



**LOGGIA**  
industria vernici

## UMANA Tanúsítvány

Virucid aktivitás elemzése a kezelt felületen (belső kódszám: 2003197-001)

A munka célja és a szintetikus módszer

A munka célja a SARS-CoV-2 vírus (hővel inaktivált, ATCC VR-1986HK, 70035039 tétel) stabilitásának tesztelése volt a „katalizátort” tartalmazó festékekkel kezelt felületeken.

A megvalósított megközelítés a következő volt: a kezelt felületeket ismert mennyiségű vírussal oltottuk be ( $7,5 \cdot 10^5$  genomialis másolat), hagytuk inkubálódni eltérő ideig (0, 1, 3 és 6 óra), majd a maradék vírust tamponáltuk (PBS-t és 70% etanolt tartalmazó pufferoldatban).

Ezután a vételezett minták vírusos RNS-ét feldolgoztuk, és valós idejű PCR-ral adagoltuk, a Generon által forgalmazott, a SARS-CoV-2 RdRp génre specifikus szett segítségével (COVID 19 (RdRp gén) detektálás + folyamatkontroll, PMB00C\_M2). Minden kísérleti pont esetében az aktivitást három példányban vizsgáltuk. Ellenőrzésképpen a "katalizátor" felületével egyidőben hasonló felületet is vizsgáltunk konzisztencia és eloszlás szempontjából, de adalékanyagok nélkül.

### Eredmények

Ennek a tesztnek az eredményeit a következő táblázat mutatja be, amelyben minden egyes kísérleti pontra vonatkozóan a SARS-Cov-2 vírus RdRp génjének jelzésére vonatkozó átlagos Ct (küszöb ciklus) értékeket közöljük. Az alacsony Ct-értékek a mintákban jelenlévő nagyobb mennyiségű vírusos RNS-nek felelnek meg; A magasabb Ct a vírus RNS kisebb mennyiségének felel meg.

Felületi próba	Ct	Ct	2-( $\Delta\Delta$ Ct) reciproka
	festék + katalizátor	“mock” festék	
T= 0h	31.46	28.69	6.8
T= 1h	31.93	29.42	5.7
T= 3h	32.08	29.44	6.2
T= 6h	32.38	29.97	5.3
Átlag	31.96	29.38	6.0
Standard deviáció	0.38	0.53	0.65
RSD %	1.20	1.79	10.80

A kontroll tárgylemezek (katalizátor nélküli) Ct-je és a vizsgált minta tárgy lemezeinek Ct-je közötti különbségek elemzésével meghatározható a 2- ( $\Delta\Delta$ Ct), amely a festéken a vírusos RNS megjelenésének különbségét jelzi a "katalizátoros" és a kizárólagosan festékekkel kezelt felületeken. Ez a különbség körülbelül 6-szorosra becsülhető.

Ez az eredmény rávilágít a festék katalizátorral használt virucid hatására. Ennek a jelenségnek az időbeli tendenciájáról azonban nincs bizonyíték, mivel ez a "0" időpontban is megnyilvánul (ami a kísérleti rendszer miatt körülbelül 10-15 perces vírus-festék érintkezési időt jelent).

Először is ez a tulajdonság a vírus csökkentett extrakciós hatékonyságának tudható be a katalizátort tartalmazó felületen, vagy az esetleges interferenciának tulajdonítható a katalizátor és a nukleines anyag között az extrakciós fázisban.

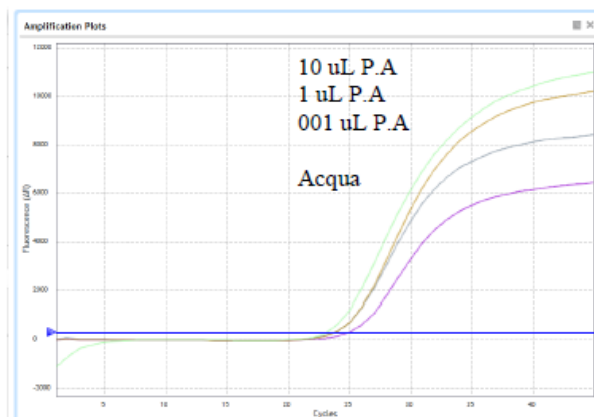
A "katalizátor" hatásának további vizsgálata érdekében vizsgáltuk a ----- adalékanyag közvetlen hatását, amely az UMANA hatóanyagának körülbelül 40%-a.

