SYNLAB

Projekt

Photokatalytische Eliminierung von SARS-CoV-2 RNA-Viren durch UV-A induzierte Radikal-Freisetzung

Zwischenbericht (Stand: 22.09.2020)

Projektpartner:

1) Lynatox GmbH
Ehrenbergstraße 11
98693 Ilmenau

c/o: Materialforschungs- und -prüfanstalt an der Bauhaus-Universität Weimar (MFPA Weimar)
Postfach 2310
99404 Weimar
Ansprechpartner: Tobias Schnabel (M. Sc.)
Tel.: 036257-457720
e-mail: tobias.schnabel@lynatox.de

2) Synlab Analytics & Services Germany GmbH
Orlaweg 2
07743 Jena

Ansprechpartner: Dr.sci. hum. Reinhard Baier
Tel.: 03641-3096-420
e-mail: reinhard.baier@synlab.com

Die Synlab A&S Jena verfügt über ein S2-Labor und die amtliche Zulassung zur Durchführung von SARS-CoV-2 Nachweisen (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz; Dez. 31 Infektionsepidemiologie), Juni 2020

1 Einleitung:

SARS-CoV-2 ist das verursachende Virus der neuartigen Lungenkrankheit Covid-19, welches zuerst im Dezember 2019 in Wuhan, China identifiziert wurde und das sich seitdem pandemisch weltweit ausgebreitet hat.

In der Forschung über Übertragungswege von SARS-CoV-2 erlangen Aerosole, die aufgrund ihrer geringen Partikelgröße längere Zeit in der Luft schweben können, eine immer größere Bedeutung. Aerosole werden beim normalen Atmen bzw. beim Husten und Niesen über Mund und Nase in die Umgebung abgegeben. Innerhalb geschlossener Räumlichkeiten können sich Menschen, ohne direkten, nahen Kontakt zu infizierten Personen, auf diese Weise infizieren und somit selbst Überträger von SARS-CoV-2 werden.

Eine Reinigung der Raumluft von Gebäuden von SARS-CoV-2 ist somit ein wichtiger Bestandteil einer Strategie zur Unterbrechung/Eindämmung des Infektionsgeschehens sowie der gesundheitlichen Vorsorge und des Schutzes von Menschen, die sich in geschlossenen Räumen begegnen. Effiziente technische Lösungen zur Eliminierung von SARS-CoV-2 aus der Raumluft tragen somit dazu bei, ein weitgehend normales Sozial- und Wirtschaftsleben sowie einen sichereren Schulbetrieb zu ermöglichen und mögliche „Lockdowns" aufgrund lokaler Infektionsgeschehen zu reduzieren.

Im vorliegenden Projekt soll eine Eliminierung von SARS-CoV-2 aus der Raumluft, durch einen oxydativen Angriff auf die Virushülle mittels Radikalen, die aus einer beschichteten Oberfläche nach UV-A Bestrahlung freigesetzt werden, untersucht werden. Die Beschichtungsmaterialien und Techniken sowie die Vorrichtungen zur Aktivierung dieser Oberflächen, sind eine proprietäre Erfindung der MFPA Weimar/Lynatox GmbH Ilmenau und wurden dem Projektpartner 2 zur Durchführung entsprechender Versuche zur Verfügung gestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Photokatalysatoren (ca. 1 cm^2 groß) auf beschichteten Glasfaserkunststoff (GFK)-Netzen, wurden vom Projektpartner 1 zur Verfügung gestellt. Die Katalysatoren wurden nach Erfahrungen aus Vorexperimenten auf Klebestreifen aufgeklebt, um sicherzustellen, dass die später aufgebrachte Virussuspension nicht unter die Oberfläche der Katalysatoren gerät und somit von den Radikalen nicht erreicht werden kann.

2.1.2 UV-A emittierende Station zur Aktivierung der Photokatalysatoren wurde vom Projektpartner 1 zur Verfügung gestellt (Bild 1: Prototyp).

