



**Viral viability assay**

**Report for ViruSafe Technologies**

Aim: Monitor the survival of Pseudo typed Lentivirus (Luciferase Reporter) CAT#79942-1 upon incubation in a chamber with ViruSafe Technologies apparatus.

**Materials and Consumables**

- Chamber 55\*50\*60 cm
- 9 Slides
- 66µL Spike (SARS-CoV-2) Pseudo typed Lentivirus (Luciferase Reporter) CAT#79942-1
- 66µL DMEM medium
- Luciferase reagent CAT#60690/1
- 2\*96 well plate seeded with HEK 293 – ACE-2 cells
- 96 well plate
- 1-10 µL Tips
- 1-10 µL pipettor

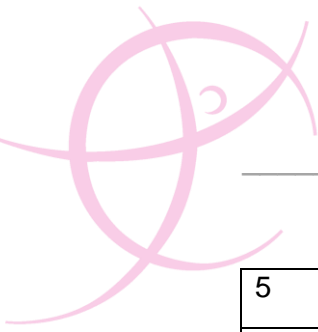
**Protocol:**

- Add 10µL mix Virus-Medium (1:1) to Slide 1-10; 13
- Add 10µL mix Virus-Medium (1:1) to 96 well plate (2 wells)
- Remove virus at correct time point by adding 20 µL medium of seeded well- on slide and back to well.

**Experiment:**

- We began experiment on time but PPB meter show low amount therefore after 9 min we turn on the second UV light.
- The PPB meter yet exhibit low amount therefore on 23 min we turn off the Vacuum and replace the UV lamp.
- At this time slides were incubated at close box until we continued the experiment.
- The countdown was reset to T=0

Num #	T=	Min/Hour	Amount	Comment	Well	Plate
1	30	min	10µL	Test	D2	1
2	60	min	10µL	Test	D3	1
3	90	min	10µL	Test	D4	1
4	2	Hour	10µL	Test	D5	1



המכון למחקר רפואי ברמב"ם

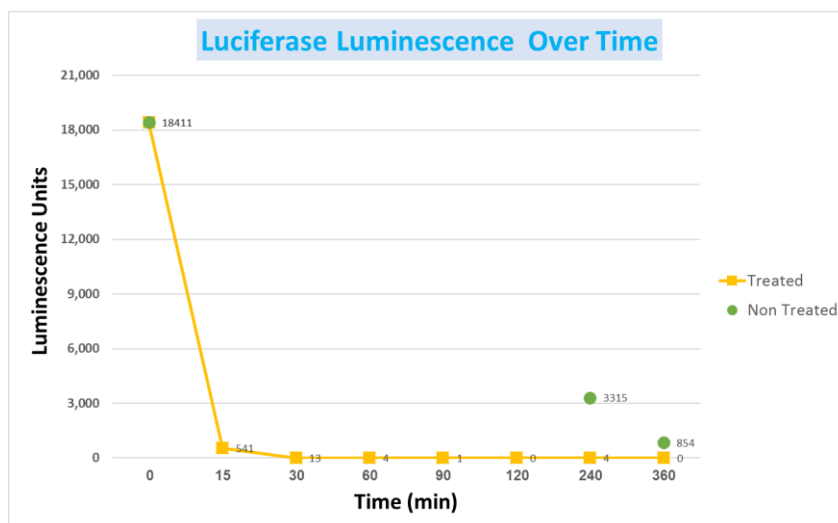
5	4	Hour	10µL	Test	D6	1
6	6	Hour	10µL	Test	D7	1
7	4	Hour	10µL	Ctrl	D2	2
8	6	Hour	10µL	Ctrl	D3	2
9	15	min	10µL	Test	D1	1
10	6	Hour	10µL	Test	D8	1
11	2 -Plate	Hour	10µL	Test	D5	2
12	6- Plate	Hour	10µL	Test	D6	2
13	0	Min	10µL	Test/ Ctrl	D1	2

07.10.20:

- Mix 1:100 Luciferase reagent: lysis buffer (17µL:1700µL) – luciferase buffer.
- Mix 1:1 luciferase buffer: infected cell medium (100µL:100µL) and pipette a bit.
- Incubate 15 min at RT covered with aluminum foil on shaker.
- Transfer 170µL to Black 96 well plate.
- Read result at Plate Reader:

