

© Las versiones en español y portugués fueron producidas por APOYOnline - Asociación para la Preservación del Patrimonio de las Américas. Este documento, ofrecido como un servicio de información por APOYOnline, es una traducción no oficial de “Natural attenuation as a decontamination approach for SARS-CoV-2 on materials at various temperatures”, el original se encuentra en <https://www.oclc.org/content/dam/realm/documents/test-7-8-report.pdf>. Esta traducción se publica con el conocimiento y acuerdo de los términos especificados en la LICENCIA CC-BY-SA. Los errores y omisiones aquí contenidos son responsabilidad exclusiva del traductor.

Pruebas 7 y 8: Atenuación natural como un enfoque de descontaminación para el SARS-CoV-2 en materiales a varias temperaturas

En respuesta a la pandemia de la COVID-19, el Institute of Museum and Library Services (IMLS) y OCLC están trabajando en colaboración con Battelle para distribuir información basada en datos científicos diseñada para ayudar a reducir el riesgo de transmisión de la COVID-19 al personal y los visitantes involucrados en la entrega o el uso de los servicios de archivos, bibliotecas y museos. Como parte de esta investigación, el proyecto [REopening Archives, Libraries, and Museums \(REALM\)](#) está estudiando por cuánto tiempo el virus SARS-CoV-2 (el virus que causa el COVID-19) sobrevive en materiales comunes, así como métodos para mitigar la exposición. La información de los resultados de las pruebas del Proyecto REALM no deberían ser interpretados como recomendaciones o guías.

Estos hallazgos contribuyen al desarrollo de la comprensión científica del SARS-CoV-2, la cual aún incluye incertidumbres acerca de: cuánto virus es esparcido por una persona infectada cuando estornuda, tose, habla, respira, etc.; cuánto virus es requerido para infectar a alguien; y la probabilidad de que una persona se infecte de manera indirecta a través del contacto con objetos y superficies contaminados (“fómites”).

Battelle ha conducido ocho estudios de laboratorio para evaluar la atenuación natural (es decir, la inactivación) como un enfoque de descontaminación para materiales contaminados con SARS-CoV-2. Los resultados de las [Pruebas 1 a la 6](#) fueron puestos a la disposición del público entre el 22 de junio y el 19 de noviembre de 2020 respectivamente; las Pruebas 7 y 8 comenzaron simultáneamente el 5 de enero de 2021.

Las Pruebas 1 a la 6 midieron el tiempo de atenuación del virus SARS-CoV-2 virulento aplicado a materiales mantenidos a temperatura ambiente (68 a 75°F; 20 a 24°C) y en condiciones de humedad relativa (HR) de 30 al 50%. Para la Prueba 7, los materiales fueron mantenidos a temperaturas más frías (34 a 36°F; 1 a 4°C); para la Prueba 8, los materiales fueron mantenidos a temperaturas más calientes (83 a 84°F; 28 a 29°C). Para ambos ensayos, la humedad relativa fue mantenida igual que en las pruebas anteriores. Las pruebas estudiaron tres tipos de cubiertas de libro y de espuma de polietileno expandido; ver Tabla 1. Los ítems fueron provistos por la Columbus Metropolitan Library* y por la National Archives and Records Administration**. Las cubiertas de libro fueron evaluadas en una configuración apilada, y la espuma en una configuración no apilada. Los materiales de la Prueba 7 (temperaturas más frías) fueron examinadas los días 2, 6, 8, 9 y 10; los materiales de la Prueba 8 (temperaturas más calientes) fueron examinadas los días 2, 3, 4, 6 y 8.