Bild 1:

2.1.3 Geräte

Sicherheitswerkbank:
CleanAir; BioHazard Kl. 2

Wasserbad:
GFL, Typ 1092

Real time PCR Geräte:
Folgende Geräte wurden für die Reverse Transkriptase Real Time PCR eingesetzt:

1) QUANTStudio5; Applied Biosystems
2) StepOne Plus; Applied Biosystems

2.1.4 SARS-CoV-2 Viruspartikel

Viruspartikel, die zur Durchführung der Experimente eingesetzt wurden stammten aus inaktivierten, positiv getesteten klinischen Realproben (Synlab-Oncoscreen; annonymisiert), die zu einem Pool zusammengefasst wurden, um einheitliche Viruskonzentrationen für alle experimentellen Gruppen zu gewährleisten. Die Inaktivierung erfolgte gemäß ATCC-Protokoll von 2020 (s.2.2 Methoden).

2.1.5 Virus RNA-Präparation

Die Präparation viraler RNA erfolgt mit dem Kit „High Pure PCR Template Preparation Kit" der Fa. Roche; Cat. No. 11796828001.

2.1.6 SARS-CoV-2 PCR-Kit (Nachweis durch reverse Transkriptase PCR)

Der Nachweis von SARS-CoV-2 RNA erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Fa. R-biopharm (RIDA GENE SARS-CoV-2; Cat. No. PG6815; zertifiziert). Der Kit detektiert SARS-CoV-2 spezifische Bereiche des E-Gens (envelop) im Virusgenom.

2.2 Methoden

Alle Arbeitschritte mit aktiven Viren werden im S2-Labor Labor der Synlab A&S Jena unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt

2.2.1 Hitze-Inaktivierung von Realproben, die zuvor positiv auf SARS-CoV-2 getestet wurden

Die Inaktivierung der Realproben erfolgte direkt nach der Übergabe durch die Synlab-Oncoscreen GmbH im S2-Labor entsprechend dem Protokoll der American Type Culture Collection (ATCC), welches zur Bereitstellung kommerziell erhältlicher inaktivierter SARS-CoV-2 Viren verwendet und auf der website der ATCC publiziert ist:

ATCC-Protokoll: Proben für 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren

aktuelle Modifikation: aus Sicherheitsgründen wurde der Inaktivierungsschritt auf 40 min verlängert.

2.2.2 RNA-Präparation

300 µl der inaktivierten und gepoolten Virusproben wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 300 µl Lyse/Bindepuffer aus dem High Pure PCR Template Preparation Kit sowie 7 µl Proteinase

K, 7 µl beta-Mercaptoethanol und 20 µl einer internen heterologen Kontroll-RNA zugegeben und gründlich gemischt. Die Mischung wurde für 10 min bei 70°C inkubiert zur Lyse der Viruspartikel und Freisetzung des Virus-RNA-Genoms. Anschließend wurde die Probe mit 175 µl Isopropanol versetzt und gründlich gemischt. Nach Überführen der Probe in eine Silicamatrix Zentrifugationssäule erfolgte die weitere RNA-Präparation und Aufreinigung nach den Kitvorgaben. Die gereinigte RNA wurde in einem Volumen von 55 µl Nuklease-freiem Wasser in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und davon 5 µl direkt in die Reverse Transkriptase Real Time PCR eingesetzt. Die restliche RNA wurde für weitere Bearbeitungen bei -80°C gelagert.

2.2.3 Reverse Transkriptase Real Time PCR (RT-PCR)

Der Nachweis der SARS-CoV-2 RNA erfolgte nach den Vorgaben des eingesetzten RIDA GENE SARS-CoV-2 Kits. Die Gensonde für das E-Gen ist mit dem Fluorophor FAM und die Gensonde für das interne Kontrollgen (Extraktions- und Amplifikationskontrolle) mit dem Fluorophor VIC markiert. Der Nachweis erfolgt in einer Duplexreaktion, wobei neben der SARS-CoV-2 RNA immer auch das interne Kontrollgen mit amplifiziert wird, um eine Inhibition der Nachweisreaktion bzw. eine ungenügende RNA-Präparation oder Umschreiben der RNA in cDNA auszuschliessen.

Das Temperatur/Zeit-Profil der Reaktion war entsprechend der Kit-Vorgaben. Die Reaktion wurde über 45 PCR Zyklen beobachtet.

Ausgewählte, inaktivierte Realproben wurden zu einem Pool zusammengefasst, um eine gleichbleibende Viruskonzentration für alle experimentellen Gruppen zu gewährleisten. Die Überprüfung des Pools ergab einen Ct-Wert bei ca. 33 Zyklen (spezifisches Fluoreszenz-Signal der Reaktion).

