



# Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral  
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3  
46117 Bétera (Valencia)  
Tel. 96 169 17 02  
Fax 96 169 16 37  
e-mail: [ivami@ivami.com](mailto:ivami@ivami.com)  
[www.ivami.com](http://www.ivami.com)  
CIF B-96337217

## Actividad antivírica en plásticos y otras superficies no porosas con el producto “Grafclean Ag+” frente a Coronavirus 229E (Norma ISO 21702: 2019 y norma NF EN 14476: 2013 + A2: 2019)

### Informe

Nº de registro: D/20/914.

1. **Identificación del laboratorio**..... Instituto Valenciano de Microbiología.
2. **Identificación del cliente** ..... IEDISA, S.A.  
**Dirección** ..... Pol. Industrial Poliviso, Calle Carpinteros,  
25, El Viso del Alcor - 41520.
3. **Identificación de la muestra** (información suministrada por el cliente)
  - Nombre del producto ..... Grafclean Ag+.
  - Número de lote... ..... 8321.
  - Fecha de caducidad ..... 36 meses como mínimo desde fabricación.
  - Fabricante / Proveedor ..... IDEISA, S.A.
  - Condiciones de conservación ..... Entre 5 -35°C.
  - Sustancia/s activa/s y su/s concentración/es (opcional)..... Ión plata al 0,27%.
  - Condiciones de uso..... Pintura decorativa de interior y exterior.
  - Tiempo/s de exposición solicitado/s ..... 24 horas.

El laboratorio no se hace responsable de la información aportada por el cliente.

### 4. Información de la recepción de la muestra

- Fecha de entrega del producto..... 21/05/2020.
- Fecha de solicitud con condiciones de prueba..... 02/06/2020.
- Aspecto del producto recibido..... Muestras control, no tratadas: Soporte de madera de 5cm x 5 cm  
Muestras de ensayo, tratadas: Soporte de madera de 5cm x 5 cm con tratamiento.



## 5. Método de ensayo

Procedimiento **DESIN-5510** (basado en norma ISO 21702: 2019 y norma NF EN 14476: 2013 + A2: 2019).

## 6. Condiciones experimentales

- Fecha de ensayos ..... 07/07/2020 a 27/07/2020.
- Temperatura de incubación .....  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Método de titulación ..... TCID<sub>50</sub> (Dosis infectiva 50% para cultivo celular).
- Método de detección de virus ..... Efecto citopático.
- Tiempo de contacto..... 24 horas.
- Temperatura de contacto .....  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Humedad relativa .....  $\geq 90\%$ .
- Procedimiento para detener acción del producto. Enfriamiento con hielo.
- Virus utilizados:
  - Coronavirus 229E (ATCC VR-740)
- Identificación del origen de las cepas virales y número de pases ..... Alícuota Coronavirus 229E (ATCC VR-740): 03/03/20 pase 2.
- Líneas celulares (nombre, origen, nº de pases)... MRC-5, ref: FTMR, alícuota de trabajo 6 pase 20 y alícuota de trabajo 7, pases 10 y 12.
- Descripción de la superficie de ensayo..... Piezas cuadradas de 50 mm y de grosor  $\leq 10$  mm.
- Descripción de la superficie de ensayo..... Piezas cuadradas de 50 mm y de grosor  $\leq 10$  mm.
- Descripción de la película de recubrimiento..... Piezas de plástico inertes cuadradas de 40 mm, no absorbentes de agua.

### Número de piezas empleadas

- Control de citotoxicidad del producto..... 3 piezas tratadas y 3 piezas control.
- Control de susceptibilidad celular al virus ..... 3 piezas tratadas y 3 piezas control.
- Control de la efectividad de inactivación del producto..... 3 piezas tratadas y 3 piezas control.
- Control de inoculación a tiempo "0"..... 3 muestras sin tratar por cada tiempo de contacto.



