

(和訳)

レポート:

## RESPR HVAC装置によるアルミニウム表面上のSARS-CoV-2の不活化

クリスチアン・サラス(Cristhian Salas) – ホルヘ・オソリオ(Jorge Osorio)

2020年12月8日

### 抄録

人間の日常的活動において適用可能な有効なSARS-CoV-2不活化法を設計することで、COVID-19などの感染症の伝播や拡大を抑えるのに役立つ可能性がある。RESPR技術は空気中および物体表面からの病原体やアレルゲンの低減に有効であることが示されている。この技術は酸化粒子を放出し、人々が吸入する空気を浄化する装置で用いられている。本論ではアルミニウム表面における、様々な曝露時間での、RESPR HVAC装置のSARS-CoV-2不活化の有効性を検証した。プラークアッセイ法を用い、装置存在下での8つの曝露時点(10分から2880分まで)後のSARS-CoV-2力価を測定した。RESPR HVAC装置は、1440分後にアルミニウム表面のSARS-CoV-2感染粒子を99.991%低減したことが示された。

### 目次

|                   |   |
|-------------------|---|
| 抄録.....           | 1 |
| 材料および方法.....      | 1 |
| 材料の感染および試料採取..... | 1 |
| ウイルス不活化の定量.....   | 2 |
| データ解析.....        | 3 |
| 結果.....           | 3 |
| 結論.....           | 4 |

### 材料および方法

#### 材料の感染および試料採取

RESPR HVAC装置をバイオセーフティ・キャビネット(BSC)内に設置し、スイッチを入れた。70%エタノールにより消毒済みの24mm × 24mmの滅菌アルミ箔片を25分間UV光に曝露し、BSC内のペトリ皿に個別に置き、室温で保持した。1 × 10<sup>5</sup> PFUのSARS-CoV-2の接種液200 μLを、マイクロピペットチップを用いて各アルミ箔片上に載せて延ばした。各処理毎に複製を3つ調製し、8つの曝露時間(15、30、60、120、360、720、1440、および2880分)の評価ができるだけの試料を調製した(表1)。

各曝露時間の後、2mLの採取媒体(2%FBS含有DMEM)を各ペトリ皿に加え、1:11の初期希釈を調製し、アルミニウム材料をマイクロピペットを用いて4~5回再懸濁することで洗い流した。ウイルス懸濁液を採取し、均一性を得るために混合し、1mL遠心管に分注した。採取した各試料にすぐにラベルを貼付し、力価測定用に-80°Cで保存した。

表1. 評価した処理

| ウイルス量                          | 曝露時間(分)                                   | 処理         |
|--------------------------------|---|------------|
| 1x10 <sup>5</sup><br>PFU/200μL | 15、30、60、120、<br>360、720、1440、<br>および2880 | RESPR HVAC |

### ウイルス不活化の定量

回収したウイルス懸濁液を二つ組の混合プレートで希釈し(10倍、3段階:1/10、1/100、1/1000)、Vero E6を接種した96ウェルプレートに加えた。プレートを37°Cで1時間培養した。接種液を捨て、2%カルボキシメチルセルロースオーバーレイを加え、37°Cで24時間培養した。次にオーバーレイを捨ててプレートを洗浄し、-20°Cで10分間固定した(アセトン-メタノール溶液を使用)。固定後、プレートをPBS-Tで2回洗浄し、一次抗体(ヒト抗コロナウイルスIgG抗体、1:2000)を加え、37°Cで一晩培養した。その後一次抗体を捨て、プレートをPBS-Tで2回洗浄した。二次抗体(HRP結合ヤギ抗ヒトIgG抗体、1:2000)を加え、37°Cで2時間培養した。二次抗体の除去後、プレートをPBS-Tで2回洗浄し、色素原基質によりプラークを形成させた。Immunospot Image分析器でプラークをカウントし、オープンソースソフトウェアのViridotによりウイルス力価を測定した。力価減少率を以下の式を用いて計算した。

$$\text{減少率} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

ここで:Aは未処理(対照)のウイルス力価または初期力価;Bは処理後のウイルス力価。

## 結果

ウイルス力価は予想通り時間経過とともに減少した。平均値を表1および図1に報告している。感染から24時間(1440分)後、力価は45FFU/mLまで低下した。

表1. RESPR HVAC装置に曝露された24mm×24mmアルミ箔片から、感染後の様々な時点(0~2880分)で採取されたSARS-CoV-2接種ウイルスの平均力価および標準偏差。

| 時間(分) | 平均       |          |
|-------|----------|----------|
|       | (FFU/mL) | DS       |
| 0     | 5060     | 479.4789 |
| 15    | 3740     | 396.6106 |
| 30    | 3410     | 939.8404 |
| 60    | 2456.67  | 1045.482 |
| 120   | 1246.67  | 228.9833 |
| 360   | 110.333  | 127.0171 |
| 720   | 57.67    | 63.50853 |
| 1440  | 45.333   | 0        |
| 2880  | 10.67    | 0        |