2.2.4 Beschichtung der Photokatalysatoren mit einer inaktivierten SARS-CoV-2 Virus-Suspension

Die Katalysatoren wurden auf einen Klebestreifen (Paketklebeband; 3x3 cm) mit der beschichteten, matten Seite nach oben aufgeklebt (Katalysatoren mit Pinzette manipuliert, um Oberfläche nicht zu zerstören). Um die Katalysatoren herum wurden mittels Klebebandstreifen kleine „Reaktionskammern" hergestellt, um ein Auslaufen der Virussuspension weitgehend zu verhindern. 200 µl der inaktivierten Poolprobe wurden auf die Katalysatoren unter der Sicherheitswerkbank aufgetropft und bis zur Eintrocknung bei Raumtemperatur unter der Werkbank belassen (ca. 8 h).

Folgende experimentelle Gruppen wurden in Duplikaten vorbereitet:

Kontrollgruppe: ohne UV-A Aktivierung (2 Katalysatoren)

Aktivierte Gruppe: mit 10 min UV-A Aktivierung (2 Katalysatoren)

2.2.5 Durchführung des Experimentes/ Aktivierung der Katalysatoren

Die UV-A-Station (Prototyp) wurde unter der Werkbank aufgebaut.

Die mit getrockneter Virussuspension bestückten Katalysatoren wurden unter die LED-Lampen plaziert und die Bestrahlung für 10 min gestartet.

Nach 10 min wurden die Katalysatoren entfernt und die Station abgeschaltet. Die Katalysatoren (Kontrollgruppe und bestrahlte Gruppe) wurden mit 200 µl PBS rehydriert und nach ca. 3 min das Flüssigkeitsvolumen (ca. 200 µl) in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt in denen 200 µl Guanidinium-HCL Binde-/Lysepuffer vorgelegt war. Nach Zugabe von Proteinase K, beta-Mercaptoethanol und interner Kontroll-RNA erfolgte die RNA-Präparation wie unter 2.2.2 beschrieben. Die gereinigte RNA wurde in einem Endvolumen von 50 µl von der Säule eluiert.

2.2.6 Überprüfung der katalytischen Eliminierung von SARS-CoV-2 Viren

Die von den Katalysatoren stammende RNA wurde nach der Präparation direkt in die Reverse Transkriptase Real Time PCR eingesetzt (s. 2.2.3). 5 µl der präparierten RNA wurden zu einem komplettierten Reaktionsgemisch des Kits in 96-well PCR Reaktionsplatten zugegeben.

3 Ergebnisse und Diskussion

Der Nachweis von SARS-CoV-2 RNA erfolgte mittels reverser Transkriptase Real Time PCR mit einem E-Gen-spezifischen Primer-/Sonden-System des verwendeten Kits (s. 2.1.6; r-biopharm). E-Gen-spezifische Fluoreszenzkurven sind mit orange-brauner Farbe dargestellt (FAM markierte Sonden), die Kurven für die interne Kontroll-RNA sind in blauer Farbe (VIC markierte Sonden). Die Abbildung zeigt, dass die Nachweisreaktion valide war (positiv Kontrolle nachgewiesen; Negativkontrolle und Pufferkontrolle nicht nachgewiesen). Der Nachweis des internen Aufarbeitungs- und Amplifikationssystems (interne Kontroll-RNA) beweist, dass die RNA-Präparation und die anschließende reverse Transkription in cDNA erfolgreich war und keine Reaktionsinhibitionen auftraten. In der unbehandelten Gruppe (ohne UV-A-Bestrahlung) war Virus-RNA mit einem Ct-Wert von ca. 36-37 Zyklen nachweisbar. Von den Katalysatoren, deren Oberflächen mit UV-A aktiviert wurden konnte keine SARS-CoV-2 RNA nachgewiesen werden.