Tabla 1. Materiales de las Pruebas 7 y 8

Item	Tipo de Material	Uso
Cubierta de libro de tapa dura*	Tela Buckram	Cubierta de tapa dura de libros
Cubierta de libro de tapa blanda *	Papel recubierto	Cubierta de tapa blanda comercial
Cubierta protectora de plástico*	Película de poliéster orientada biaxialmente	Capa protectora de libros de tapa dura
Espuma de polietileno expandido **	Espuma de polietileno de 1 pulgada	Almacenaje y envío

Los resultados muestran que las velocidades de atenuación para los materiales mantenidos a temperaturas más frías fueron significativamente más lentas comparadas con las temperaturas ambiente y más calientes. En el día 10, correspondiente al último intervalo de tiempo de la Prueba 7, la cantidad de virus activo presente permaneció casi sin cambio en comparación con las mediciones a T0 para todos los materiales con excepción de la cubierta de libro de tapa dura. En contraste, en la Prueba 8, el virus fue indetectable al día 6 en todos los materiales excepto en la cubierta protectora de plástico; esta fue una atenuación ligeramente más rápida que la ocurrida a temperatura ambiente. El virus fue indetectable en la cubierta protectora de plástico al día 8. Estos datos pueden sugerir que condiciones adicionales pudieran necesitar ser evaluadas considerando las cajas de recolección de libros localizadas en exteriores, o el almacenamiento bajo condiciones más frías. Para las instituciones que están empleando períodos de cuarentena, esta investigación puede impactar el momento para comenzar el “reloj” de la cuarentena una vez que el material es devuelto a un ambiente controlado. Los datos también sugieren que, cuando sea posible, el almacenaje en áreas más calientes puede ayudar a disminuir la longitud del período de cuarentena.

Nota: El cuero también ha sido seleccionado como un material de prueba para las Pruebas 7 y 8. Sin embargo, durante la preselección de las muestras (una cubierta de libro en cuero y dos tipos de cuero a granel) se observó citotoxicidad; esto es, muerte celular causada por un extracto químico del material (descrito abajo). El cuero fue removido de estas pruebas debido a que este material pudiera prevenir la determinación de la cantidad real de virus durante la prueba. El cuero fue previamente probado como parte de los estudios REALM ([Prueba 5](#)) sin observarse citotoxicidad. Esa muestra de cuero fue recolectada de un libro de la década de los 1860s, mientras que los cueros seleccionados para las Pruebas 7 y 8 eran más nuevos. Se sospecha que los procesos modernos de curtido de cuero o los colorantes usados en la manufactura de estos cueros nuevos pudieran haber causado el efecto citotóxico. Sin embargo, la causa exacta permanece sin determinar.

Métodos de la Prueba

Los ítems estudiados en las Pruebas 7 y 8 no fueron esterilizados antes de la prueba. Battelle propagó el aislado clínico del virus SARS-CoV-2 (cepa WA1/2020) en su laboratorio, seguido de su caracterización y prueba para establecer el título certificado del virus. Todos los ensayos fueron realizados dentro de un laboratorio de [nivel de bioseguridad](#) (BSL)-3. Una descripción más detallada de los métodos de la prueba ha sido publicada en la página del proyecto REALM¹.

Los cupones de ensayo (N=5) y el cupón control (N=1) con un tamaño de 1,9 cm × 7,6 cm, por intervalo de tiempo, fueron extraídos de cada uno de los cuatro materiales. El aislado de SARS-CoV-2 se aplicó en diez gotas de 10µl (100 µl en total) en cada uno de los cupones que luego se dejaron secar en condiciones ambientales de laboratorio, en una cabina de flujo laminar Clase II, como se observa en la Figura 1. Este método y el volumen de inóculo es