- Control de supervivencia viral tras el tiempo de ensayo (24 horas)..... 3 muestras sin tratar por cada tiempo de ensayo.
- Ensayo de eficacia antivírica..... 3 muestras tratadas por cada tiempo de ensayo.

## 7. Validación de las condiciones del ensayo

### Coronavirus 229E (ATCC VR-740)

- Título de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la inoculación (0 horas) - Pieza nº-1 .....  $\log_{10}^{-5,83}$
- Título de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la inoculación (0 horas) - Pieza nº-2.....  $\log_{10}^{-5,66}$
- Título de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la inoculación (0 horas) - Pieza nº-3.....  $\log_{10}^{-5,74}$

Título promedio de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la inoculación (0 horas).....  $\log_{10}^{-5,74}$

- Título de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la incubación (24 horas) - Pieza nº-1.....  $\log_{10}^{-5,41}$
- Título de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la incubación (24 horas) - Pieza nº-2.....  $\log_{10}^{-5,49}$
- Título de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la incubación (24 horas) - Pieza nº-3.....  $\log_{10}^{-5,33}$

Título promedio de la suspensión vírica para el virus control en una pieza sin tratamiento, tras la incubación (24 horas).....  $\log_{10}^{-5,41}$

### Prueba de referencia (formaldehído 0.7%)

Nivel de citotoxicidad del formaldehído al 0,7%.....  $\log_{10}^{-0,5}$

Cuantificación vírica en la prueba de referencia (formaldehído) tras 15 minutos y con Coronavirus 229E.....  $\log_{10}^{-2,49}$

### Intervalo de Confianza

- Título del virus con intervalo de confianza del 95% con Coronavirus 229E: (24 horas).....  $\log_{10}^{-5,41 \pm 0,39}$

Reducción con el intervalo de confianza del 95%..... Ver tabla 1, 3 y 5.



### Control de interferencia de la susceptibilidad celular:

- Título promedio de infectividad del virus para Coronavirus 229E con células tratadas con el control negativo, el virus diluido en medio de cultivo (Sn) .....log10<sup>-5,72</sup>
- Título promedio de infectividad del virus para Coronavirus 229E con células tratadas con el virus diluido en la solución de lavado recuperada de las muestras control, no tratadas (Su).....log10<sup>-5,52</sup>
- Título promedio de infectividad del virus para Coronavirus 229E con células tratadas con el virus diluido en la solución de lavado recuperada de las muestras de ensayo “GRAFCLEAN AG+” (St).....log10<sup>-5,22</sup>

**Nota:** La diferencia entre los logaritmos decimales entre Sn y Su, y entre Sn y St debe ser  $\leq 0,5$ .

### Control de la eficacia de supresión de la actividad del producto:

- Título promedio de infectividad del virus para Coronavirus 229E con células tratadas con el control negativo, el virus diluido en medio de cultivo e incubación durante 30 minutos en baño de hielo (Sn).....log10<sup>-5,71</sup>
- Título promedio de infectividad del virus para Coronavirus 229E con células tratadas con el virus diluido en la solución de lavado recuperada de las muestras control, no tratadas, e incubación durante 30 minutos en baño de hielo (Su).....log10<sup>-5,58</sup>
- Título promedio de infectividad del virus para Coronavirus 229E con células tratadas con el virus diluido en la solución de lavado recuperada de las muestras de ensayo “GRAFCLEAN AG+” e incubación durante 30 minutos en baño de hielo (St).....log10<sup>-5,36</sup>

**Nota:** La diferencia entre los logaritmos decimales entre Sn y Su, y entre Sn y St debe ser  $\leq 0,5$ .

## 8. Observaciones especiales

- Todos los controles y validaciones se encuentran dentro de los límites aceptados.
- La norma ISO 21702: 2019 describe el procedimiento de cálculo del valor de la actividad antiviral (R) indicando que puede usarse para caracterizar la efectividad de un agente antiviral en un material tratado, respecto a un material no tratado, pero no indica un criterio concreto para valorar la efectividad del producto tratado para asignarle una significación, dejándolo a criterio de las partes implicadas.



