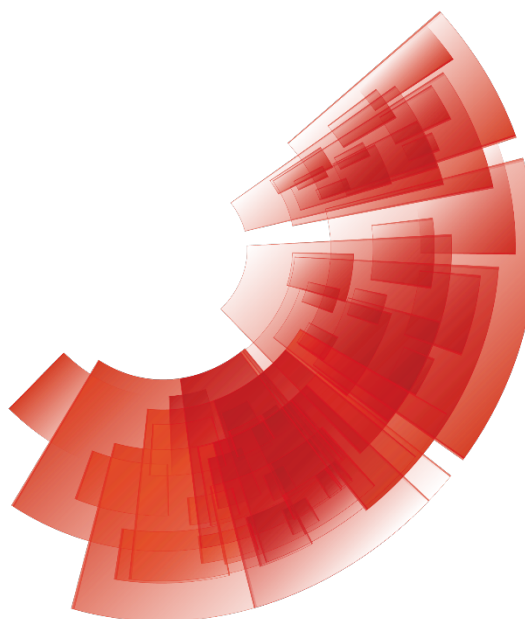


PORTIC
PORTO
RESEARCH,
TECHNOLOGY
& INNOVATION
CENTER



P.PORTO

RELATÓRIO

MEDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL EM SUPERFÍCIES NÃO POROSAS DE ACORDO COM A ISO 21702:2019 EM LAMINADOS SURFORMA

LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA MÉDICA E INDUSTRIAL

Laboratório registado na Entidade Reguladora da Saúde (ERS) com o número E150638 como Laboratório de Análises Clínicas e membro da Rede Nacional de Laboratórios COVID-19, reconhecido pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) desde 13 de Julho de 2020.

PORTO, JUNHO DE 2021

Determinação da Atividade Antivírica de Superfícies

Índice

Enquadramento	3
Objetivos.....	3
Finalidade	3
Materiais e biológicos	3
Métodos.....	4
Resultados.....	4
Discussão.....	8
Referências Bibliográficas	9

Determinação da Atividade Antivírica de Laminados SURFORMA

Enquadramento

A Organização Internacional de Padronização desenvolveu a norma ISO 21702:2019, "*Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces*" com o intuito de padronizar a medição da atividade antivírica superfícies tratadas plásticas e não porosas (1).

O Laboratório de Biotecnologia Médica & Industrial (**LaBMI**), é um laboratório integrado na Rede Nacional de Laboratórios COVID-19 reconhecido a 13 de Julho de 2020 pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA.) encontrando-se registado na Entidade Reguladora da Saúde (ERS) com o número E150638 como laboratório de Análises Clínicas.

Objetivos

Determinar a capacidade antivírica dos laminados antivirais SURFORMA.

Finalidade

Fornecer uma análise quantitativa da capacidade antivírica de diferentes laminados SURFORMA.

Materiais e biológicos

- MultiSkan Ascent, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA;
- Microscópio XL Core, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA;
- Incubadora PCHbi, MCO-170AIC-PA
- qTOWER³ touch, Analytik Jena GmbH, Alemanha;
- Lab-Aid 824 Nucleic Acid Extraction System, ZeeSan, China;

- MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio];
- LDH, Desidrogenase do lactato
- DMSO (dimetil sulfoxido);
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*);
- Mistura de antibióticos e antimicótico;
- MTV (meio de transporte universal de vírus);
- FBS (soro fetal de bovino);
- Meio SCDLP - *Soybean Casein Digest Broth with Lecithin Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate* (Meio de lavagem);

- Células CaCo2 - *Colorectal adenocarcinoma*;
- Isolado clínico de SARS-CoV-2.

Métodos

Aplicação da **ISO 21702:2019**, tendo em atenção as seguintes etapas:

- M1** Expansão do vírus e determinação do título;
- M2** Efeito citotóxico do meio de lavagem (SCDLP) nas células hospedeiras;
- M3** Sensibilidade do vírus ao meio de lavagem;
- M4** Análise cinética da atividade antivírica dos laminados antivirais SURFORMA (0 minutos, 10 minutos, 30 minutos e 4 horas);

Além da aplicação das medidas da referida ISO 21702:2019 foram realizadas ainda as seguintes análises:

- M5** Determinação da carga viral por PCR (polymerase chain reaction) quantitativa em tempo real (qRT-PCR) ao final de 0 minutos, 10 minutos, 30 minutos e 4 horas.