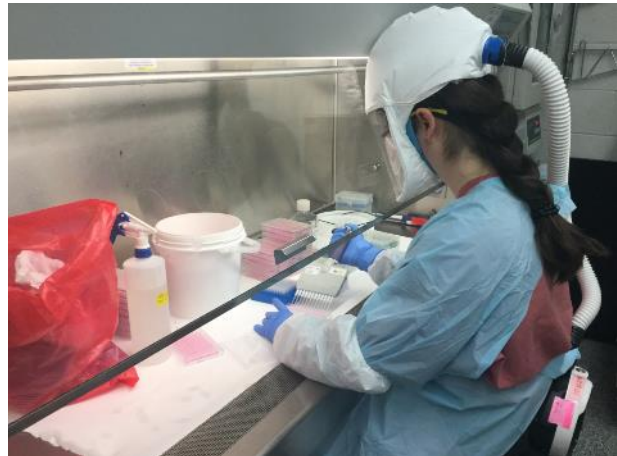


Figura 1. Inoculación de SARS-CoV-2 sobre los materiales de las Pruebas 7 y 8

consistente con métodos previos de pruebas de atenuación desarrollados por Battelle y permite un método controlado de secado para obtener un número de virus inicial consistente.² Una vez seco, un grupo de cupones fue recolectado y procesado (muestras T0; Tablas 2 y 3), los cupones remanentes se pusieron en contacto con superficies parecidas (configuración apilada) para imitar las condiciones de almacenamiento típicas para tres de los cuatro materiales (cubierta de libros de tapa dura, cubierta de libros de tapa blanda, y película protectora de plástico); la espuma de polietileno expandido no fue probada en configuración apilada. Los cupones de prueba (apilados o no apilados) fueron entonces ubicados encima de rejillas de acero inoxidable dentro de su respectiva cámara de ambiente controlado para las pruebas bajo las condiciones ambientales deseadas. Estas cámaras no tenían ventiladores cruzados ni luz transmisible; esto es, los cupones de prueba permanecieron en oscuridad durante su exposición. La temperatura promedio para la Prueba 7 fue de $36,3 \pm 2,40^{\circ}\text{F}$ ($2,4 \pm 1,36^{\circ}\text{C}$), con $34,5 \pm 3,58\%$ de HR; la temperatura para la Prueba 8 fue de $83,5 \pm 0,62^{\circ}\text{F}$ ($28,6 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$), con $32,6 \pm 0,48\%$ de HR. Estas cámaras no tenían ventiladores cruzados ni luz transmisible; esto es, los cupones de prueba permanecieron en la oscuridad durante su exposición.

En los intervalos de tiempo especificados, los cupones de prueba fueron removidos de las cámaras ambientales y puestos en tubos cónicos de 50-ml (Fisher Scientific Cat. No. 14-959-49A, Waltham, MA, USA), extraídos con 10-ml de medio de cultivo celular completo (Dulbecco's Modified Eagle

¹ Test Plan for the Natural Attenuation of SARS-CoV-2 as a Decontamination Approach, revisado el 29 de julio de 2020, publicado en <http://oclc.org/realms>

² Richter W, Sunderman M, Wendling M, Serra S, Mickelsen L, Rupert R, Wood J, Choi Y, Willenberg Z, Calfee M (2019). Evaluation of altered environmental conditions as a decontamination approach for non-spore-forming biological agents. *Applied Microbiology JAM-2019-0811*

Medium, Corning Cat. No. 10-010-CV, Corning, NY, USA) suplementado con 2% de suero bovino fetal (Gibco Cat. No. 10082147, Carlsbad, CA, USA) y penicilina-estreptomina (Gibco Cat. No. 15140122), y agitados en una plataforma de agitación a 200 rotaciones por minuto durante 15 minutos.

El límite de cuantificación (LOQ) de este ensayo es de 26,2 unidades de la mediana de la dosis infecciosa de cultivo tisular (TCID₅₀) (1,42 log₁₀) cuando no se observan efectos citotóxicos. Una vez por debajo de este umbral, el ensayo ya no puede asignar un resultado de valor cuantitativo; sin embargo, se puede observar una apreciación cualitativa de la presencia de infección mediante un examen microscópico manual.

Por lo tanto, a cualquier valor por debajo del LOQ, pero positivo para la presencia de virus, se le asigna un valor de 10 (indicando positivo) para permitir que se distinga de la presencia 0 (indicando negativo) de infección viral en las células Vero E6 hospedadoras. Se calcula un promedio para los valores asignados de los cinco cupones de prueba para cada material por cada intervalo de tiempo. Durante el proceso de extracción,



Figura 2. Procesamiento de extracción del material

mostrado en la Figura 2, existe la posibilidad potencial de que los productos químicos de los materiales de prueba o los adhesivos contenidos en estos materiales se filtren en el líquido extraído. Las células utilizadas para este ensayo de TCID₅₀ pueden morir por dos efectos principales: (1) *citotoxicidad*, que es la muerte celular causada por una sustancia química extraída del cupón de prueba, o (2) *efecto citopático* (CPE), que es la muerte celular causada por el virus infeccioso extraído del cupón de prueba.