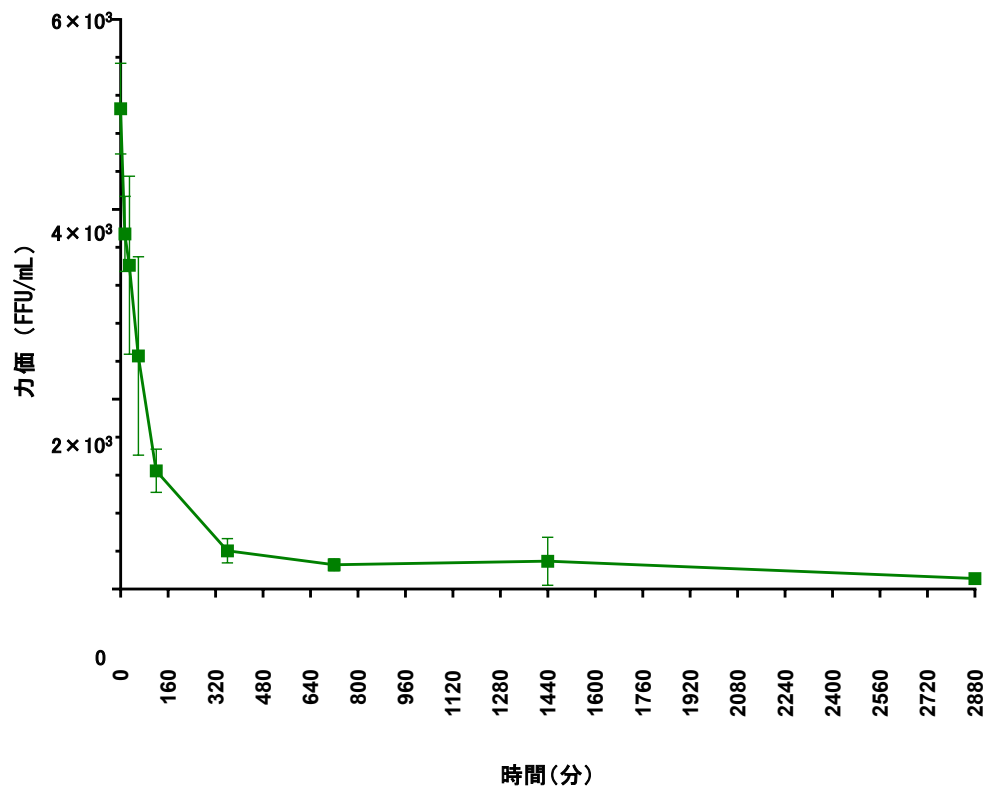


図1. RESPR HVAC装置に曝露された24mm×24mmアルミ箔片から、感染後の様々な時点(0~2880分)で採取されたSARS-CoV-2接種ウイルスの平均力価および標準偏差。

初期接種液 ( $\lambda = 5.06 \times 10^3$  PFU/mL) との比較で計算した SARS-CoV-2 力価の総減少量は、1440 分間の曝露後に 99.991% に達した (図3)。