Először az UMANA hatóanyagának a polimerizációs reakcióra gyakorolt közvetlen hatását vizsgáltuk. Ebből a célból az adalékanyagot növekvő mennyiségben adtuk közvetlenül a reakcióelegyhez (amely tartalmazta a polimerázt és a polimerizációhoz szükséges inaktív segédanyagot), az RdRp gén pozitivitásának ellenőrzése mellett.

Az amplifikációs görbék és a Ct értékek alapján egyértelmű, hogy az Umana hatóanyaga növeli a polimerizációs reakció hatékonyságát. Ezt az értékelést az RdRp gén különböző dózisu pozitivitásának ellenőrzése mellett is elvégeztük.

A kapott nyers adatokat az alábbiakban mutatjuk be, amelyekben nyilvánvaló az Umana hatóanyagának (P.A) köszönhető polimerizációs reakció fokozódása. Ebből kifolyólag gátló hatást nem mutattunk ki, hanem éppen ellenkezőleg.

Acqua=víz



Mix di reazione +	Ct (Livello 1)	Ct (Livello 2)	Ct (Livello 3)	Ct (Livello 4)
Acqua	24.00	24.43	25.48	26.32
0,01 uL P.A	22.35	23.27	24.48	25.24
1 uL P.A	22.33	23.33	24.92	25.30
10 uL P.A	20.59	22.72	23.89	24.56

Végül kiértékeljük a vírus kinyerésére gyakorolt közvetlen hatást az Umana hatóanyagának oldatában. A hővel inaktivált SARS-CoV-2 vírust növekvő mennyiségű a P.A-val (hatóanyag) elegyítettük, és 0, 1, 3 vagy 6 órán át inkubáltuk a mintavételhez szükséges érintkezési idő szimulálása céljából.

A mintákat tehát előkészítettük a vírusos RNS extrakciójára és hasonlóan elemeztük valós idejű PCR-rel.

Az eredményeket a következő táblázat mutatja:

Vizsgálat az oldatban (Prova in soluzione)      Ct kontrol (víz)      (P.A =hatóanyag)

Prova in soluzione	Ct Controllo (Acqua)	Ct 1 uL P.A	Ct 5 uL P.A
T= 0h	28.53	Assente	Assente
T= 1h	28.12	Assente	Assente
T= 3h	28.59	Assente	Assente
T= 6h	28.45	Assente	Assente
Media	28.42	-	-
Dev Std	0.21	-	-
RSD %	0.74	-	-

Ezen adatok alapján megállapítható az Umana hatóanyagának (P.A) jelentős hatása a vírus anyagra: P.A jelenlétében nem mutatható ki, az oldatban nem fedezhető fel az örökítőanyag. Bár ezek az oldatban elvégzett tesztek nem teszik lehetővé a katalizátor vírusölő hatásának számszerűsítését, alátámasztják a korábban megfogalmazott hipotéziseket, amelyek a katalizátor lehetséges hatását feltételezik a felületeken kiváló vírusra, ami még rövid érintkezési időkből is kimutatható. Ezek az adatok azonban nem elegendők a katalizátor vírus részecskékre kifejtett pontos hatásmechanizmusának (közvetlen fehérjékre és az RSN-re gyakorolt hatás, mechanikus elkülönítés) meghatározásához.

#### Következtetések

A fentiekből arra következtethetünk, hogy ha ismert mennyiségű hővel inaktivált SARS-CoV-2 vírust teszünk egy katalizátort tartalmazó UMANA festéssel kezelt felületre, akkor a vírus nukleines anyagának kinyerésére körülbelül hatszor alacsonyabb a lehetőség, mint ami a katalizátort nem tartalmazó festéssel hasonló módon kezelt felületen.

Ez a hatás már az érintkezési időt követően percek alatt észlelhető, és általában állandó marad az idő múlásával.

Ezt az eredményt támasztja alá az a tény, hogy nemcsak az UMANA hatóanyaga aktív a vírus örökítőanyagával szemben közvetlenül az oldatban, hanem az is, hogy ez az adalék olyan reakciót hajt végre, amely elősegíti a polimerizációs hatás hatékonyságát.

Ez utóbbi tény azt is feltételezheti, hogy a katalizátorral és anélkül kezelt minták közötti Ct-különbség még alul is van becsülve, és ezért csökkentési hatása meghaladhatja a hatszoros értéket.