

Actividad antiviral de superficies tratadas frente a SARS-CoV-2.

Informe de resultados.

Cliente	Umbrella Technologies
Producto	UMBRELLA ZERO AC
Petición	Actividad antiviral
Muestra	Planchas superficie no porosa
Virus	SARS-CoV-2.
Instalaciones	BSL3.
Periodo de la prueba	23/11/2020– 18/12/2020.

1. Resumen.

Este ensayo se ha realizado para determinar la actividad antiviral del producto UMBRELLA ZERO AC en superficies no porosas frente al nuevo coronavirus SARS-CoV-2. Tres réplicas tratadas con el producto a ensayar fueron inoculadas con una concentración inicial conocida del virus SARS-CoV-2 durante 24 horas y se comparó su efecto antiviral respecto de muestras sin tratamiento. El virus fue recuperado posteriormente y cuantificado mediante plaqueo en cultivo celular. Los resultados mostraron un efecto antiviral total frente al SARS-CoV-2.

2. Introducción.

El SARS-CoV-2 es un virus altamente transmisible y patogénico responsable de la enfermedad conocida como COVID-19. Desde su primera notificación en Wuhan (China) a finales del 2019, se ha diseminado alrededor de todo el mundo causando una pandemia responsable de cientos de miles de muertes y una crisis económica sin precedentes. Una vía importante para su diseminación es el contacto directo de las manos con superficies contaminadas y el posterior contacto de estas con la boca, la nariz o los ojos (1).

3. Metodología.

Este protocolo se ha llevado a cabo por Virnóstica S.L. basándose en la norma ISO 21702 (2). Las modificaciones realizadas de esta norma se detallan a lo largo del informe.

3.1 Equipación y materiales.

Instalaciones.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en los laboratorios de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) situadas en el campus del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III).

Materiales ensayados.

El material tratado y el material sin tratar usado como referencia, fueron suministrados en condiciones de esterilidad por el cliente.

El formato de los materiales consistió en placas cuadradas de acero de 50 x 50 mm y 10 mm de grosor.

Medios de cultivo y reactivos.

- Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Hyclone.
- Medio Eagle modificado por Dulbecco 2X (DMEM 2X), Biological Industries.
- Tampón fosfato salino (PBS), Gibco.
- Caldo SCDLP, Huankai Microbial.
- Suero fetal bovino (FBS), Gibco.
- Tripsina-EDTA (0.25%), Gibco.
- Penicilina-Estreptomicina, Lonza.
- Glutamina, Lonza.
- Agarosa low melting, Conda.
- Formaldehido, Merck.
- Cristal violeta, Fluka.
- Metanol, Panreac Applichem.

Línea celular y virus.

- Vero-E6. Línea celular establecida aislada a partir de riñón de mono verde africano.
- SARS-CoV-2. Cepa proveniente de la colección del Centro Nacional de Microbiología. El virus se creció en células VERO-E6 y fue titulado por un ensayo de plaqueo. El título con el que se realizó el ensayo fue 1×10^7 unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ml).

3.2 Controles.

Los controles fueron realizados para certificar que el caldo utilizado para recuperar el virus (caldo SCDLP) carece de efecto citotóxico, no reduce la sensibilidad de las células al virus e inactiva la actividad antiviral.

Control de citotoxicidad.

Se añadieron 10 ml del caldo SCDLP en una placa Petri con las muestras (tres tratadas y tres sin tratar). Las planchas quedaron bañadas completamente en el caldo y se pipetearon por lo menos cuatro veces. Por cada muestra, se recogió el caldo y se inocularon 0,2 ml por duplicado en pocillos M6 con las células correspondientes en confluencia. Se incubaron las células durante una hora a 37°C y posteriormente se añadió sobre ellas una cubierta sólida de agar. Una vez solidificado el agar, se incubaron a 37°C durante 72 horas.

Para superar el control no se debe observar ningún efecto tóxico en las células ensayadas.

Control de sensibilidad de las células al virus y de la inactivación de la actividad antiviral.