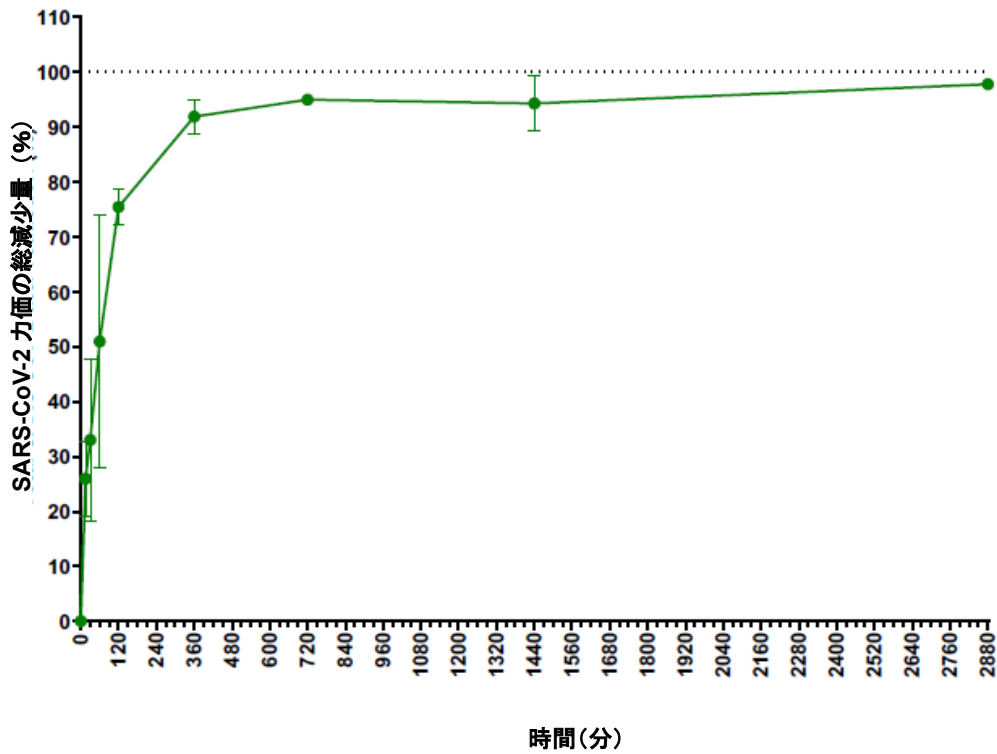


図3. RESPR HVAC装置に曝露された24mm×24mmアルミ箔片から、感染後の様々な時点(0~2880分)で採取されたSARS-CoV-2接種ウイルスの総減少量(%)。

## 結論

RESPR HVAC装置の使用時、1440分間の曝露後にアルミニウム表面のSARS-CoV-2感染粒子の最大99.991%の低減が得られた。この低減分の97.8%超は初回曝露の360分後に検出された。

(原文)

## REPORT:

# SARS-CoV-2 inactivation on aluminum surfaces by RESPR HVAC device

Cristhian Salas - Jorge Osorio

12/08/2020

## ABSTRACT

Designing effective methods of SARS-CoV-2 inactivation that can be applied in daily human activities can help diminish the transfer and spread of infectious diseases such as COVID-19. RESPR technology has shown to be effective in reducing pathogens and allergens from the air and from surfaces. It is used in devices that release oxidizing particles to purify the air that people inhale. We tested the SARS-CoV-2 inactivation efficacy of a RESPR HVAC device at different exposure times on aluminum surfaces. A plaque assay was used to measure SARS-CoV-2 titers after 8 different exposure time points (from 10 minutes to 2880 minutes) with the presence of the device. The RESPR HVAC device showed a reduction of 99.991% of the SARS-CoV-2 infectious particles on the aluminum surface after 1440 minutes.

## TABLE OF CONTENTS

|  |   |
|--|---|
| ABSTRACT .....                                 | 1 |
| MATERIALS AND METHODS .....                    | 1 |
| Materials infection and sample collection..... | 1 |
| Viral-inactivation quantification.....         | 2 |
| Data analysis.....                             | 3 |
| RESULTS .....                                  | 3 |
| CONCLUSIONS .....                              | 4 |

## MATERIALS AND METHODS

### Materials infection and sample collection

RESPR HVAC device was placed inside a Biosafety cabinet (BSC) and turned on. Sterile aluminum foil pieces of 24mm x 24mm previously disinfected with 70% ethanol and exposed to UV light for 25 minutes, were individually placed in a petri dish inside the BSC and were kept at room temperature. A 200µl inoculum of  $1 \times 10^5$  PFU of SARS-CoV-2 was placed and extended on each aluminum piece using a micropipette tip. Three replicates were prepared per treatment and enough samples were prepared to evaluate 8 exposure times (15, 30, 60, 120, 360, 720, 1440 and 2880 minutes) (Table 1).