Resultados

M1 Expansão do vírus e determinação do título

O vírus SARS-CoV-2 foi expandido numa linha celular de CaCo-2. Brevemente, o vírus foi inoculado na linha celular em microplacas de fundo plano de 96 poços com uma densidade de 2×10^5 células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de FBS com antibióticos até atingir um estado de subconfluência. Nesta fase as CaCo-2 foram infetadas com estirpes clínicas de SARS-CoV-2 obtidas após filtração a 0,2 μ m do meio de transporte universal de vírus (MTV). A incubação foi realizada numa incubadora com 5% CO₂ a 37°C por um período entre 3 e 4 dias.

A determinação do título do SARS-CoV-2 foi determinado por PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR). O RNA foi extraído num sistema automático e posteriormente o SARS-CoV-2 foi quantificado por análise do gene da nucleocápside (gene N). Foram preparadas alíquotas de SARS-CoV-2 com uma quantidade de aproximadamente de 1×10^6 partículas/mL.

M2 Efeito citotóxico do meio de lavagem (SCDLP) nas células hospedeiras

Os laminados antivirais SURFORMA serão inoculados com vírus. A remoção do vírus da superfície será promovida com um agente que deverá não interferir com a atividade do vírus nem com a da célula hospedeira. Outra propriedade desta solução de lavagem deve ser a não interferência nos efeitos dos laminados antivirais SURFORMA sobre a viabilidade viral. De acordo com a norma, o primeiro meio a ser e que deve corresponder às expectativas mencionadas deve ser o Meio SCDLP.

Os nossos resultados indicam que este meio não interfere com as atividades celulares das células hospedeiras ao SARS-CoV-2 (células CaCo-2) quando tratados com SCDLP (Figura 1).

Efeito citotóxico do meio SCDLP sobre as células CaCo-2

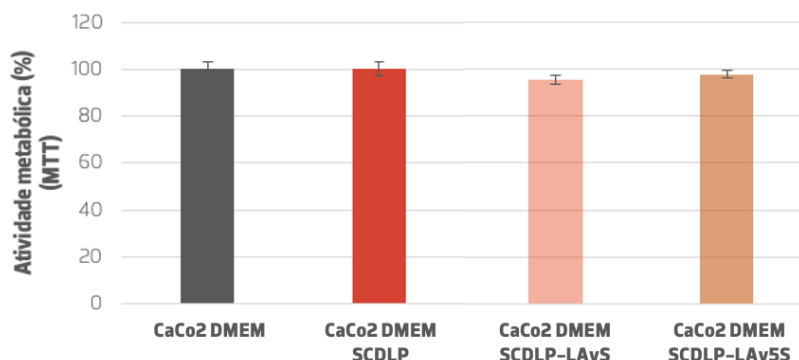


Figura 1: Efeito citotóxico do meio SCDLP em CaCo2. DMEM – meio de cultura das células. SCDLP – meio de remoção dos vírus dos laminados antivirais SURFORMA. LAvS – laminados antivirais SURFORMA. LAv5S – laminados antivirais SURFORMA envelhecidos 5 anos.

Na imagem anterior os tratamentos foram feitos durante 1 hora. Após esse período as células foram lavadas e incubadas com meio novo a 37°C durante 24 horas. A atividade celular foi medida mediante o teste de MTT. Os resultados foram expressos em percentagem +/- erro padrão relativamente às células cultivadas sem tratamentos.

Os tratamentos foram os seguintes:

- Células cultivadas em meio completo (CaCo2 DMEM);
- Células cultivadas em meio completo tratadas com meio SCDLP não exposto às superfícies (CaCo2 DMEM SCDLP);
- Células cultivadas em meio completo tratadas com meio SCDLP exposto ao laminado antiviral SURFORMA (CaCo2 DMEM SCDLP-LAvS);
- Células cultivadas em meio completo tratadas com meio SCDLP exposto ao laminado antiviral SURFORMA envelhecido 5 anos (CaCo2 DMEM SCDLP-LAv5S);

Explicação dos resultados

O meio SCDLP é um meio adequado à lavagem do vírus de superfícies antivirais como é o caso dos laminados SURFORMA. Estes resultados mostram que o meio não apresenta toxicidade às células humanas CaCo-2 e que os laminados SURFORMA tampouco apresentam toxicidade.