Se añadieron 10 ml del caldo SCDLP en una placa Petri con las muestras (tres tratadas y tres sin tratar). Las planchas quedaron bañadas completamente en el caldo y se pipetearon por lo menos cuatro veces. Por cada muestra, se recogieron 5 ml de caldo SCDLP y se almacenaron en tubos de ensayo. A la vez, se añadieron 5 ml de caldo SCDLP sin contacto con las muestras en otros tres tubos de ensayo. Se añadieron 50 µl del virus a una concentración de 4-6 x10⁴ PFU/ml en los nueve tubos y se mantuvieron durante 30 minutos a 25°C. Una vez transcurrido este tiempo, se titularon mediante un ensayo de plaqueo en cultivo celular.

El título infectivo de la suspensión obtenida se obtiene según la siguiente fórmula:

$$S = 5 \times P \times D$$

Donde:

- S es el título infectivo del virus por ml de suspensión.
- P es la media de las placas contadas por duplicado.
- D es el factor de dilución del pocillo donde se han contado las placas.

Para superar este control se deben dar las siguientes condiciones:

$$|S_n - S_u| \leq 0,5$$

$$|S_n - S_t| \leq 0,5$$

Donde:

- S_n es la media de los logaritmos decimales de los títulos infectivos (PFU/ml) de las suspensiones obtenidas de los tres caldos SCDLP utilizados como control.
- S_u es la media de los logaritmos decimales de los títulos infectivos (PFU/ml) de las suspensiones obtenidas de las tres muestras no tratadas.
- S_t es la media de los logaritmos decimales de los títulos infectivos (PFU/ml) de las suspensiones obtenidas de las tres muestras tratadas.

3.3. Procedimiento del ensayo.

Preparación de las muestras.

El número de placas tratadas y no tratadas para el ensayo fueron las siguientes:

1. Tres muestras no tratadas inoculadas con el virus y recogidas inmediatamente (referencia 0 horas).
2. Tres muestras no tratadas inoculadas con el virus y recogidas tras 24 horas de contacto (referencia 24 horas).
3. Tres muestras tratadas inoculadas con el virus y recogidas tras 24 horas de contacto (UMBRELLA ZERO AC 24 horas).

Inoculación del virus en las muestras.

Las muestras se introdujeron en condiciones de esterilidad dentro de una placa Petri y fueron inoculadas en el centro de estas con 0,4 ml del virus (1 x 10⁷ PFU/ml). A continuación, se cubrieron con un film de polietileno de 40 x 40 mm y 0,065 mm de grosor presionando el líquido

para que se distribuyera sin rebosar (Figura 1), y se incubaron durante el tiempo necesario dependiendo del tipo de ensayo.

