

# Technical report anti- SARS-CoV-2



**Client:** Brentareno srl

Via Enrico Fermi, 31 – Asolo (Tv)

**Project:**

Inattivazione del SARS-CoV-2 dalle superfici tessili.

**Date:**

18 novembre 2020

**Authors:**

High Biocontainment Unit of the Animal Health Research Center (CReSA) of the Institute for Agrifood Research and Technology (IRTA)



## INFORME FINAL

### TÍTULO:

### Eficacia virucida de una cabina con OZONO para uso en superficies textiles frente a SARS-CoV-2

Localización estudio: IRTA-CReSA Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries Centre de Recerca en Sanitat Animal Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), España	Promotor:  Brentareno Srl Viale E. Fermi 31 Asolo (TV) Italy Mail: <a href="mailto:info@brentareno.com">info@brentareno.com</a> Phone: +39 0423 55283
--	--

NÚMERO DE ESTUDIO: SA-10804-20

VERSIÓN: FINAL

FECHA: Diciembre, 2020

Firma:

Directora del estudio

Cristina Lorca Oró, PhD

## ÍNDICE

1. INFORMACIÓN GENERAL .....	3
1.1. Título del estudio.....	3
1.2. Identificación del estudio .....	3
2. PERSONAL IMPLICADO E INSTALACIONES .....	4
3. OBJETIVO DEL ESTUDIO .....	5
4. FECHAS DEL ESTUDIO.....	5
5. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	5
6. MATERIAL .....	6
6.1. Armario de Ecozono.....	6
6.2. Virus.....	6
7. METODOLOGÍA .....	6
7.1. Preparación de muestras de tejido (algodón) inoculadas con SARS-CoV-2.....	6
7.2. Ensayo virucida con armario de Ecozono .....	7
7.3. Titulación viral .....	7
7.4. Análisis estadístico.....	8
8. RESULTADOS.....	8
8.1. Resultados eficacia virucida.....	8
9. CONCLUSIONES .....	9

### INFORMACIÓN GENERAL

#### Título del estudio

Eficacia virucida de una cabina con OZONO para uso en superficies textiles frente a SARS-CoV-2

#### Identificación del estudio

Número interno IRTA-CReSA: SA-10804-20

## PERSONAL IMPLICADO E INSTALACIONES

### Localización del estudio:

IRTA-CReSA

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Centre de Recerca en Sanitat Animal

Campus Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain Tel: +34 93

5813284; Fax: +34 93 5814490

### Directora del estudio:

Cristina Lorca Oró, PhD

Tel.: +34 93 467 40 40 ext 1730

Fax: +34 93 581 44

Email: [cristina.lorca@irta.cat](mailto:cristina.lorca@irta.cat)

### Responsable Unidad de Alta Biocontención:

Xavier Abad Morejon De Giron, PhD

Tel.: +34 93 467 40 40 ext 1712

Fax: +34 93 581 44

Email: [xavier.abad@irta.cat](mailto:xavier.abad@irta.cat)

### Directora del centro:

Natàlia Majó, PhD

Tel: +34 93 467 40 40 Ext. 1716

Fax: +34 93 5814490

Email: [natalia.majo@irta.cat](mailto:natalia.majo@irta.cat)

Investigadores asociados:

Joaquim Segalés, PhD DVM Dipl ECPHM, Dipl ECVP

Júlia Vergara-Alert, PhD

Asistentes técnicos:

Mercedes Mora

Núria Roca

Localización estudio

Unidad Alta Biocontención IRTA-CReSA

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Centre de Recerca en Sanitat Animal

Campus Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain

**OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Evaluar la eficacia virucida de una cabina con ozono ECOZONO BRENTARENO frente a SARS-CoV-2 en tejido de algodón.

FECHAS DEL ESTUDIO

Fase experimental: Octubre 2020

Fase laboratorial: Noviembre 2020

DISEÑO DEL ESTUDIO

- Material a testar: Armario Ecozono Brentareno
- Condiciones del estudio:
  - Localización: box Unidad de Alta Biocontención
  - Humedad relativa:  $46,44 \pm 2,23\%$
  - Temperatura ambiental:  $20,98 \pm 0,18^\circ\text{C}$
  - Réplicas experimentales: el ensayo se realiza 2 veces (réplica 1 y 2), un único tiempo (ciclo de 40 minutos).

