки поверхности тампоном, смоченном в буферном растворе PBS, содержащем 70% этанола (EtOH). Затем образцы обрабатывались для извлечения вирусной РНК и дозировались с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции) в реальном времени и с использованием коммерческого набора, который целенаправленно распознавал РНК-зависимую РНК-полимеразу SARS-CoV-2. Анализ проводился в соответствии с методом Р-АМ-1448 испытательной лаборатории группы «ЛабАнализис».

3 Материалы

- Покровные стёкла, обработанные красителем с «добавкой» или «без добавки»; поставляются заказчиком
- Добавка AERODISP W740X, поставляемая заказчиком
- SARS-CoV-2, термически инактивируемый новый коронавирус 2019 года VR-1986НК (ATCC, партия 70035039)
- Альфа-тампон с длинной ручкой (Techwipe)
- Экстракт ДНК/РНК вируса CommaXP (Generon, EXD199)
- Принадлежности для реализации ревертазо-полимеразной цепной реакции в целях выявления вирусных культур: для обнаружения COVID 19 (РНК-зависимой РНК-полимеразы) + для управления технологическим процессом (Generon, РМВ00С_М2); в набор также входит реакционная смесь, позитивный контроль за РНК-зависимой РНК-полимеразой, негативный контроль.

4 Результаты

Результаты обобщены в Таблице 1: каждой экспериментальной точке соответствует реакция амплификации, приведены соответствующие средние значения ПВЦ (порог цикла). Более низкие значения ПВЦ соответствуют более высоким количествам вирусной РНК на поверхности покровных стекол, более высокие значения ПВЦ соответствуют более низкому количеству вирусной РНК. Для сравнения ПВЦ с контрольных покровных стекол (“без добавки”) и ПВЦ с поверхностей, обработанных красителем, содержащим добавку, был использован метод “Дельта Дельта ПВЦ” ($1/2^{\Delta\Delta PVЦ}$). Этот метод позволяет проводить относительное количественное сопоставление полученных амплификационных сигналов.

Этот документ не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения руководителя лаборатории LabAnalysis srl.

Исходя из этих расчетов, было показано, что при использовании красителя, содержащего добавку, наблюдается шестикратное снижение экспрессии РНК по сравнению с красителем “без добавки”.

Таблица 1: Результаты ПЦР в реальном времени для поверхностного мазка, выполненного на шипастых и окрашенных покровных стеклах

| Тестирование поверхности | Средняя ПВЦ Краситель с «добавкой» | Средняя ПВЦ Краситель без «добавки» | Разница в экспрессии |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| T = 0 часов | 31,46 | 28,69 | 6,8 |
| T = 1 час | 31,93 | 29,42 | 5,7 |
| T = 3 часа | 32,08 | 29,44 | 6,2 |
| T = 6 часов | 32,38 | 29,97 | 5,3 |
| Средняя (медианная) величина | 31,96 | 29,38 | 6,0 |
| Среднеквадратичное отклонение | 0,38 | 0,53 | 0,65 |
| Относительное стандартное отклонение % | 1,20 | 1,79 | 10,80 |

Эти результаты подтверждают, что краситель с “добавкой” обладает вирулицидной активностью когерентно с известными эффектами диоксида титана, несмотря на то, что сокращение экспрессии, как кажется, не коррелирует с длительностью контакта, поскольку в момент «0 часов» максимум уже достигнут (на самом деле, из-за экспериментальной методики, момент «0 часов» означает, что время контакта вируса и красителя составляет 10-15 минут).

Эти результаты могут быть обусловлены снижением эффективности экстракции вируса с исследуемых поверхностей или вмешательством добавки в экстракцию РНК: нельзя исключить, что следы добавки

удерживаются при РНК-экстракции, увлекаются вместе с красителем, т. е. подвергаются воздействию механического трения со стороны исследуемой поверхности.

