

Beurteilung der viruziden Wirkung der Lösung MetalSkin Medical® auf das Virus SARS-CoV2 (COVID19)

Montpellier, den 29.05.2020

UMS 3725 Cemipai CNRS/UM

VERTRAULICH

Für das Kleinunternehmen (TPE) MetalSkin Technologies
Ansprechpartner: Stéphane PENARI

Projekt wird betreut von: Sébastien Lyonnais – Nathalie Gros
Durchführung der Versuche: Mathilde Hénaut
Leiterin des CEMIPAI: Delphine Muriaux

I. Zielsetzung und Hintergrund

Das Kleinunternehmen (TPE) MetalSkin Technologies möchte die biozide Wirkung seiner Lösung MetalSkin Medical® auf das Virus SARS-CoV2 testen lassen.

Die Versuche zur Viruzidieprüfung werden in einer L3-Umgebung mit einem SARS-CoV2-Virenbestand durchgeführt, der vom Forschungszentrum für Infektionskrankheiten und antiinfektiöse Pharmakologie (Cemipai) hergestellt wurde.

Die Versuche werden nach einem vom Cemipai festgelegten Protokoll durchgeführt.

Nachdem das Virus COVID19 mit der Oberfläche MetalSkin Medical® Kontakt hatte, werden die Virenproben auf Zellen aufgebracht, und die Rest-Infektiosität wird mit dem sogenannten „Plaque-Assay“-Verfahren bestimmt.

II. Verwendete Materialien und Produkte

A. Vom Kunden MetalSkin bereitgestellt:

- MetalSkin Medical® Kupferoberflächen in Form von Probestreifen: 26
- Protokoll für Oberflächenreinigung

B. Von UMS 3725 bereitgestellt:

- Virenbestand von SARS-CoV2 mit $8,10^5$ PFU/ml (Herkunft: Institut Pasteur)
- Zellen Vero C1008 (E6) (ECACC, Lot-Nr. 15A033)

Reagenzien:

- DMEM SVF 2 % HEPES
- Oxoid Agar
- Overlay-Medien (MEM2X)
- PFA 4 %
- Kristallviolett
- PBS 1X Eurobio

Umgebung: Mikrobiologie-Sicherheitsarbeitsplatz (PSM), Sicherheitsstufe L3

III. Durchführung des Service

A. Behandlung der Probestreifen vor dem Test

Die Behandlung wird nach einem vom Kunden bereitgestellten Protokoll durchgeführt: 2 x 10 Sekunden lang Spülen mit sterilem destilliertem Wasser, danach 15 Minuten lang Kontakt mit 70%igem Isopropanol und Trocknen durch Verdampfen unter laminarer Luftströmung. Die MetalSkin Medical® Kupfer-Probestreifen werden in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen gelegt.

B. Herstellung des Kontakts zwischen dem Virus SARS-CoV2 und MetalSkin Medical®

1- Versuchsbedingungen

Umgebungstemperatur: (20 ± 0,5) °C

Feuchte: (50 ± 2) %

Virenstamm: SARS-CoV2

Kontaktzeit: 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden

Inkubationstemperatur: Umgebungstemperatur

2- Kontaktprotokoll Virus/Probenträger

Die Herstellung des Kontakts erfolgt durch Aufbringen eines 300-µl-Tropfens der viralen Suspension mit $8,10^5$ PFU/ml des Virus SARS-CoV2 auf die MetalSkin Medical® Fläche und die Kontrollfläche in Doppelbestimmung sowie mit unterschiedlichen Zeiten (30 min, 1 h, 2 h, 4 h).

- **Probe Nr. 1:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 (**Kontrolle der Infektiosität**)
- **Probe Nr. 2:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **30 min auf Kontrollfläche**
- **Probe Nr. 3:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **1 h auf Kontrollfläche**
- **Probe Nr. 4:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **2 h auf Kontrollfläche**
- **Probe Nr. 5:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **4 h auf Kontrollfläche**
- **Probe Nr. 6:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **30 min auf MetalSkin Medical®**
- **Probe Nr. 7:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **1 h auf MetalSkin Medical®**
- **Probe Nr. 7:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **2 h auf MetalSkin Medical®**
- **Probe Nr. 9:** $8,10^5$ PFU/ml SARS-CoV2 **4 h auf MetalSkin Medical®**
- **Probe Nr. 10:** Kulturmilieu DMEM 2 % SVF, 4 h auf MetalSkin Medical® (**Kontrolle der Toxizität von MetalSkin Medical® für die Zellen**)

Die Feststellung nach 4 Stunden (MetalSkin und Kontrollfläche) sowie die Kontrolle der Infektiosität wurden in Doppelbestimmung zweimal in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

(1) HERSTELLUNG DES KONTAKTS

Als Mix hergestellte virale Suspension und Aufbringen eines 300-µl-Tropfens auf jeden Probenträger in Doppelbestimmung.