## MATERIAL

### Armario de Ecozono

El sistema de Ecozono utilizado consiste en un armario de autoservicio desinfectante de dimensiones 60,5x80x184 cm para prendas de ropa, calzado u otros materiales textiles. Su funcionamiento consta de tres fases, en la primera se genera ozono mediante unas lámparas de luz UV hasta alcanzar una concentración saturante dentro del armario. En la segunda fase circula el aire saturado de ozono a través de un ventilador que permite una distribución correcta y una acción sanitizante sobre los elementos presentes dentro del armario. En la tercera fase, el aire rico en ozono circula a través del neutralizador/catalizador para ayudar a su degradación.

### Virus

El virus utilizado fue el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo y grave, abreviado como SARS-CoV-2 (en inglés, severe acute respiratory syndrome coronavirus). La suspensión de virus SARS-CoV-2 clarificada pertenece a una cepa de un aislado local de secuencia conocida y publicada en GISAID (ID EPI\_ISL\_510689).

## METODOLOGÍA

### Preparación de muestras de tejido (algodón) inoculadas con SARS-CoV-2

La preparación de las muestras y la inoculación con SARS-CoV-2 se realizaron en cabina de bioseguridad. El personal utilizó en todo momento los equipos de protección individual (EPIs) correspondientes (Sundström, doble guante, mascarilla FFP3).

Las muestras consistieron en una porción de tejido de algodón de 1 cm<sup>2</sup> colocado en una placa estéril de plástico de 35 mm (SPL Ref. PLC20035). Para cada muestra, 100 µL de virus con un título original de aproximadamente 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL fue depositado en cada una de las muestras. Se permitió la absorción del virus en el tejido durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon un total de 26 placas (12 para cada replicado más 2 controles no expuestos a ozono que se dejaron el mismo tiempo del estudio en el laboratorio).

Cada una de las placas fue identificada con el número de muestra según la posición en el armario (1-12) y con el número de réplica/ciclo del estudio (1 ó 2).

## Ensayo virucida con armario de Ecozono BRENTARENO

El armario de Ecozono fue instalado previamente en un Box de la Unidad de Alta Biocontención del IRTA-CReSA.

Las placas conteniendo muestras de tejido inoculadas con SARS-CoV-2 fueron transportadas en un recipiente hermético hasta el box y fueron colocadas en sus posiciones correspondientes. Las piezas textiles de las posiciones superiores fueron dejadas en suspensión a 20 cm del techo del armario y a 1,5 m del suelo del armario (simulando una prenda de ropa colgada). Las posiciones medias fueron colocadas en las mismas placas en la rejilla propia del armario (a 75 cm de la superficie interior del armario). Las posiciones inferiores fueron colocadas en las placas sobre un soporte metálico (a 10 cm de la base interior del armario).

Una vez las placas fueron colocadas en cada posición, se cerró el armario y se puso en funcionamiento el ciclo strong de 40 minutos.

Transcurridos los 40 minutos, se procedió a retirar las muestras del armario y se transportaron de nuevo al laboratorio en contenedores herméticos. En cabina de bioseguridad se procedió a recuperar la posible infectividad residual en cada uno de los tejidos eluyendo con 1 mL de medio de cultivo celular (DMEM 1-2% SBF). El eluido fue depositado en tubos independientes que fueron congelados a -75°C para su posterior análisis.

El mismo procedimiento fue repetido para cada una de las réplicas.

## Titulación viral

El día previo a la titulación, se preparó el cultivo de células Vero E6 en placas de 96 pocillos. El día de la titulación, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente 1h aproximadamente antes de realizar el ensayo.

Se prepararon diluciones seriadas de las muestras en medio de cultivo celular y se inocularon 20 µL por pocillo. Se incubaron durante 1h a 37°C 5% CO<sub>2</sub> y posteriormente se añadieron 130 µL por pocillo de medio post-infección (DMEM 10% SBF). Se incubaron nuevamente a 37°C 5% CO<sub>2</sub> durante un máximo de 7 días.

Transcurridos 6-7 días se procedió a la lectura por efecto citopático.

## Análisis estadístico

Para comparar las réplicas entre los dos ciclos de 40 minutos y las réplicas internas de titulación se realizó una prueba t-student. Para la comparación de las tres alturas analizadas se realizó un test de normalidad (Shapiro-Wilk), posteriormente un ANOVA (Dunn's multiple comparisons test). El análisis estadístico se realizó con el Software Gaphpad Prism 9.

## RESULTADOS

### Resultados eficacia virucida

Los resultados de la titulación viral se muestran en la Tabla 1. La reducción viral obtenida respecto al control no expuesto a ozono ha resultado ser de un rango aproximado de 73 a  $\geq 97\%$ .