Following each exposure time, 2ml of collection media (DMEM with 2%FBS) was added to each petri dish, making an initial dilution of 1:11, and the aluminum material was washed out by resuspending four to five times using a micropipette; the viral suspension was collected, mixed for homogeneity and aliquoted into 1ml centrifuge tubes. Each collected sample was immediately labeled and stored at -80°C for titration assays.

Table 1. Evaluated treatments

| <b>Virus dose</b>              | <b>Exposure time (min)</b>                  | <b>Treatment</b> |
|--------------------------------|---|------------------|
| 1x10 <sup>5</sup><br>PFU/200µl | 15, 30, 60, 120, 360,<br>720, 1440 and 2880 | RESPR HVAC       |

### **Viral-inactivation quantification**

The recovered virus suspension was diluted (10-fold, 3 dilutions: 1/10, 1/100, 1/1000) in a mixing plate in duplicate and added to 96 well Vero E6 seeded plates. Plates were incubated for 1 hour at 37°C. Inoculum was discarded and a 2% carboxymethylcellulose overlay was added and incubated for 24 hours at 37°C. Next, the overlay was discarded, plates washed and fixed for 10 minutes at -20°C (using acetone-Methanol solution). Following fixation, plates were washed two times with PBS-T and a primary antibody (IgG Human anti-Coronavirus, 1:2000) was added and incubated overnight at 37°C. The primary antibody was then discarded, and plates were washed twice with PBS-T. A secondary antibody (Goat IgG Anti-Human HRP conjugated, 1:2000) was added and left to incubate for 2 hours at 37°C. After removing the secondary antibody, plates were washed twice with PBS-T and plaques were developed with a Chromogen substrate. Plaques were counted using Immunospot Image analyzer and open-source software Viridot to determine the viral titer. The titer reduction percentage was calculated using the following formula:

$$\text{Percent reduction} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

Where: A is the virus titer with no treatment (Control) or the initial titer; and B is the viral titer after treatment.

## RESULTS

Viral titers decreased with time as expected, mean values are reported in table 1 and Figure 1; 24 hours after infection (1440 minutes) the titer was reduced up to 45 FFU/mL.

Table 1. Mean titers and standard deviation of SARS-CoV-2 inoculum collected at different time points (from 0 to 2880 minutes) after infection from 24mm x 24mm aluminum foil pieces exposed to a RESPR HVAC device.

| Time (m) | Mean (FFU/mL) | DS       |
|----------|---------------|----------|
| 0        | 5060          | 479.4789 |
| 15       | 3740          | 396.6106 |
| 30       | 3410          | 939.8404 |
| 60       | 2456.67       | 1045.482 |
| 120      | 1246.67       | 228.9833 |
| 360      | 110.333       | 127.0171 |
| 720      | 57.67         | 63.50853 |
| 1440     | 45.333        | 0        |
| 2880     | 10.67         | 0        |