Dado que se necesitan monocapas de cultivo celular para que el ensayo TCID₅₀ determine cuantitativamente el virus infeccioso, es importante que el extractante no tenga componentes distintos del SARS-CoV-2 que causarían efectos citopáticos, ya que esto resultaría en falsos positivos (es decir, muerte celular debida a la filtración de compuestos químicos del material de prueba y no debida a la infección del virus).

Para mitigar los efectos citotóxicos potenciales, los extractos fueron transferidos a un concentrador (Spin-X UF Concentrator, Corning Cat. No. CLS431491) y centrifugados hasta que el volumen inicial de ~10mL se concentre a ~0,5mL. Aproximadamente 10mL de cultivo celular completo fresco fueron añadidos a la muestra concentrada (es decir, al extracto) con el propósito de lavar y remover cualquier residuo químico (es decir, un intercambio de tampón). El concentrador fue centrifugado de nuevo hasta

obtener ~ 0,5mL. Se adicionó medio para equilibrar todos los extractos lavados hasta aproximadamente 2mL.

Las muestras de prueba de control negativo (es decir, los cupones de prueba no inoculados con SARS-CoV-2) se usaron para cada tipo de material y sirvieron como controles de CPE. Ninguno de los materiales usados para las Prueba 7 y 8 presentaron sustancias químicas permeadas que produjeran CPE en la monocapa de cultivo celular, con la notada excepción del cuero, el cual fue excluido de las pruebas durante la preselección.

Los extractos de la muestra de prueba se analizaron en células Vero E6 (ATCC CRL-1586, Manassas, VA, USA), y después de una incubación de 72-horas a 99°F (37°C) con 5% de CO₂, las placas del ensayo TCID₅₀ fueron evaluadas para la presencia de CPE. La matriz de prueba cubrió seis intervalos de tiempo para cada condición de las pruebas (T, o día): T0, T2, T6, T8, T9 y T10 para la condición de la prueba en frío (Prueba 7), y T0, T2, T3, T4, T6 y T8 para la condición de la prueba en caliente (Prueba 8). Como se muestra en las Tabla 2 y 3, en T0 (después de 1 hora de secado), se observó una reducción logarítmica (LR) de 1,1 a 1,5 en todos los materiales, lo que fue consistente con los valores LR previos reportados para estos tipos de materiales (Prueba 4). Dado que las Pruebas 7 y 8 fueron conducidas simultáneamente, los datos para T0 fueron llevados a cabo solamente con un grupo de materiales de prueba y los datos fueron compartidos en ambas pruebas.

Tabla 2. Valor de log₁₀ SARS-CoV-2 total recuperado a los días 0, 2, 6, 8, 9 y 10 de la Prueba 7 (temperatura fría).

Descripción	Inóculo ¹	T0 ²	Día 2	Día 6	Día 8	Día 9	Día 10
Cubierta de libro de tapa dura	4,71	3,48	3,65	3,22	3,75	< LOD	1,16
Cubierta de libro de tapa blanda	4,71	3,24	3,46	3,38	3,86	3,47	3,41
Cubierta protectora de plástico	4,71	3,64	3,80	3,66	3,22	3,44	3,13
Espuma	4,71	3,52	3,78	3,22	2,88	3,22	2,88

¹ Número total de virus aplicado a cada material
² Número total de virus recuperados después de un período de ~1hr de secado

Tabla 3. Valor de \log_{10} SARS-CoV-2 total recuperado a los días 0, 2, 3, 4, 6 y 8 de la Prueba 8 (temperatura caliente).