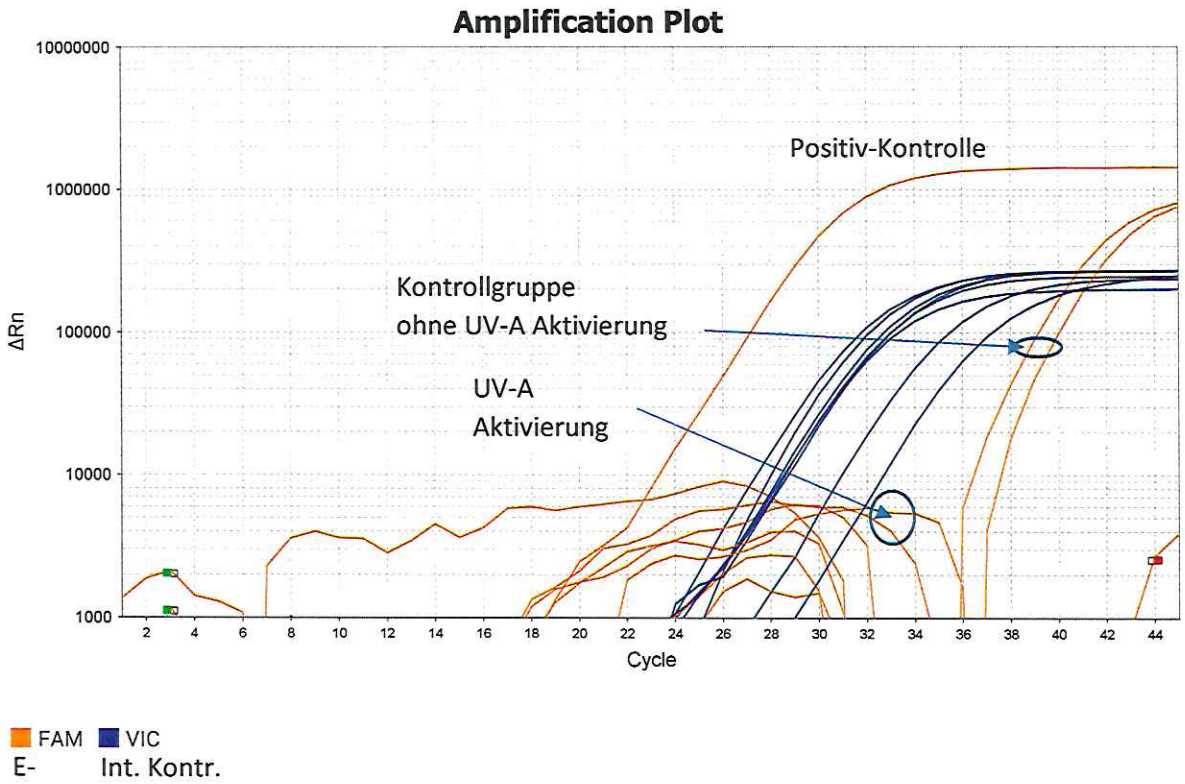

Abb. 1: Nachweis von SARS-CoV-2 nach photokatalytischer Aktivierung beschichteter Oberflächen (Radikal-Freisetzung). E-Gen Sonde ist FAM-gelabelled (orange-braune Kurven); Kontroll-RNA Sonde ist VIC-gelabelled (blaue Kurven)

Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt das kommerzielle hitzeinaktivierte Virusmaterial der ATCC (via LGC) wegen Lieferschwierigkeiten durch weltweite Nachfrage zur Testentwicklung oder Impstoffentwicklung usw. nicht zur Verfügung steht, musste ein eigener Pool an positiven Realproben, die aus der aktuellen Labordiagnostik stammten, hergestellt werden. Da es sich hierbei um Zufallsproben handelte und das Diagnostiklabor zum betreffenden Zeitpunkt keine Kapazitäten hatte, positive Proben anhand der Ct-Werte auszuwählen, waren bei den überlassenen Proben auch Beispiele mit niedrigerer Virenkonzentration enthalten. Nach der Hitzeinaktivierung und Überprüfung zeigte die hergestellte Poolprobe einen Ct-Wert von ca. 33 (nicht gezeigt).

Der Ct-Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der das Fluoreszenzsignal vom Real Time PCR Gerät als spezifisch über dem Background liegend erkannt wird und ist ein Maß für die Ausgangsmenge an entsprechender RNA/DNA. Je höher die Zyklenzahl des Ct-Wertes ist, desto geringer ist der entsprechende Ausgangskonzentrationswert der jeweiligen Gensequenz (s. auch Abb. 2). Aufgrund der geometrischen Verdopplungsreihe bei PCR-Reaktionen entspricht ein Zyklus Unterschied rechnerisch einer Verdopplung bzw. Halbierung der Ausgangsmenge.