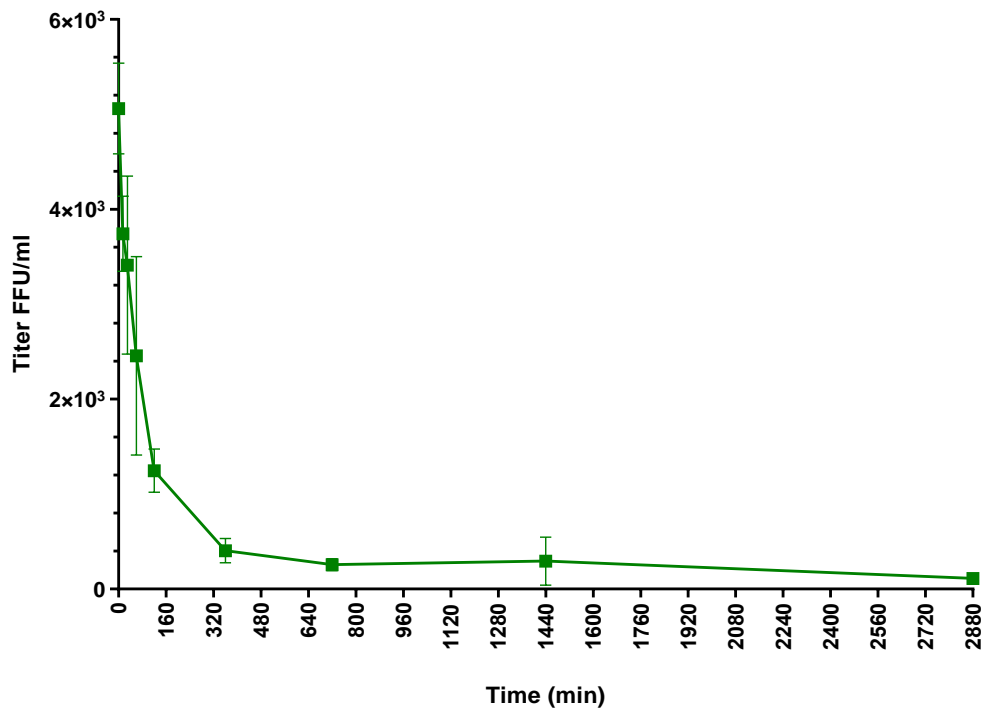


Figure 1. Mean titers and standard deviation of SARS-CoV-2 inoculum collected at different time points (from 0 to 2880 minutes) after infection from 24mm x 24mm aluminum foil pieces exposed to a RESPR HVAC device.

The total reduction of SARS-CoV-2 titer, calculated in relation to the initial inoculum ( $\bar{X}=5.06 \times 10^3$  PFU/ml), reached 99.991% after 1440 minutes of exposure (Figure 3).

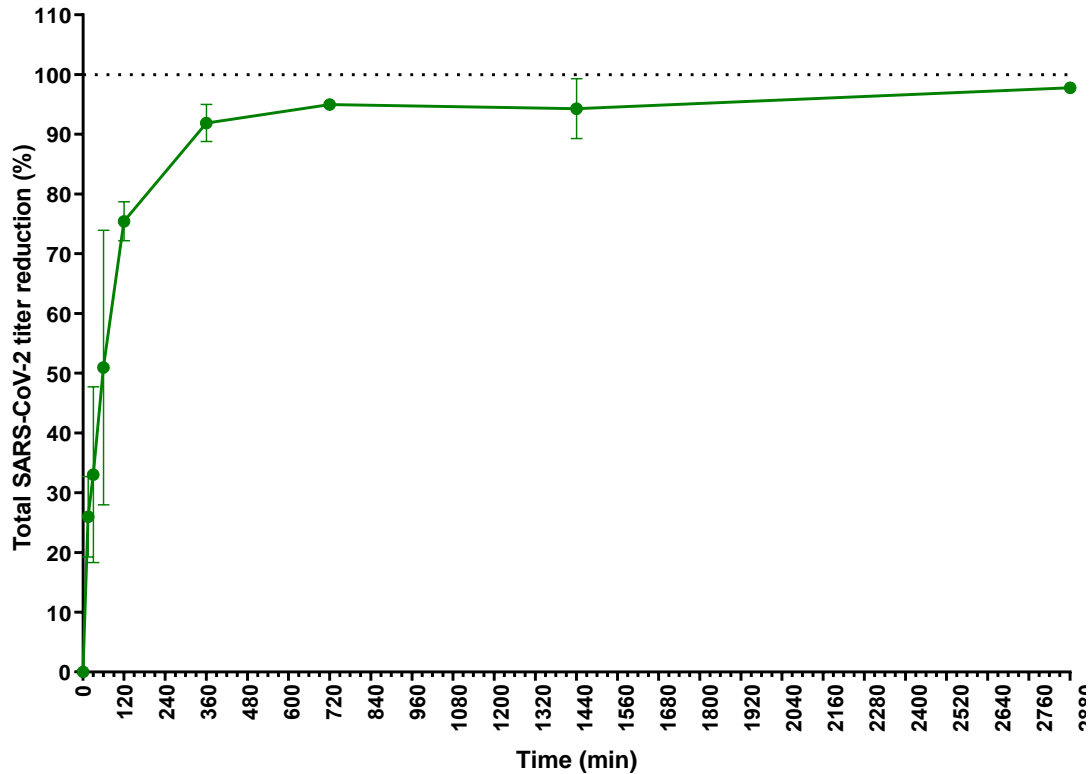


Figure 3. Total reduction (%) of SARS-CoV-2 inoculum collected at different time points (from 0 to 2880 minutes) after infection from 24mm x 24mm aluminum foil pieces exposed to a RESPR HVAC device.

## CONCLUSIONS

While using the RESPR HVAC device, a maximum reduction of 99.991% of SARS-CoV-2 infectious particles on an aluminum surface was reached after 1440 minutes of exposure. More than 97.8% of this reduction was detected 360 minutes after the initial exposure.