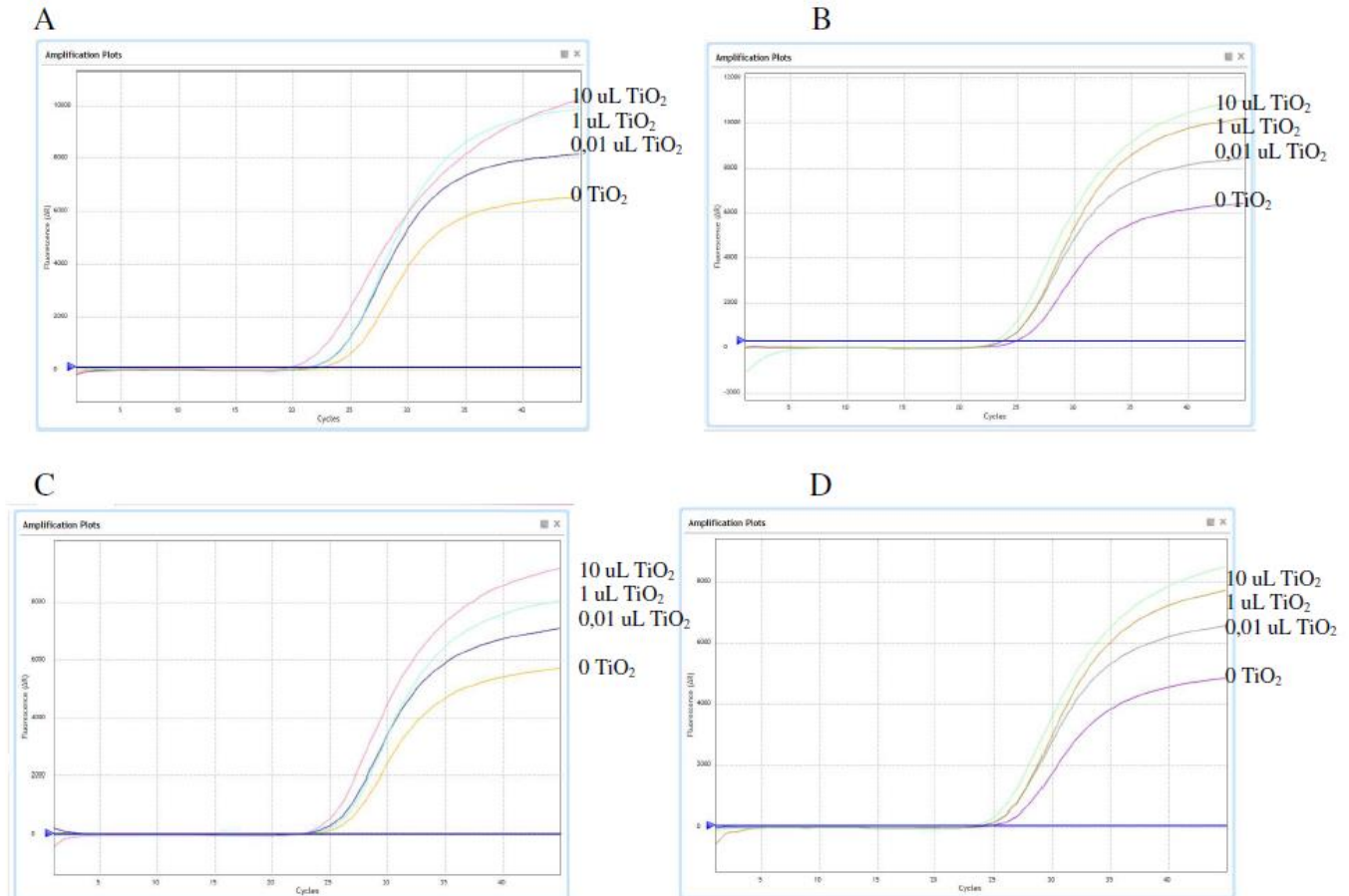
Чтобы уточнить полученные результаты, было исследовано действие добавки внутри раствора. Сначала было рассмотрено влияние диоксида титана на эффективность ПЦР-реакции, а затем было проверено влияние диоксида титана на стабильность вирусных частиц в растворе.

При исследовании первого случая в реакционную смесь (содержащую полимеразу и все субстраты, необходимые для ПЦР-реакции) непосредственно добавляли увеличивающиеся количества добавки, имитируя количество диоксида титана, вытянутого во время исследования, проведенного с помощью поверхностных тампонов. В качестве эталонного шаблона использовался позитивный контрольный раствор из набора, где он был неразбавленным, и при трех последовательных разведениях (коэффициент разбавления 1:2). Результаты показали, что для каждого уровня шаблона сдвиг ПВЦ ограничен, в то время как кривые усиления (амплификации) идут вверх пропорционально количеству добавленного диоксида титана. Это говорит о том, что диоксид титана оказывает положительное влияние на эффективность ПЦР-реакции, в отличие от того, что было первоначально предположено в качестве гипотезы.