Im dargestellten Experiment liegt der Unterschied der nachgewiesenen Virenmenge (vor und nach Experiment) bei ca. 3 Ct-Werten. Die im Experiment eingesetzte inaktivierte Virussuspension zeigt nach Ablösen der Viren von der Oberfläche und RNA-Präparation einen erwartbaren Ct-Wert (ca. Ct 36).

In diesem Experiment ist somit mit einem Verlust bis ca. 80% der gesamten eingesetzten Virenmenge während der Ablöse- und Präparationsschritte nach der Bestrahlung zu rechnen. Der Verlust an Viruspartikeln ist durch Eintrocknung und Ablösungsverlusten erklärbar gegenüber dem Ausgangswert von ca. Ct 33 (s.o).

Da aufgrund der relativ niedrigen Virenkonzentration in der Poolprobe ein größeres Probenvolumen (200 µl) auf die Katalysatoren aufgetragen werden musste, war der Zeitraum bis zur Eintrocknung mit ca. ≥8 h auch relativ lang. Diese Zeitspanne konnte nicht verkürzt werden, da die von der beschichteten Oberfläche freigesetzten wirksamen Radikale in einem Flüssigkeitstropfen abgefangen würden und somit wirkungslos wären. Deshalb wurde bei diesem Experiment die vollständige Eintrocknung der Virensuspension gewählt.

Aus einem Vergleich mit einer zuvor durchgeführten Bestimmung der Nachweisgrenze für SARS-CoV-2 Virusgenome kann abgeschätzt werden, dass im vorliegenden Experiment ca. 5 Virusgenome pro Reaktion (5 µl RNA aus 50 µl Eluat verwendet)nachgewiesen wurden (Ct 36-37; s. Abb. 2). Dies entspricht einer Rückrechnung auf ca. 250-1000 Virenpartikel in der aufgetragenen Probe (abgeschätzte Verluste während Trocknungsphase, Ablösung, RNA-Präparation).