Descripción	Inóculo ¹	T0 ²	Día 2	Día 3	Día 4	Día 6	Día 8
Cubierta de libro de tapa dura	4,71	3,48	1,68	0,78	0,26	< LOD	< LOD
Cubierta de libro de tapa blanda	4,71	3,24	1,98	0,52	0,26	< LOD	< LOD
Cubierta protectora de plástico	4,71	3,64	2,09	1,30	0,52	0,78	< LOD
Espuma	4,71	3,52	1,75	0,26	0,52	< LOD	< LOD

¹ Número total de virus aplicado a cada material
² Número total de virus recuperados después de un período de ~1hr de secado

Las Figuras 3 a 6 muestran un resumen de los resultados de la atenuación por tipo de material. Datos seleccionados de la Prueba 4 fueron incluidos (línea punteada) en esta serie de datos como referencia a las curvas de atenuación previamente establecidas para las pruebas llevadas a cabo bajo condiciones de temperatura ambiente [71,6°F (22°C) y 40% de HR]. Como era de esperar, la velocidad de atenuación para los materiales en condiciones frías fue significativamente más lenta en comparación con las condiciones calientes, así como con los materiales bajo condiciones ambientales. La cubierta de libro de tapa dura fue el único material de prueba, en condiciones de ensayos fríos, que mostró una atenuación significativa, resultando en una reducción en virus viable al día 9 (<LOD) y manteniéndose por debajo del LOQ al día 10, manteniéndose positivos para virus viable dos de los cinco cupones de prueba.

En contraste, las pruebas bajo condiciones calientes resultaron en un incremento menos significativo en la velocidad de atenuación en comparación a las pruebas realizadas bajo condiciones ambientales. Vale la pena señalar que la diferencia en temperatura para condiciones frías y calientes en comparación a las pruebas ambientales fue de 35°F (20°C) y 12°F (7°C), respectivamente. De nuevo, la cubierta de libro de tapa dura produjo la diferencia más significativa en la velocidad de atenuación cuando se comparó con la condición ambiental y, aunque de manera sutil, a las temperaturas elevadas de prueba, todos los materiales resultaron en 0 de 5 cupones de prueba positivos para virus viable al día 6, con la excepción de la cubierta protectora de plástico. La cubierta protectora de plástico también resultó en 0 de 5 cupones de prueba positivos para virus viable, pero en el día 8. En el intervalo de tiempo final, esta es una mejora notable para todos los materiales de prueba (comparado al ambiente), y aunque de manera sutil, sugiere que este modesto aumento en temperatura 12°F (7°C) realmente mejora la velocidad de atenuación del SARS-CoV-2 en estos materiales.

Aunque se anticipa que las temperaturas extremas más elevadas resultarían en velocidades de atenuación más rápida, para los propósitos de generar datos útiles que pudieran implementarse fácilmente en la comunidad sin la necesidad de adquirir equipamiento adicional, estas temperaturas

elevadas fueron seleccionadas porque se cree que ellas pueden ser logradas fácilmente con el uso del equipamiento de ventilación y calentamiento existente sin la necesidad de modificarlo.³