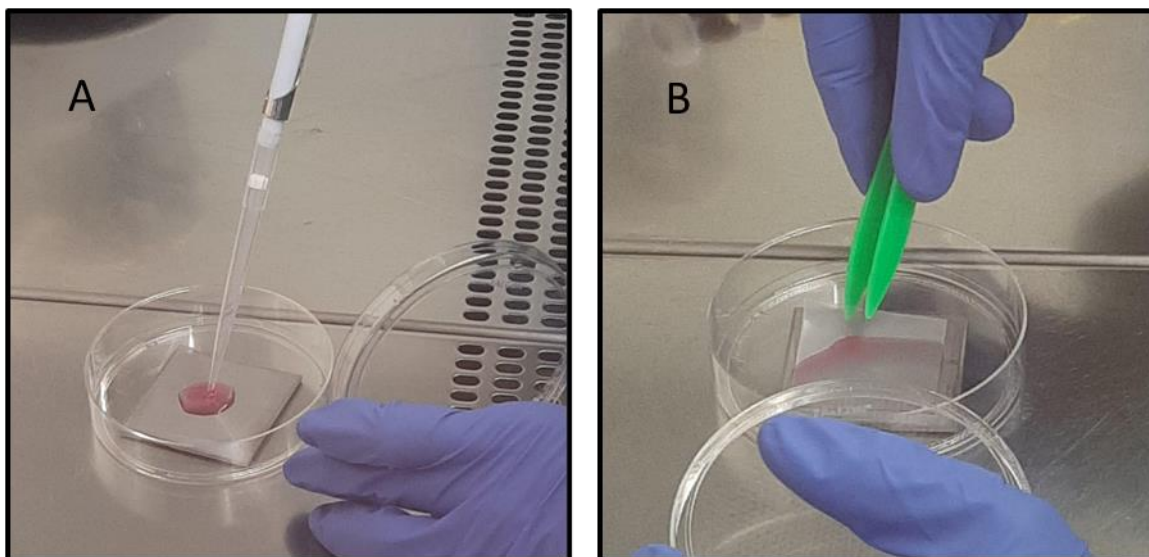


Figura 1: A) Proceso de inoculación del virus en las muestras. B) Recubrimiento con el film de polietileno.

Recuperación del virus.

Transcurrido el tiempo necesario en cada ensayo, el virus se recogió cubriendo totalmente las placas con 10 ml de caldo SCDLP y pipeteando por lo menos cuatro veces. Se guardaron 2 ml para su posterior análisis.

Medida de la infectividad de las superficies tratadas.

Tras la inoculación del virus como se ha descrito anteriormente, se introdujeron las placas (tres tratadas y tres sin tratar) en una estufa a 25°C y aproximadamente 90 % de humedad relativa (no controlada) durante 24 horas. Simultáneamente, tres placas no tratadas fueron inoculadas y recogidas inmediatamente para ser usadas como control de infectividad a tiempo 0 horas.

Ensayo por plaqueo en cultivo celular.

Para cada muestra a titular, se sembró el día anterior al ensayo una placa de 6 pocillos con 7×10^5 células VERO-E6 por pocillo. Con el virus recuperado en cada condición, se realizaron diluciones decimales seriadas y se inocularon 0,2 ml por pocillo por duplicado en las células susceptibles tanto de la suspensión original como de las suspensiones diluidas. Después de una hora de adsorción, se añadió una capa sólida de agarosa para restringir el crecimiento del virus y se incubaron las placas durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. El virus se inactivó con formaldehído y las células se tiñeron con cristal violeta para permitir visualizar las placas de lisis.

Cálculo del título infectivo.

El título infectivo del virus de cada una de las suspensiones obtenidas se calculó mediante la fórmula:

$$N=(5xCxDxV) /A$$

Donde:

- N es el título infectivo del virus recuperado por cm² de muestra.
- C es la media del número de placas contado (por duplicado).
- D es el factor de dilución del pocillo donde se han contado las placas.
- V es el volumen de caldo SCDLP en ml añadido a la muestra.
- A es el área del film en cm² con el que se cubrió el inóculo.

El número medio de placas cuando no se observe ninguna se considerará como 5V.

Condiciones para la validez de la prueba.

Para la validación de la prueba se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. El logaritmo decimal del número de placas obtenido tras recoger el virus inmediatamente después de su inoculación en el material no tratado debe cumplir los siguientes requerimientos:

$$(L_{max}-L_{min}) / (L_{med}) \leq 0,2$$

Donde:

- L_{max} es el Log₁₀ del número máximo de placas contadas en una muestra.
 - L_{min} es el Log₁₀ del número mínimo de placas contadas en una muestra
 - L_{med} es el Log₁₀ de la media del número de placas de las tres muestras.
2. El título medio de las suspensiones obtenidas de las muestras no tratadas recogidas inmediatamente después de la inoculación debe estar entre 2,5 x 10⁵ y 1,2 x 10⁶ PFU/cm².
 3. El título obtenido en cada una de las suspensiones obtenidas en las muestras no tratadas tras 24 horas no debe ser menor de 6,2x10² PFU/cm².
 4. Los valores de los controles de citotoxicidad y sensibilidad deben ser correctos.

Cálculo de la actividad antiviral.