Kontrollfläche

MetalSkin Medical®

Die Proben bleiben über die jeweils angegebenen Zeiten bei Umgebungstemperatur mit den Probenträgern in Kontakt, der Deckel der Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ist dabei geschlossen.

(2) RÜCKGEWINNUNG DER AUFGEBRACHTEN TROPFEN

Die Tropfen werden rückgewonnen und in ein hinzugenommenes Eppendorf Tube eingebracht.

Beim 4-Stunden-Test auf MetalSkin kommt es zu einem Farbwechsel des rückgewonnenen Tropfens (mit oder ohne Virus). Dies deutet auf einen Austausch zwischen der Lösung MetalSkin Medical® und dem Milieu hin. Dieser Wechsel wurde bei den anderen Zeiten und bei der Vergleichsfläche nicht beobachtet.

- (1): Virus auf MetalSkin 4 h (Probe 9)
- (2): Virus auf Kontrollfläche 4 h (Probe 5)
- (3): Kulturmilieu auf MetalSkin 4 h (Probe 10)

C. Test der Infektiosität der Proben nach dem „Plaque-Assay“-Verfahren:

1- Protokoll

Beim Plaque-Assay-Verfahren wird die Anzahl der in einer Probe enthaltenen infektiösen Viruspartikel gezählt. Diese Probe wird seriell verdünnt und auf einen Zellmonolayer aufgebracht. Wenn das Virus darin enthalten ist, infiziert dieses die Zellen und lysiert ist, wodurch sich ein Loch (Lysehof oder „Plaque“) im Zellmonolayer bildet. Das Monolayer wird violett eingefärbt, die Löcher bleiben weiß. Durch die seriellen Verdünnungen ist es möglich, die Anzahl der Plaques zu zählen.

- 1- Vero-E6-Zellen in 12-Well-Platten so aussähen, dass am Folgetag eine Konfluenz von 100 % erreicht ist.
- 2- 24 Stunden bei 37°C inkubieren.
- 3- Die Proben von 10⁻¹ bis 10⁻⁵ im Milieu DMEM 2 % SVF HEPES verdünnen.
- 4- Den Zellüberstand entfernen.
- 5- Die Zellen von Well 1 mit 200 µl der Proben 2 bis 10 über die Dauer von 1.30 Stunden bei 37 °C inkubieren. Bei Probe 1 wird Well 1 nicht infiziert (200 µl DMEM 2 % SVF HEPES). Die Wells 2 bis 6 werden mit 200 µl der jeweiligen Verdünnungen (10⁻¹ bis 10⁻⁵) über die Dauer von 1.30 Stunden bei 37 °C inkubiert.
- 6- Das virale Inokulum entfernen und die Overlay-Medien (Oxoid Agar + MEM2X) hinzugeben, Agar-Endkonzentration 0,6 %.
- 7- 72 Stunden bei 37 °C inkubieren.
- 8- PFA 4 % auf die Agarosescheiben zugeben und 4 Stunden bei 4 °C ruhen lassen.

9- Die Paraformaldehydlösung (PFA) und danach die Agarosescheiben entfernen und die Zellen 20 Minuten lang bei Umgebungstemperatur mit Kristallviolett anfärben.

10- Die Plaques zählen.

2- Testergebnisse

Die mit der reinen Probe 10 (ausschließlich Kulturmilieu auf dem Probenträger, nachfolgend als „PUR“ bezeichnet) weisen eine Zerstörung des Zellteppichs auf, in der eine Toxizität von MetalSkin Medical® für die Zellen zum Ausdruck kommt. Diese Toxizität verschwindet bei der ersten Verdünnung und hat somit keinen Einfluss auf die Zählung der gebildeten Plaques.

Bei der Verdünnung von 10^{-4} von Probe 1 (Kontrolle der Infektiosität) werden im Durchschnitt 14 Plaques festgestellt, was einem Infektionstiter von $6,8 \cdot 10^5$ PFU/ml entspricht.

Die Proben 2, 3, 4 und 5 (Kontrollfläche) haben im Durchschnitt 15 Plaques bei einer Verdünnung von 10^{-4} , was einem Infektionstiter von $7,5 \cdot 10^5$ PFU/ml entspricht.

Dies zeigt, dass sich der Infektionstiter nach den Behandlungen der Proben auf der Kontrollfläche und unabhängig von der Kontaktzeit der Infektionstiter gegenüber dem als Ausgangsbasis verwendeten Virenbestand nur sehr gering verändert. Dieses Ergebnis gestattet die Validierung der Kontrollflächen.

Die Kontaktzeiten von 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden auf der MetalSkin Medical® Oberfläche weisen eine Verringerung der Virenlast von weniger als 1 Log_{10} auf. Für die Kontaktzeit von 4 Stunden erhöht sich die Verringerung auf $2,4 \text{ Log}_{10} \pm 0,18$.