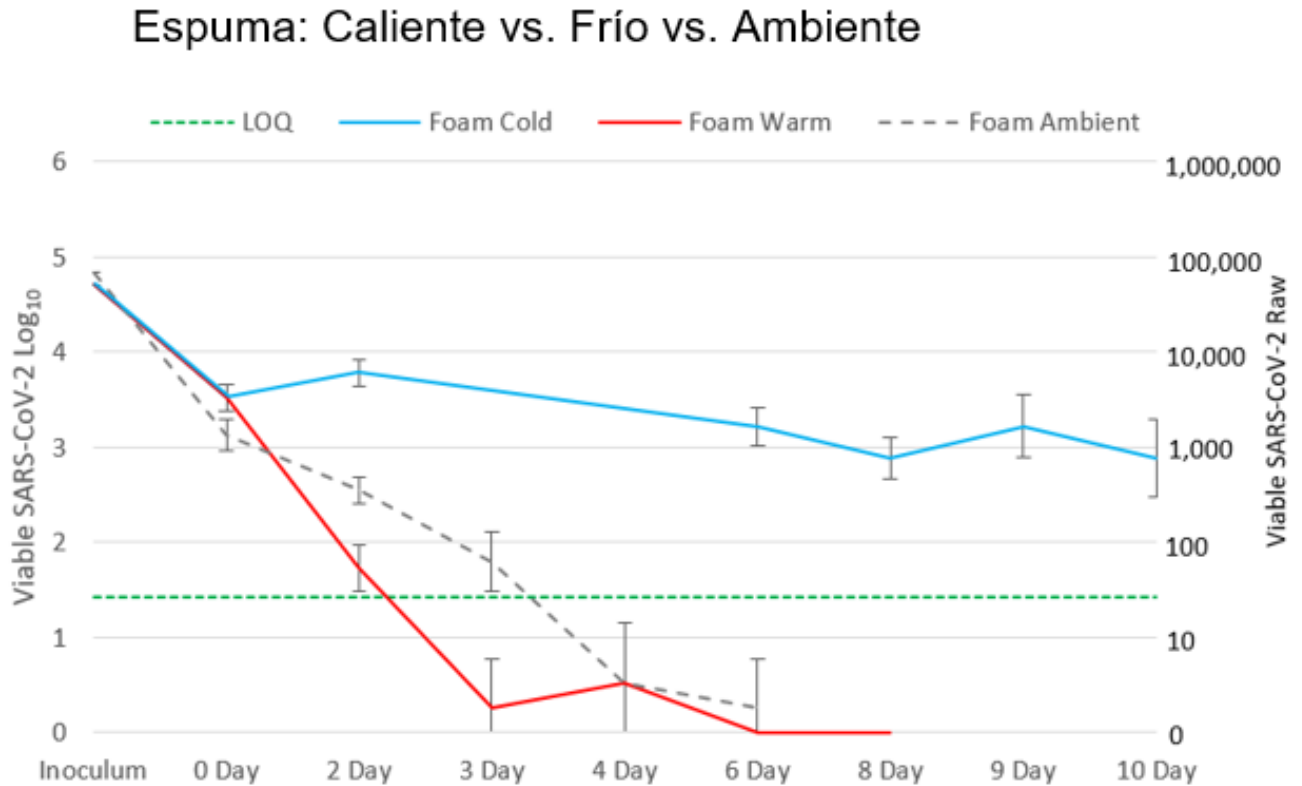


Figura 3. Atenuación de SARS-CoV-2 en espuma en condiciones caliente, fría y ambiente, con un intervalo de confianza de $\pm 95\%$ indicado por las barras verticales negras para cada fecha de prueba y cada ítem.

³ Riddell S, Goldie S, Hill A, Eagles D, Drew TW. The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Virology*. 2020 Oct 7;17(1):145. doi: 10.1186/s12985-020-01418-7. PMID: 33028356; PMCID: PMC7538848.