El calculo de la actividad antiviral se realiza mediante la siguiente formula:

$$R= (U_t-U_0) - (A_t-U_0) = U_t - A_t$$

Donde:

- R es la actividad antiviral.
- U₀ es la media del Log₁₀ del número de placas expresado en PFU/cm² de las tres muestras no tratadas recogidas inmediatamente después de la inoculación
- U_t es la media del Log₁₀ del número de placas expresado en PFU/cm² de las tres muestras no tratadas recogidas 24 horas después de la inoculación.
- A_t es la media del Log₁₀ del número de placas expresado en PFU/cm² de las tres muestras tratadas recogidas 24 horas después de la inoculación

4. Resultados.

Validación de la prueba.

1. Muestras no tratadas recogidas a tiempo 0 horas: $(L_{max}-L_{min}) / (L_{med}) = 0,067 (\leq 0,2)$. (Tabla 1).
2. Título medio de las muestras no tratadas recogidas a tiempo 0 horas: $3,07 \times 10^5$ PFU/cm² ($>2,5 \times 10^5$ y $<1,2 \times 10^6$) (Tabla 3).
3. En todas las muestras no tratadas se obtuvo un título mayor de $6,2 \times 10^2$ PFU/cm² tras 24 horas siendo la media de $4,3 \times 10^4$ PFU/cm² (Tabla 3).
4. Los valores obtenidos en el control de sensibilidad e inactivación de la actividad antiviral fueron $\leq 0,5$:

$$|S_n - S_u| = 0,068$$

$$|S_n - S_t| = 0,131$$

(Tabla 2).

El control de citotoxicidad no mostró ninguna diferencia entre las distintas muestras ensayadas. No se observó ningún efecto tóxico en las células.

Muestra	Tiempo	Nº de placas (dil-4)	Log10	Log10 (Media)	Valor de validación <0,2
Referencia 1	0 horas	9	0,95	0,99	0,067
Referencia 2	0 horas	10,5	1,02		
Referencia 3	0 horas	10	1,00		

Tabla 1: Valores de validación de las muestras no tratadas recogidas inmediatamente después de depositar el inóculo viral.

Muestra	Nº de placas (dil-1)	PFU/ml (Media)	Log10
Caldo SCDLP 1	11,5	575	2,76 (S _n)
Caldo SCDLP 2	11,5		
Caldo SCDLP 3	11,5		
Referencia 1	8	491,5	2,69 (S _u)
Referencia 2	11,5		
Referencia 3	10		
UMBRELLA ZERO AC 1	9	425	2,63 (S _t)
UMBRELLA ZERO AC 2	7,5		
UMBRELLA ZERO AC 3	9		

Tabla 2: Valores utilizados para la validación del control de sensibilidad e inactivación de la actividad antiviral.

Infectividad de las superficies tratadas.

Los resultados mostraron una reducción total del virus viable en cultivo celular de las muestras recuperadas a partir de las superficies tratadas tras 24 horas de contacto con el inóculo, no observándose ninguna placa de lisis en la suspensión de virus sin diluir (Dil 0) (Tabla 3, Figura 2, Figura 3).

La actividad antiviral de la superficie tratada fue:

$$R = 4,63 - 0,49 = 4,14 \text{ (reducción viral > 99,99\%)}$$

Muestra	Tiempo	Nº de placas (dil-4)	PFU/cm2	Log10	Log10 (Media)
Referencia 1	0 horas	9	281.250	5,45	5,49 (U ₀)
Referencia 2	0 horas	10,5	328.125	5,52	
Referencia 3	0 horas	10	312.500	5,49	
Nº de placas (dil-3)					
Referencia 1	24 horas	16	50.000	4,70	4,63 (U _t)
Referencia 2	24 horas	12,5	39.062,5	4,59	
Referencia 3	24 horas	13	40.625	4,61	
Nº de placas (dil 0)					
UMBRELLA ZERO AC 1	24 horas	0	<3,1	0,49	0,49 (A _t)
UMBRELLA ZERO AC 2	24 horas	0	<3,1	0,49	
UMBRELLA ZERO AC 3	24 horas	0	<3,1	0,49	

Tabla 3: Datos de infectividad de las muestras ensayadas.