Las muestras superiores, colgadas y por lo tanto más expuestas al ozono, muestran más reducción que el resto de las muestras (a altura media e inferior, las cuales estaban en placa, y por tanto menos expuestas). El análisis estadístico muestra diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre la altura superior y la inferior, lo que podría demostrar que la inactivación se favorece por la altura y por la colocación de las muestras colgadas comparado con las muestras apoyadas en la placa, y por tanto ocultando una de sus superficies. La altura superior comparada con la altura media no mostró diferencias significativas ( $P=0.0603$ ), así como tampoco entre la altura media y la inferior ( $P=0.1330$ ). Estos resultados sugieren que las muestras en placa podrían representar a prendas de ropa dobladas, que podrían ser menos accesibles al tratamiento con ozono.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de Clearance respecto al virus original (muestra de virus sin contacto con tejido). La retitulación del inóculo inicial incluiría el efecto del tiempo transcurrido desde el inicio del experimento, lo que sería representativo del tiempo que podría pasar el virus en el ambiente antes o durante el contacto con un tejido en una situación real. Este tiempo sumado al efecto del ozono aumentaría el porcentaje de reducción viral a más de un 99%.



Tabla 1. Resultados del título viral recuperado de las diferentes posiciones testeadas en dos ciclos de 40 minutos (expresados en Media y desviación estándar de TCID<sub>50</sub>/mL, reducción logarítmica respecto al control no expuesto – LogR- y porcentaje de reducción).

Posición en el armario de Ecozono		Tiempo ozono	MEDIA ±DE	MEDIA ±DE	MEDIA % Reducción
			TCID <sub>50</sub> /mL	Log R	
Superior	izquierda puerta	40 min	1,01 ± 0,07	1,41 ± 0,08	<b>96,07</b>
	derecha puerta	40 min	0,88 ± 0,07	1,52 ± 0,07	<b>96,96</b>
	fondo izquierda	40 min	≤ 0,80	≥ 1,60	<b>≥ 97,49</b>
	fondo derecha	40 min	≤ 0,80	≥ 1,60	<b>≥ 97,49</b>
Media	izquierda puerta	40 min	1,68 ± 0,39	0,73 ± 0,45	<b>76,17</b>
	derecha puerta	40 min	1,40 ± 0,26	1,01 ± 0,30	<b>88,93</b>
	fondo izquierda	40 min	≤ 0,80	≥ 1,60	<b>≥ 97,49</b>
	fondo derecha	40 min	1,05	1,35 ± 0,32	<b>95,53</b>
Inferior	izquierda puerta	40 min	1,62 ± 0,16	0,79 ± 0,18	<b>82,91</b>
	derecha puerta	40 min	1,68 ± 0,45	0,73 ± 0,53	<b>73,69</b>
	fondo izquierda	40 min	1,68 ± 0,18	0,72 ± 0,62	<b>80,94</b>
	fondo derecha	40 min	1,56 ± 0,43	0,85 ± 0,53	<b>80,04</b>
Control no expuesto		40 min	2,40 ± 0,21	-	-

Tabla 2. Media de la reducción viral respecto al inóculo inicial (sin contacto con tejido) Clearance, teniendo en cuenta el efecto desecación del virus en el tiempo sumado al tratamiento con ozono.

Posición en el armario de Ecozono		Log R Inóculo inicial (4,5 TCID <sub>50</sub> /100µL)	MEDIA % Clearance (inóculo inicial)
Superior	izquierda puerta	3,49	99,97
	derecha puerta	3,62	99,98
	fondo izquierda	≥ 3,70	≥ 99,98
	fondo derecha	≥ 3,70	≥ 99,98
Media	izquierda puerta	2,82	99,85
	derecha puerta	3,10	99,92
	fondo izquierda	≥ 3,70	≥ 99,98
	fondo derecha	3,45	99,96
Inferior	izquierda puerta	2,88	99,87
	derecha puerta	2,82	99,85
	fondo izquierda	2,82	99,85
	fondo derecha	2,94	99,89
Control no expuesto		2,10	99,21

## CONCLUSIONES

El armario de Ecozono BRENTARENO es un eficaz, capaz de inactivar el SARS-CoV-2 hasta un  $\geq 97,49\%$  con un ciclo de 40 minutos. Teniendo en cuenta la inactivación natural del virus expuesto a condiciones ambientales de temperatura y humedad, el factor tiempo, junto con el efecto del ozono, permitiría alcanzar reducciones del  $\geq 99,98\%$ . Según los resultados obtenidos, las prendas colgadas serían más fácilmente inactivadas que las dobladas.