Tapa Dura: Caliente vs. Frío vs. Ambiente

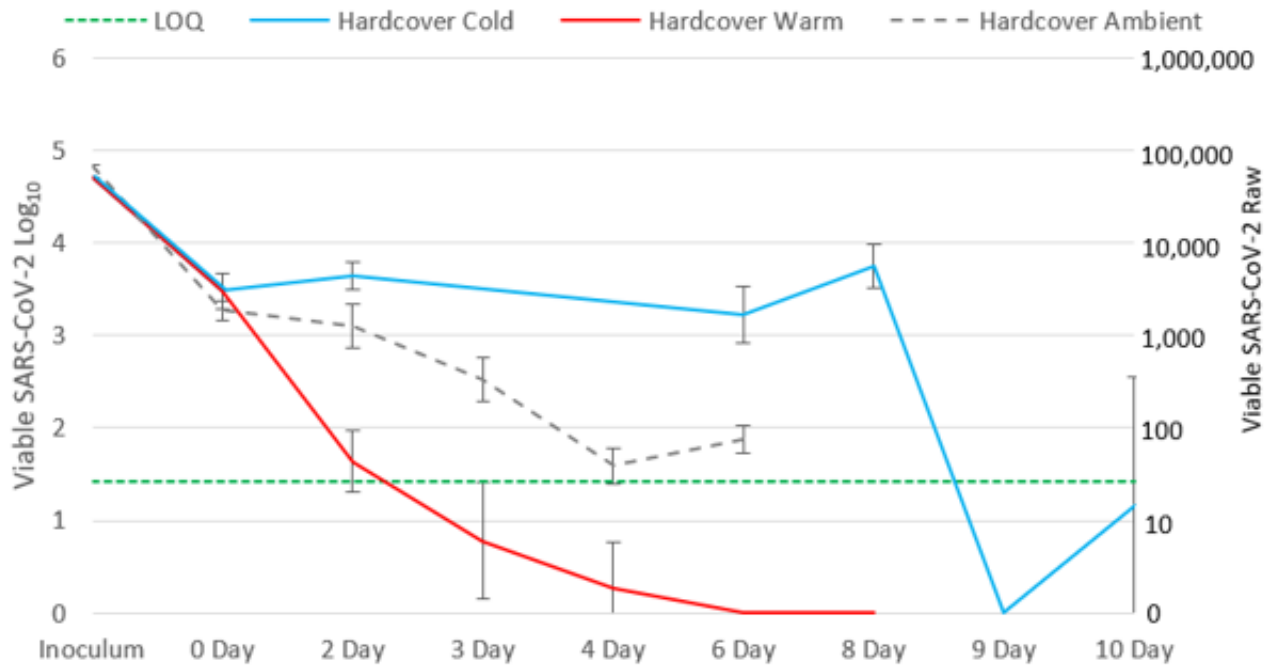


Figura 4. Atenuación de SARS-CoV-2 en cubierta de libro de tapa dura en condiciones caliente, fría y ambiente, con un intervalo de confianza de $\pm 95\%$ indicado por las barras verticales negras para cada fecha de prueba y cada ítem.