Mode	Luminescence	
Attenuation	NONE	
Integration Time	1000	ms
Settle Time	0	ms

**Results:**





## המכון למחקר רפואי ברמב"ם

Num #	T=	Min/Hour	Comment	Luminescence Units
1	30	min	Test	13
2	60	min	Test	1
3	90	min	Test	1
4	2	Hour	Test	0
5	4	Hour	Test	4
6	6	Hour	Test	0
7	4	Hour	Ctrl	3315
8	6	Hour	Ctrl	854
9	15	min	Test	541
10	6	Hour	Test	1
11	2 -Plate	Hour	Test	27
12	6- Plate	Hour	Test	3
13	0	Min	Test/ Ctrl	18411

### Program:

Application: Tecan i-control  
Device: infinite 200Pro  
Firmware: V\_3.37\_07/12\_Infinite (Jul 20 2012/13.56.47)  
Tecan i-control, 1.10.4.0  
Serial number: 1306007910  
MAI, V\_3.37\_07/12\_Infinite (Jul 20 2012/13.56.47)

### Conclusion:

In exposure of Spike (**SARS-CoV-2**) Pseudo typed Lentivirus (Luciferase Reporter) CAT#79942-1 inside 55\*50\*60 cm chamber with the "**Air & Surfaces Sterilizer**", we detected a **sharp reduction of 97% after 15 min of live virus**, unlike the control sample, in which, after 4h we detected 18% live virus.  
The purpose of the experiment was to detect the Pseudo typed virus resistance upon incubation in a chamber with the "Air & Surfaces Sterilizer" apparatus.  
Rational: as long as the virus is alive, it infects the host cell, hence higher luminescence is detected.



## המכון למחקר רפואי ברמב"ם

The results obtained were compared to a control samples which was not exposed to the "Air & Surfaces Sterilizer".

**After incubation of 30 min a reduction of 99.9% in luminescence units was detected representing a reduction in virus viability.**

- Due to collection failure 2H control sample was not collected, instead 4H control sample was tested.





## המכון למחקר רפואי ברמב"ם

### ניסוי שרידות הוירוס CAT#79942-1 (Pseudo typed Lentivirus (Luciferase Reporter)

#### לאחר חשיפה למכשיר הטיהור של חברת "וירוסייף טכנולוגיות":

מטרה: בדיקת יעילות מכשיר הטיהור של חברת "וירוסייף טכנולוגיות" על וירוס מהונדס בעל מרכיב הספייק של SARS-CoV-2 וכימות שרידות הוירוס לאחר אינקובציה עם המכשיר של החברה לפרקי זמן שונים בעזרת מדידת לומינסנציה.

#### מהלך הניסוי:

המכשיר שהחברה סיפקה הוצב בתוך תא במעבדת מרכז המחקר למניעת מגפות ברמב"ם – התא עם המכשיר הוכנס לתוך מנדף ביולוגי ברמת BSL2 כמתחייב מנוהלי הבטיחות.

10 מיקרוליטרים של וירוס מדומה מסוג:

Spike (SARS-CoV-2) Pseudo typed Lentivirus Luciferase Reporter (BPS Bioscience #79942-1)

הוטענו בנקודה מסוימת על גבי זכוכית נושא. זכוכיות הנושא הונחו בתוך התא הייעודי בתוך מנדף ביולוגי למשך נקודות הזמן הבאות- 0, 30 דקות, שעה, שעה וחצי, שעתיים, ארבע שעות, ושש שעות. כשבכל נקודת זמן, הוצאה זכוכית הנושא מן התא, האזור בו הונחו דגימות הוירוס נשטפו בעזרת 10 מיקרוליטר מדיום גידול תאים, אשר הועברו לתוך בארית בפלטת 96 באריות לשם גידול יחד עם תאי HEK-293.

תאי HEK-293, יחד עם הוירוס מדומה שהוסר מזכוכית הנושא, הודגרו כ-48 שעות באינקובטור. בזמן ההדגרה הוירוס המדומה חדר לתאים וגרם לביטוי של גן מדווח על לומינסנציה לתאים המודבקים. כל תא הודבק ע"י וירוס מדומה 1 בלבד.