M3 Sensibilidade do vírus ao meio de lavagem

Finalmente, para validar o uso do SCDLP como meio de lavagem dos laminados antivirais SURFORMA ainda tem de ser avaliada a sua influência sobre a atividade viral. De acordo com a norma **ISO 21702:2019** tem de ser demonstrado que o SCDLP não pode influenciar a atividade do vírus. A Figura 2 mostra que o SCDLP é um meio neutro que não influencia negativamente a atividade viral.

Neste ensaio consegue-se prever ainda, que os laminados antivirais SURFORMA com e sem envelhecimento de 5 anos (LAvS e LAv5S) poderão ter alguma influência sobre a atividade viral. O método MTT avalia o metabolismo das células hospedeiras do vírus – uma medida de viabilidade.

Influência do meio de lavagem SCDLP sobre a atividade viral

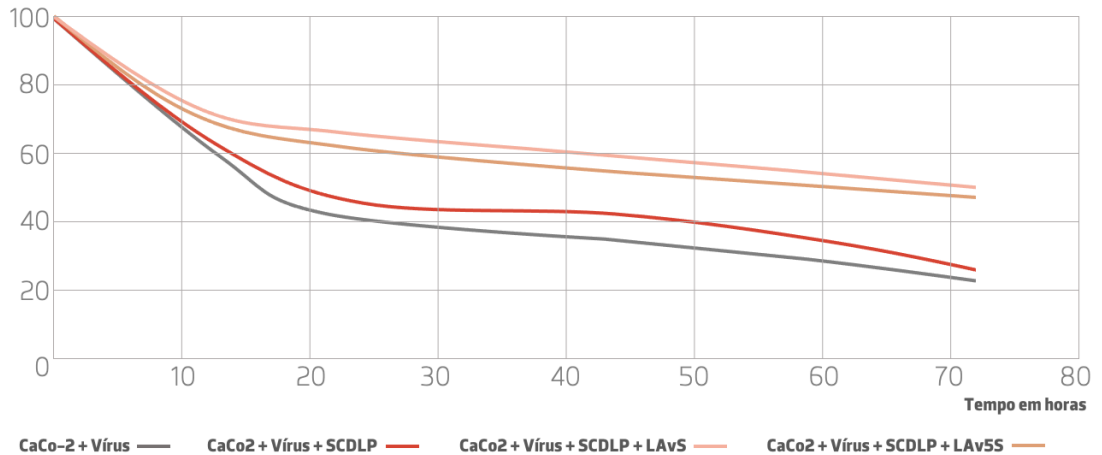


Figura 2: Influência do meio de lavagem (SCDLP) sobre a atividade viral
 SCDLP – meio de lavagem. SCDLP-LAVS – meio SCDLP previamente exposto aos laminados antivirais SURFORMA. SCDLP-LAV5S – meios SCDLP previamente exposto aos laminados antivirais SURFORMA após tratamento de envelhecimento equivalente a 5 anos.

No gráfico observa-se uma maior atividade metabólica (viabilidade) das células inoculadas com o vírus, nos ensaios em que se procedeu a uma lavagem prévia das superfícies.

Explicação dos resultados

O gráfico cinza mostra o padrão de decaimento da viabilidade das células (CaCo-2) infectadas pelo vírus SARS-CoV-2.

A viabilidade das células (CaCo-2) infectadas pelo SARS-CoV-2 aumenta na presença do meio de lavagem naquelas condições em que o meio foi exposto previamente aos laminados antivirais SURFORMA. Sendo que o meio de lavagem SCDLP por si só não influencia a atividade celular, a atividade antiviral só poderá estar a ser afetada pelos tratamentos dos laminados antivirais SURFORMA.

M4 Análise cinética da atividade antivírica dos laminados antivirais SURFORMA

Foram avaliadas 2 laminados SURFORMA: i) laminado antiviral SURFORMA (LAVS) e ii) laminado antiviral SURFORMA com tratamento de envelhecimento e equivalente a 5 anos (LAV5S). Em cada laminado foram inoculadas gotículas contendo aproximadamente 10^5 partículas virais em diferentes *end-points*: 0, 10, 30 e 240 minutos.

Posteriormente as superfícies foram lavadas com o SCDLP de forma a recolher o vírus. Esta solução foi filtrada num filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e usada para introduzir os vírus em culturas com uma densidade de 2×10^5 células/mL cultivadas em microplacas de 96 poços como descrito previamente. A incubação foi realizada numa incubadora com 5% CO_2 a 37°C por um período entre 3 e 4 dias ou até o atingimento de confluência. Passado este período a carga viral (número de partículas) foi determinada pela quantificação do gene N de SARS-CoV-2 por qRT-PCR (PCR quantitativo).