Tapa Blanda: Caliente vs. Frío vs. Ambiente

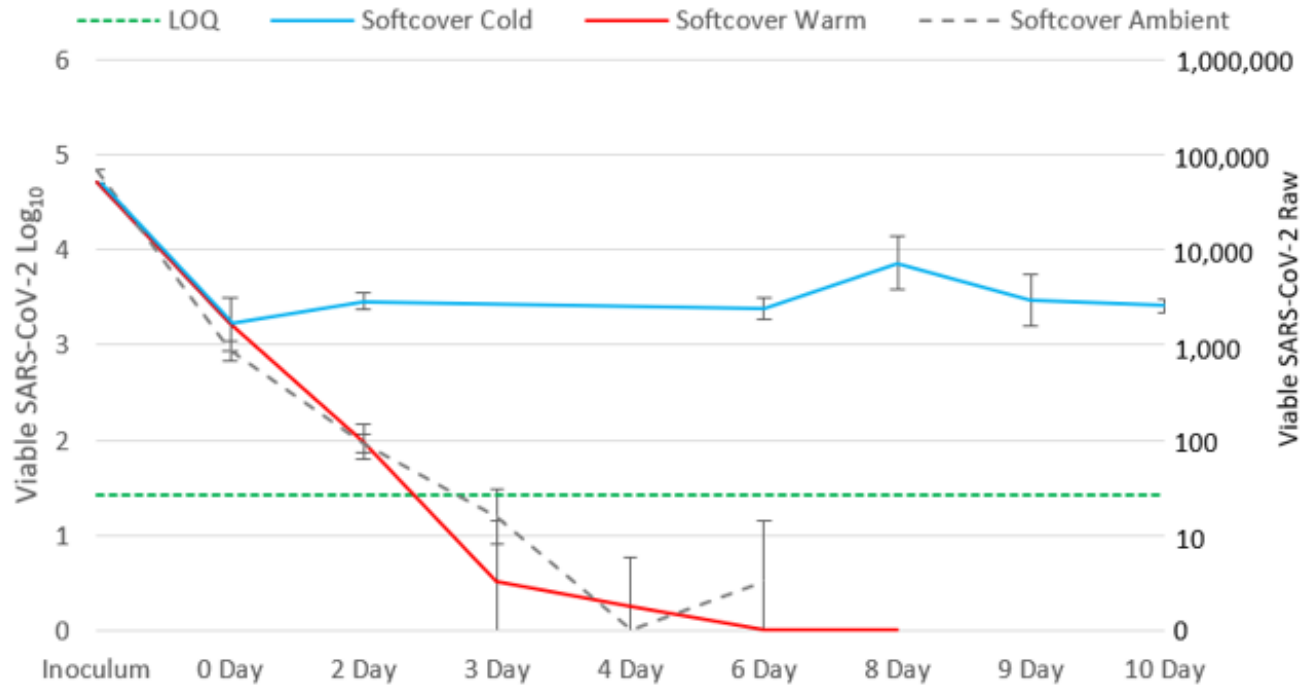


Figura 5. Atenuación de SARS-CoV-2 en cubierta de libro de tapa blanda en condiciones caliente, fría y ambiente, con un intervalo de confianza de $\pm 95\%$ indicado por las barras verticales negras para cada fecha de prueba y cada ítem.

Cubierta de Plástico: Caliente vs. Frío vs. Ambiente

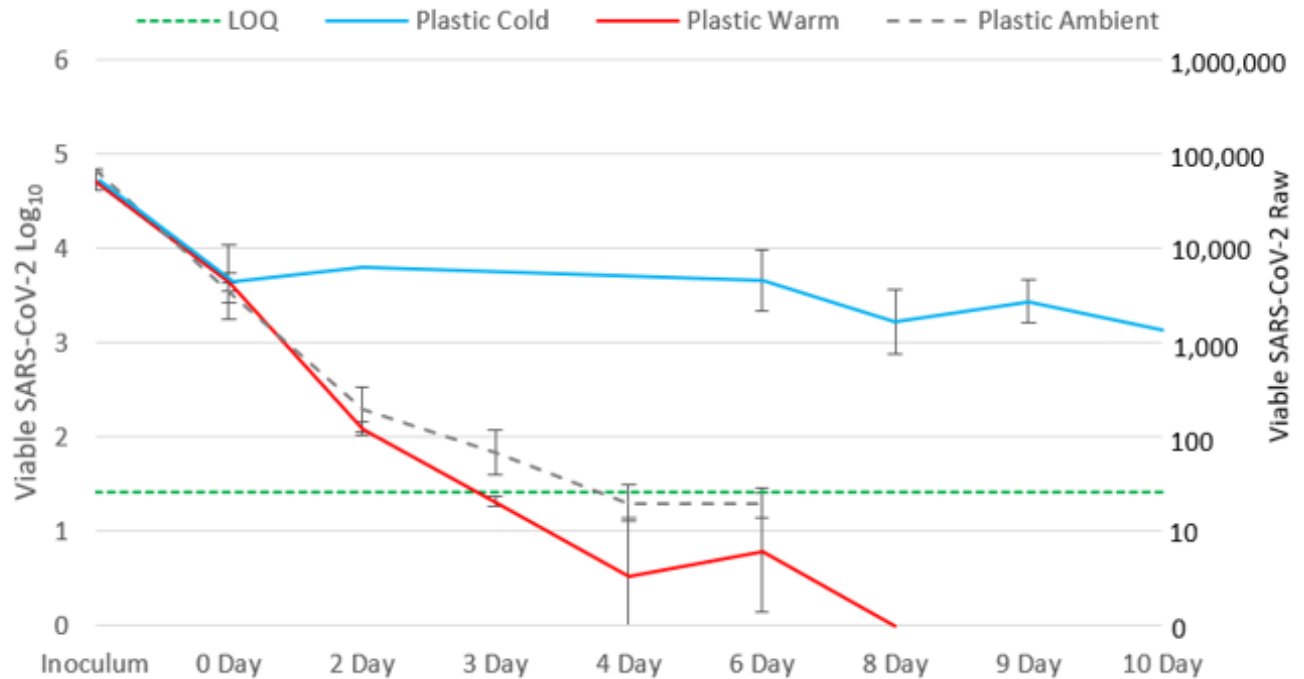


Figura 6. Atenuación de SARS-CoV-2 en cubierta protectora de plástico en condiciones caliente, fría y ambiente, con un intervalo de confianza de ± 95% indicado por las barras verticales negras para cada fecha de prueba y cada ítem.