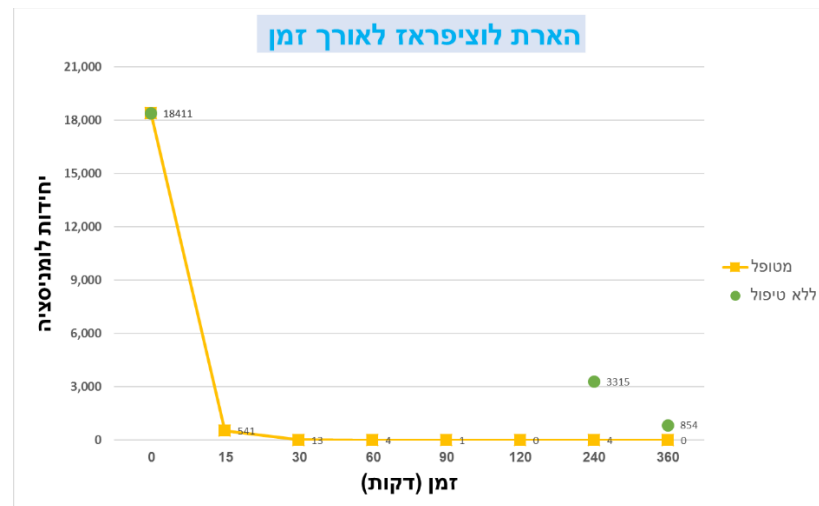
ביקורות-

1. בנוסף הוכנסה לתיבת הניסוי פלטת 96 באריות אשר כללה 2 באריות ניסוי נוספות עם 10 מיקרוליטר וירוס מדומה. דגימות אלה טופלו כנ"ל.
  2. במקביל 3 דגימות זהות הונחו בתוך קופסא סגורה, מנותקות מהשפעת המכשיר ונאספו כנ"ל ב-3 נקודות זמן- 0, 4 שעות ו-6 שעות. המשך הטיפול בדגימות נעשה כנ"ל.
- בתום 48 שעות ההדגרה של הוירוס עם התאים הוסף מיקס ריאגנט המיועד לקלוט את האור הנפלט מן התאים המודבקים בוירוס מדומה.
- בעזרת מכשיר Plate reader (קורא צלחות) בוצעה קריאה לזהות ולכמת את רמות האור הנפלט (לומינסנציה).



## המכון למחקר רפואי ברמב"ם

### תוצאות :



- בנקודת ההתחלה שהיא נקודת הביקורת הראשונה של הניסוי נצפתה כמות גבוהה של וירוס מדומה השווה ל 18,411 יחידות אור (לומינסציה)- לא ניתן להשוות כמות זו למספר יחידות וירוס מדומה.
- בנקודת הביקורת שלאחר 4 שעות נמדדו כ 3315 יחידות אור השוות לכ- 82% .
- בנקודת הביקורת האחרונה לאחר כ 6 שעות נמדדו כ 854 יחידות אור השוות לכ- 95%
- לאחר 15 דקות חשיפה למכשיר נמדדו 541 יחידות אור המציגות ירידה חדה של 97% .
- לאחר 30 דקות חשיפה למכשיר נצפתה ירידה השואפת ל 99.9% יחידות אור .
- בפלטת 96 באריות נצפתה ירידה של 99.8% לאחר כשעתיים של חשיפה למכשיר. (יש לציין שלא נמדדה לפני כן מדידה נוספת)
- בפלטת 96 באריות נצפתה ירידה של 99.9% לאחר כ 4 שעות חשיפה למכשיר.



## המכון למחקר רפואי ברמב"ם

### דין ומסקנות:

עקרון השיטה שבה נעשה שימוש בניסוי מבוסס על זה שכל שכמות הוירוס המדומה החי גבוהה יותר כך תהיה הדבקה רבה יותר של תאים אשר תתבטא בהארה פלורסנטית. התוצאות שהתקבלו עברו אנליזה בהשוואה לדגמי הביקורת שלא הושפעו מפעילות המכשיר.

לאחר כ 15 דקות מהחשיפה למכשיר נצפתה ירידה חדה של כ 97% בכמות יחידות האור- משמע ירידה של כ 97% בכמות הוירוס המדומה החי בהשוואה לזמן 0 ביקורת מעל גבי משטח חשוף.

כמו כן חלה ירידה חדה יותר בהשוואה לביקורת גם בפלטת 96 באריות – המדמה מיקום מוסתר יותר מזכוכית נושא חשופה, משמע כי המכשיר משמיד וירוס מדומה חבי .

הירידה בכמות הוירוס המדומה החי נבעה חד משמעית הודות לפעילות המכשיר בתיבה, היות ובהשוואה לביקורת, לאחר 4 שעות עדין נצפה כ 18% וירוס מדומה חי על גבי משטח זכוכית הנושא, כאשר לאחר כ 30 דקות בזמן חשיפה למכשיר כמות הוירוס שנמדדה שאפה לאפס.

לסיכום, השימוש בוירוס מהונדס הינה מערכת מקובלת שמדמה את תגובות הוירוס SARS-cov2 ומהווה מודל לבחינת שרידות הוירוס. חשיפת הוירוס למכשיר של חברת "וירוסייף טכנולוגיות" הביאה לפגיעה בחיות של הוירוס בקורלציה עם משך זמן החשיפה.

בברכה,  
ד"ר שלומית יהודאי-רשף