Na Tabela 1 pode-se observar a **taxa de inativação** viral das superfícies. Esta taxa foi calculada com base na variação da carga viral inoculada e a detetada por qRT-PCR após cada *end-point* (parâmetro ΔCt). Os *end-points* analisados num período experimental de 4 horas foram os 0, 10, 30 e 240 minutos.

Tabela 1: Taxa de inativação viral das superfícies

Tempo 0	10 min	30 min	240 min (4h)
---------	--------	--------	--------------

Laminado antiviral SURFORMA	44,8 % ± 17,5%	65,5 % ± 10,8%	84,0 % ± 4,1%	98,8 % ± 2,0%
Laminado antiviral SURFORMA envelhecido 5 anos	24,7 % ± 8,5%	57,4 % ± 9,8%	52,2 % ± 9,6%	98,3 % ± 1,7%

A superfície que apresentou **melhor taxa de inativação viral** para todos os *end-points* testados foi o laminado antiviral SURFORMA sem o envelhecimento a 5 anos.

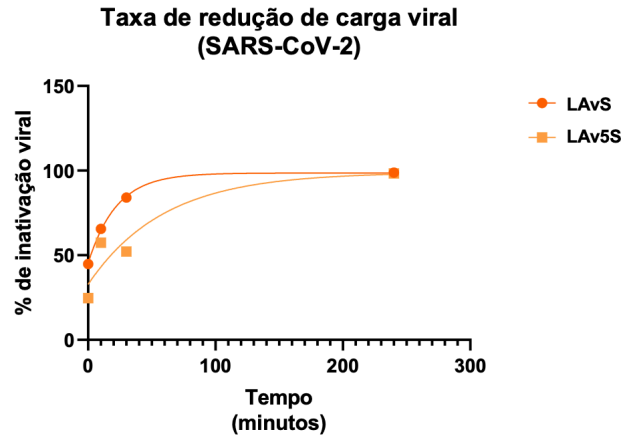


Figura 3: Curva de inativação do vírus inoculado nos laminados antivirais SURFORMA com e sem envelhecimento a 5 anos (LAVS e LAV5S), nos tempos 0 minutos, 10 minutos, 30 minutos e 240 minutos (4 horas).

Explicação dos resultados

O gráfico mostra que às 4 horas, ambos laminados SURFORMA conseguem uma inativação quase total das partículas virais (98 a 99%). No entanto, os laminados SURFORMA não envelhecidos são mais rapidamente eficazes como antivirais para o SARS-CoV-2.

M5 Análise cinética da carga viral dos laminados SURFORMA

Tendo em conta que a metodologia recomendada pela diversas entidades médicas como a Organização Mundial de Saúde para o **diagnóstico de SARS-CoV-2** é a metodologia conhecida como PCR quantitativa em tempo real ou qRT-PCR (3) foi ainda determinada o número de partículas virais (carga viral) detetadas por qRT-PCR após a inoculação de laminados antivirais SURFORMA com 5000 partículas virais viáveis.

Desta vez, foram utilizadas os laminados antivirais não envelhecidos, com dois tipos de acabamento: laminados antivirais SURFORMA texturados (LAVT) e com acabamento brilhante (LAVB).

Os laminados antivirais SURFORMA foram inoculados com 5000 partículas de SARS-CoV-2. Após um período de exposição foi medida a carga viral por qRT-PCR. O período de exposição dos laminados ao SARS-CoV-2 foi de 0 minutos, 10 minutos, 30 minutos e 240 minutos após essa inoculação. Os resultados foram expressos tendo como referência os laminados SURFORMA sem tratamento antiviral (Figura 4).