VALIDIERUNG UND KONTROLLEN					TESTS				
		Gezählte Plaques	Virustiter (PFU/ml)	Standardabweichung			Gezählte Plaques	Virustiter (PFU/ml)	Standardabweichung
KONTROLLE DER INFECTIOSITÄT	Probe 1	Nicht infiziert 0-0 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ >100->100 10 ⁻⁴ 14-13	6,80E+05	3,5E+04	METALSKIN MEDICAL®	Probe 6 (30 min)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ - >100->100 10 ⁻⁴ 12-13 Differenz zur Kontrollfläche (log)	6,30E+05	3,5E+04
								0,13 ± 0,06	
KONTROLL-FLÄCHEN	Probe 2 (30 min)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ - >100->100 10 ⁻⁴ 15-19	8,50E+05	1,4E+05		Probe 7 (1 h)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ - >100->100 10 ⁻⁴ 7-5 Differenz zur Kontrollfläche (log)	3,00E+05	7,1E+04
								0,46 ± 0,13	
	Probe 3 (1 h)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ - >100->100 10 ⁻⁴ 7-5	8,80E+05	2,5E+05		Probe 7 (1 h)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ 34-29 10 ⁻⁴ 4-2 Differenz zur Kontrollfläche (log)	1,50E+05	7,1E+04
								0,78 ± 0,18	
	Probe 4 (2 h)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ - >100->100 10 ⁻⁴ 18-16	8,50E+05	7,1E+04		Probe 9 (4 h)	PUR, vollst. Lyse 10 ⁻¹ 50-25 10 ⁻² 12-6 10 ⁻³ 0-0 10 ⁻⁴ 0-0 Differenz zur Kontrollfläche (log)	4,50E+03	2,1E+03
							2,4 ± 0,18		
	Probe 5 (4 h)	PUR >100->100 10 ⁻¹ >100->100 10 ⁻² >100->100 10 ⁻³ - >100->100 10 ⁻⁴ 25-20	1,10E+06	1,8E+05					

Ergebnisse Plaque-Zählung

Echantillon 1 (contrôle d'infectivité)	Probe 1 (Kontrolle der Infektiosität)
30min (échantillon 2)	30 min (Probe 2)
1H (échantillon 3)	1 h (Probe 3)
2H (échantillon 4)	2 h (Probe 4)
4H (échantillon 5)	4 h (Probe 5)
30min (échantillon 6)	30 min (Probe 6)
1H (échantillon 7)	1 h (Probe 7)
Inversion des 2 puits	Umkehrung der 2 Wells
2H (échantillon 8)	2 h (Probe 8)
4H (échantillon 9)	4 h (Probe 9)
METALSKIN MEDICAL®	METALSKIN MEDICAL®
TEMOINS	KONTROLLFLÄCHEN
CONTRÔLES	KONTROLLEN
Organisation des plaques	Organisation der Platten
Réplikat 1	Replikat 1
Réplikat 2	Replikat 2
PUR	PUR

Grafische Darstellung der Ergebnisse

Bruttowerte in Anzahl infektiöser Partikel / ml:

Titre Viral (PFU/ml)	Virustiter (PFU/ml)
1.5x10 ⁶	1,5x10 ⁶
1x10 ⁶	1x10 ⁶
5X10 ⁶	5x10 ⁶
Temps de dépôt (h)	Aufbringungszeit (h)
MetalSkin Medical®	MetalSkin Medical®
Contrôle (plastique)	Kontrollfläche (Kunststoff)

Aufbringungszeit (h)	PFU/ml MetalSkin Medical®				PFU/ml Kontrollfläche (Kunststoff)			
0	650000	850000	1300000	900000	650000	850000	1300000	900000
0,5		600000		650000	750000	950000		
1		350000		250000	700000	1100000		
2		200000		100000	900000	800000		
4	200	8500	6000	3000	500000	650000	1300000	1000000

Prozentwerte im Vergleich zum Durchschnitt der Infektionskontrolle (mit und ohne Fehlerbalken):

Hemmung von SARS-CoV2 in %	
MetalSkin Medical®	
Kontrollfläche (Kunststoff)	
Aufbringungszeit (h)	

Aufbringungszeit (h)	Hemmung in % auf MetalSkin Medical®				Hemmung in % auf Kontrollfläche (Kunststoff)			
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	35,14	29,73			18,92	-2,70		
1	62,16	72,97			24,32	-18,92		
2	78,38	89,19			2,70	13,51		
4	99,98	99,08	99,35	99,68	45,95	29,73	-40,54	-8,11

3- Schlussfolgerung:

Die mit der Lösung MetalSkin Medical® für eine Dauer von 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden in Kontakt gebrachten Virenproben (Proben 6 bis 8) weisen eine Rest-Infektiosität auf, die sich um weniger als 1 Log₁₀ von den jeweiligen Vergleichsflächen unterscheidet.

Bei einer Kontaktzeit von 4 Stunden mit der Lösung MetalSkin Medical® verringert sich die Rest-Infektiosität um $2,4 \text{ Log}_{10} \pm 0,18$.

Die Lösung MetalSkin Medical® erscheint somit als Störfaktor für das Infektionsvermögen von SARS-CoV2 nach einer Kontaktzeit von 4 Stunden mit diesen Viren.