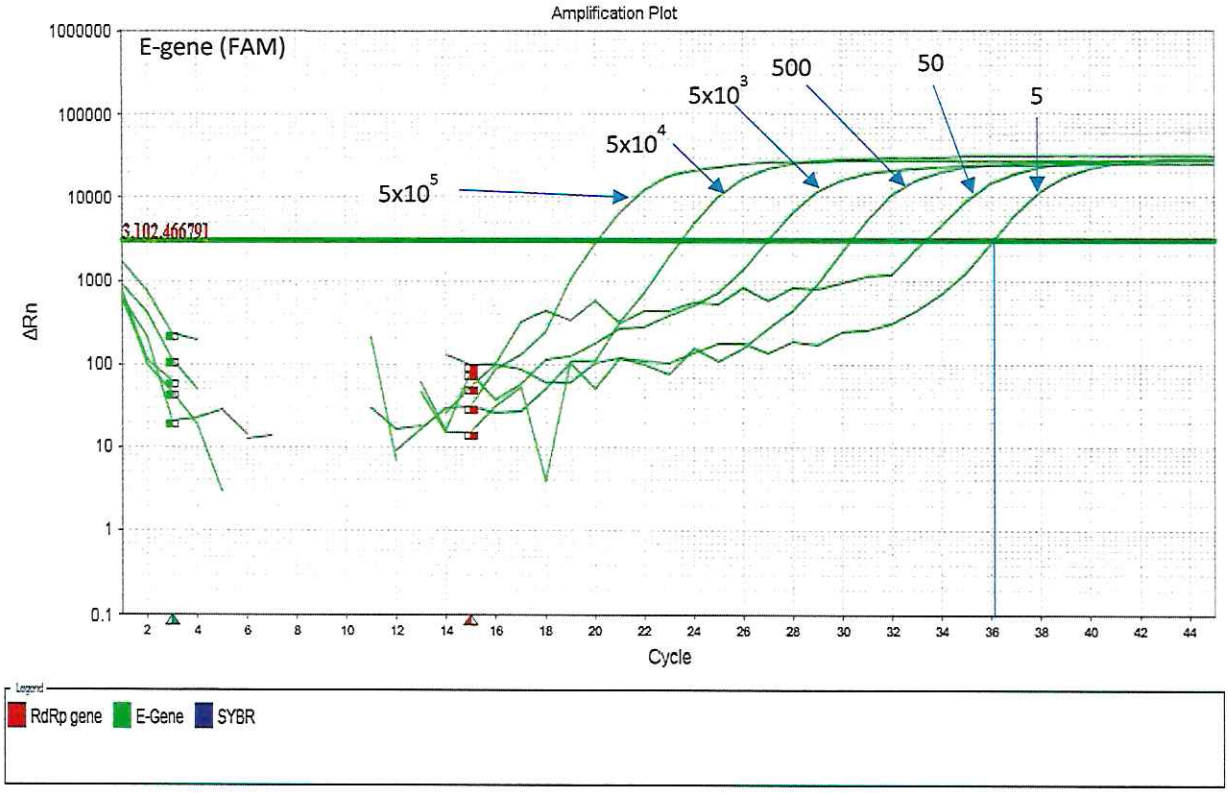

Abb. 2: Nachweisgrenze der E-Gen Reverse Transkriptase Real Time PCR. SARS-CoV-2 Referenz RNA (→EURM-019; JRC; Reference Materials: ~10^8 copies/µl) in 10er Schritten seriell verdünnt. 5 µl der RNA im PCR-Nachweis eingesetzt. Zahlenwerte geben die Anzahl der Genkopien/Viruspartikel an, die pro Reaktion detektiert wurden. Die Nachweisgrenze wird hier mit 5 Genkopien/Reaktion erreicht (Ct ca. ≥ 36)

4 Ausblick

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte eine Eliminierung der Viruspartikel nach UV-Aktivierung und Radikal-Freisetzung beobachtet werden. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Folgeexperimenten zu verbessern und Verluste an Viruspartikeln zu minimieren, wird z.Zt. eine höherkonzentrierte Virussuspension hergestellt mit dem beabsichtigten Vorteil, dass ein geringeres Volumen für den Auftrag auf die Katalysatoren erforderlich ist und das Probenvolumen somit innerhalb einer kürzeren Zeitspanne weitgehend verdunstet ist. Hierdurch sollen nicht quantifizierbare Nebeneffekte reduziert und die Reproduzierbarkeit der Experimente verbessert werden. Des Weiteren soll versucht werden das Containment der Katalysatoren und Proben zu optimieren. Da Radikale nur auf der beschichteten, dem UV-A Licht ausgesetzten Seite freigesetzt werden und diese Radikale auch nur eine Wirkdistanz im µm Bereich aufweisen, muss verhindert werden, dass die aufgetragene Probensuspension unter das Katalysator-mesh gerät. Im vorliegenden Experiment sollte dies durch das Aufkleben auf Klebestreifen versucht werden.

Da der zur Verfügung gestellte Katalysator jedoch eine Netzstruktur aufweist, ist nicht zuverlässig zu verhindern, dass Viren sich auch neben der beschichteten Oberfläche und somit evtl. ausserhalb der Reichweite der Radikale befinden und folglich nicht effizient zerstört werden könnten.

Die technische Lösung für ein optimiertes Katalysatorendesign, die nicht Bestandteil der späteren Apparatur sein muss, sollte in der Diskussion mit den Projektpartnern angestrebt werden.

Nach Überprüfung des neu hergestellten, hitzeinaktivierten Virus-Pools und Optimierung des Proben-Containments sollen unterschiedliche Bestrahlungszeiten getestet werden. Nach Bestimmung der kürzest wirksamen Bestrahlungszeit sollten danach unterschiedliche Virenkonzentrationen auf die Katalysatoren aufgebracht werden, um das obere Maximum an Viruspartikeln, die innerhalb einer bestimmten Bestrahlungszeit eliminiert werden können, zu definieren.

Jena, den 22.09.2020

Dr. Reinhard Baier
Bereichsleiter Molekularbiologie
Synlab A&S Germany GmbH
Orlaweg 2
07743 Jena
Tel: 03641-3096-420
e-mail: reinhard.baier@synlab.com