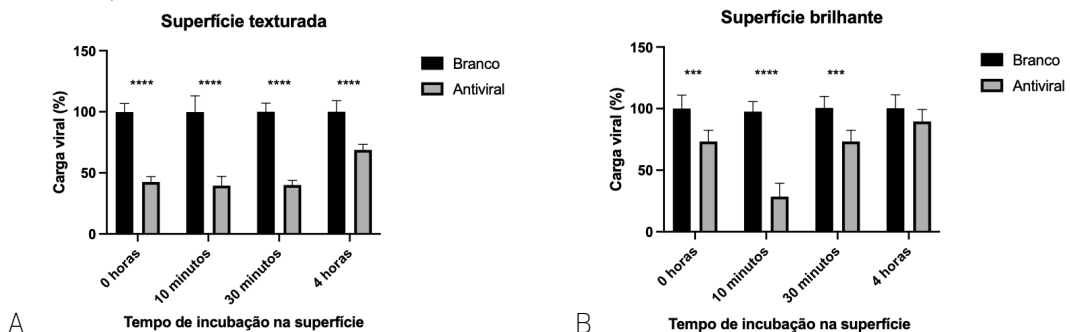


Figura 4: A – Efeito anti-SARS-CoV-2 dos **laminados texturados** antivirais SURFORMA. B – Efeito anti-SARS-CoV-2 dos **laminados brilhantes** antivirais SURFORMA.

Explicação dos resultados

O gráfico mostra que às 4 horas, ambos laminados SURFORMA conseguem uma inativação quase total das partículas virais (98 a 99%). No entanto, os laminados SURFORMA não envelhecidos são mais rapidamente eficazes como antivirais para o SARS-CoV-2.

Discussão

A sobrevivência de vírus respiratórios em superfícies é conhecida. Os vírus respiratórios podem atingir as superfícies veiculados em gotículas aquosas. Também é conhecido que quando a gotícula contendo os vírus respiratórios seca, os vírus são rapidamente inativados (2). A taxa de inativação depende de fatores como a estirpe viral, o tipo de superfície, o tamanho da gotícula, as condições ambientais e climáticas como a exposição solar, temperatura, humidade, se o ambiente é fechado ou aberto, periodicidade de higienização / desinfeção da superfície e ainda da sua porosidade / impermeabilidade (4).

Desta forma, procedeu-se à avaliação de 3 superfícies de acordo com os parâmetros metodológicos recomendados na norma ISO 21702:2019 (Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces) que foi escolhida por se adequar aos revestimentos destas superfícies uma vez que estas são materiais não porosos (Figura 5).



Figura 5: Superfícies analisadas inoculadas com gotículas carregadas com vírus (SARS-CoV-2).

No âmbito desta norma, **foram feitas adaptações** no sentido de adequar aos objetivos da aplicação da superfície. Os end-points avaliados, em vez de serem às 24 horas ou múltiplos, foram determinados num período **até 4 horas** no sentido de fazer uma **avaliação fina do processo de decaimento da atividade biológica do vírus**; outra adaptação prende-se com o método de determinação do título de partículas virais uma vez que esta foi realizada por **qRT-PCR** para o gene N do SARS-CoV-2 (considerado o gene **mais sensível** para efeitos de quantificação de carga viral).

Em suma, todas os **laminados antivirais SURFORMA** cumprem os critérios de **biossegurança/baixa toxicidade** (avaliada anteriormente no primeiro estudo). Além disso, os meios de lavagem propostos pela norma não interferem com a atividade celular (M2) ou com a atividade viral (M3). Neste contexto, as superfícies que apresentaram melhor taxa de inativação viral para todos os end-points testados (M4/M5) foram os laminados não envelhecidos com acabamento texturado. Na globalidade todos acabam por às 4 horas convergir para uma inativação quase total.

Referências Bibliográficas

1. ISO. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces. In: Norma ISO 21702. ISO; 2019. p. 20.
2. Marquès, Montse, and José L Domingo. "Contamination of inert surfaces by SARS-CoV-2: Persistence, stability and infectivity. A review." Environmental research vol. 193 (2021): 110559. doi:10.1016/j.envres.2020.110559
3. World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 12 February 2020 (No. WHO/WPE/GIH/2020.1). World Health Organization.
4. Chatterjee, Sanghamitro et al. "Why coronavirus survives longer on impermeable than porous surfaces." Physics of fluids vol. 33,2 (2021): 021701. doi:10.1063/5.0037924

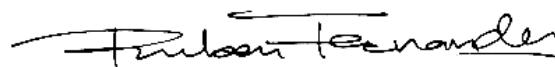
Autoria e equipa técnica

Pilar Baylina, PhD
Gestora de Projeto

Ruben Fernandes, PhD
Coordenação técnica

Técnicos LaBMI
André Sousa
Catarina Teixeira
Marlene Veiga
Sara Sá

Pelos autores,



Ruben Fernandes, PhD
Coordenador técnico
Agregado em Biomedicina
Professor Adjunto
Escola Superior de Saúde
Politécnico do Porto