На Рис. 1 показаны кривые усиления (амплификации), по которым хорошо видно нарастание интенсивности этого усиления за счет присутствия все большего количества диоксида титана.

Этот документ не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения руководителя лаборатории LabAnalysis srl.

Рис. 1: Кривые усиления (амплификации) ПЦР в реальном времени для РНК-зависимой РНК-полимеразы “как есть” (А), разбавленной 1:2 (В), 1:4 (С) и 1:8 (D), в присутствии увеличивающегося количества диоксида титана.



Этот документ не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения руководителя лаборатории LabAnalysis srl.

Затем был исследован второй случай, а именно: влияние диоксида титана на устойчивость вируса непосредственно в растворе, чтобы исключить проблемы восстановления из-за использования тампонов для обработки поверхностей. Термически инактивированный вирус SARS-CoV-2 был добавлен к двум различным количествам диоксида титана, чтобы имитировать эффект сопротивления, наблюдаемый при использовании поверхностных тампонов. Образцы инкубировали в течение 0, 1, 3 и 6 часов аналогично тому, что было сделано в первоначальном исследовании поверхностей, затем вирусную РНК экстрагировали и анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты представлены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2: Результаты ПЦР в реальном времени по результатам исследования, выполненного в растворе

| Тестирование в растворе | ПВЦ Контрольная (Вода) | ПВЦ 1 uL TiO ₂ | ПВЦ 5 uL TiO ₂ |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| T = 0 часов | 28,53 | Отсутствует | Отсутствует |
| T = 1 час | 28,12 | Отсутствует | Отсутствует |
| T = 3 часа | 28,59 | Отсутствует | Отсутствует |
| T = 6 часов | 28,45 | Отсутствует | Отсутствует |
| Средняя величина | 28,42 | - | - |
| Среднеквадратичное отклонение | 0,21 | - | - |
| Относительное стандартное отклонение % | 0,74 | - | - |

Данные показывают, что диоксид титана, как на указанных уровнях, так и для каждой временной точки, обеспечивает полное отсутствие усиления. В сочетании с предыдущими результатами, которые предполагали, что диоксид титана не ингибирует реакцию ПЦР, а, наоборот, повышает ее эффективность, и в полной гармонии с научной литературой, можно выдвинуть гипотезу, что отсутствие амплификации было обусловлено воздействием диоксида титана на вирусную РНК. Этот эффект очевиден даже по состоянию на короткий промежуток времени (в данном случае это правильно соответствует точке в “0 часов”, так как нет никаких задержек в извлечении РНК из-за экспериментальной наладки). Поскольку в присутствии диоксида титана отсутствуют какие-либо значения ПВЦ, невозможно применить метод “Дельта Дельта ПВЦ” для вычисления разницы в экспрессии, вызванной присутствием добавки в растворе. По этой причине было невозможно оценить восстановление вирусной РНК в растворе.

5 Заключение

Основываясь на том, что было изложено выше, мы приходим к выводу, что депонирование известного количества тепла термически инактивировало вирус SARS-CoV-2 на поверхности, обработанной красителем, содержащим катализатор, и восстановление вирусной РНК в результате оказывается в шесть раз ниже по сравнению с аналогичной поверхностью, обработанной красителем “без добавки”. Этот эффект очевиден даже после нескольких минут инкубации и кажется постоянным во времени. Этот результат подтверждается тем фактом, что диоксид титана активен в отношении вирусного геномного материала непосредственно в растворе, причем эта добавка способствует повышению эффективности реакции полимеризации. Основываясь на этих доказательствах, можно выдвинуть предположение о том, что различие ПВЦ для образцов, обработанных красителем с катализатором и без катализатора, можно было бы недооценить и занижить так, что снижение экспрессии могло бы быть выше шестикратного.

Этот документ не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения руководителя лаборатории LabAnalysis srl.