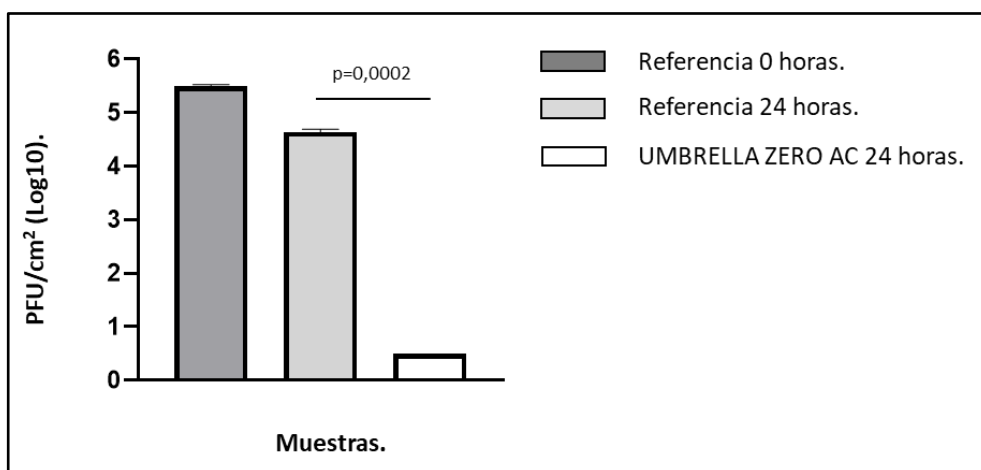


Figura 2: PFU/cm2 del virus SARS-CoV-2 obtenidas en cada una de las muestras. El gráfico representa la media y la desviación típica de tres réplicas por cada condición. La comparación estadística entre condiciones se realizó mediante una t de Student. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas si $p \leq 0,05$.

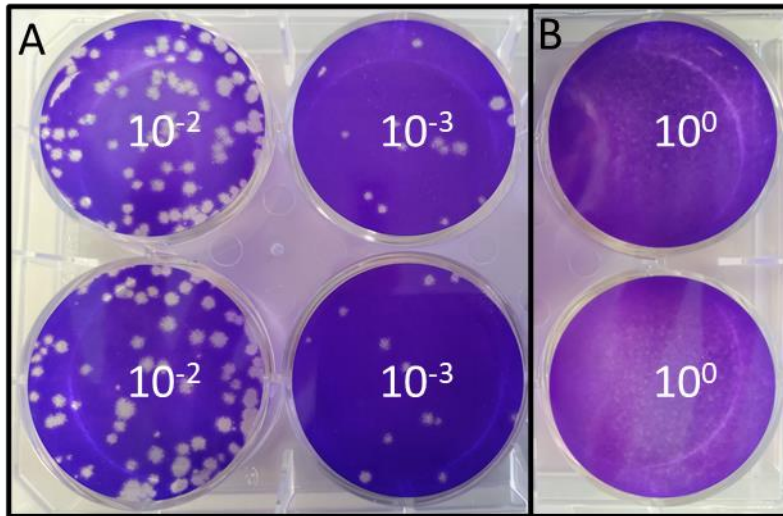


Figura 3: Ensayo de plaqueo representativo de A) Referencia 24 horas y B) UMBRELLA ZERO AC 24 horas. En cada pocillo se muestra el factor de dilución de la suspensión viral inoculada.

5. Conclusiones.

Los ensayos realizados para determinar la actividad antiviral en superficies no porosas tratadas con el compuesto UMBRELLA ZERO AC han mostrado una reducción viral de 4,14 unidades logarítmicas respecto a las superficies no tratadas. Esto implica una reducción viral mayor del 99,99% por lo que se considera que el producto tiene un efecto antiviral total.

6. Referencias.

1. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. World Health Organization. Scientific brief, 9 July 2020.
2. International Standard ISO 21702. Medida de la actividad antiviral en plásticos y otras superficies no porosas.

Realizado por:



Rubén González Sanz

rgonzalez@virnostica.bio

Fecha del informe:

21/12/2020