## 9. Resultados del ensayo

### 9.1.-Descripción

El producto “**Grafclean Ag+**”, lote 8321, después de 24 horas de incubación, presenta una actividad antiviral (R) frente a **Coronavirus 229E** de **3,50 ± 0,07**, para las 3 piezas ensayadas, cuando se compara con el virus obtenido de las piezas de control sin producto antiviral tras 24 horas de incubación ( $4,21 \pm 0,08$  TCID<sub>50</sub>/cm<sup>2</sup>) y se evalúa la actividad de acuerdo con el procedimiento DESIN-5510, basado en la norma ISO 21702: 2019 y la norma NF EN 14476: 2013 + A2: 2019.

### 9.2. Tablas de resultados y figuras

Ver tablas 1 y 2 y figura 1.

## 10. Conclusión

El producto “**Grafclean Ag+**”, lote 8321, frente a **Coronavirus 229E**, tras un tiempo de contacto de 24 horas, solicitado por el cliente, presenta una actividad antiviral (R) de **3,50 ± 0,07**, con un porcentaje de reducción del  $\geq 83,26\%$  con respecto a las piezas no tratadas, cuando se evalúa la actividad de acuerdo con el procedimiento DESIN-5510, basado en la norma **ISO 21702: 2019** y la norma **NF EN 14476: 2013 + A2: 2019**.

Nota 1: Los resultados obtenidos corresponden al producto recibido en este laboratorio.

Nota 2: La información que depende de la información recibida del cliente y no es facilitada por la misma, mostrada como "no proporcionada"

Bétera (Valencia) a, 29 de julio de 2020.

Fdo. Miguel Ángel Fernández  
Técnico responsable

Fdo. Encarnación Esteban  
Director técnico



### Referencias:

- ISO 21702: 2019. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces.
- NF EN 14476: 2013 + A2: 2019 Guideline. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements. (Phase 2/Step 1). AFNOR.

**Tabla 1.** Resultados de la actividad del producto “**Grafclean Ag+**”, lote 8321, con Coronavirus 229E (ATCC VR-740), durante 24 horas de contacto.

Producto	Soportes	Nivel de citotoxicidad	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub>				Reducción con el intervalo de confianza del 95% después de 24 horas
			0 min	5 min	15 min	24 horas	
Control de virus tras la inoculación	Pieza nº 1	NA	5,83	-	-	-	NA
	Pieza nº 2	NA	5,66	-	-	-	NA
	Pieza nº 3	NA	5,74	-	-	-	NA
Control de virus tras la incubación	Pieza nº 1	NA	-	-	-	5,41	NA
<b>Grafclean Ag+</b>	Pieza nº 1	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,91 \pm 0,39$
	Pieza nº 2	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,91 \pm 0,39$
	Pieza nº 3	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,91 \pm 0,39$
Control de virus tras la incubación	Pieza nº 2	NA	-	-	-	5,49	NA
<b>Grafclean Ag+</b>	Pieza nº 1	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,99 \pm 0,40$
	Pieza nº 2	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,99 \pm 0,40$
	Pieza nº 3	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,99 \pm 0,40$
Control de virus tras la incubación	Pieza nº 3	NA	-	-	-	5,33	NA
<b>Grafclean Ag+</b>	Pieza nº 1	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,83 \pm 0,41$
	Pieza nº 2	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,83 \pm 0,41$
	Pieza nº 3	0,5	-	-	-	0,50	$\geq 4,83 \pm 0,41$
Formaldehído	0,7% (p:v)	0,5	NR	3,16	2,49	NR	NA

Control de virus de formaldehído	0,7% (p:v)	NA	5,91	NR	5,74	NR	NA
U <sub>0</sub> =	4,54 ± 0,09 TCID <sub>50</sub> / cm <sup>2</sup>						
U <sub>t</sub> =	4,21 ± 0,08 TCID <sub>50</sub> / cm <sup>2</sup>						
A <sub>t</sub> =	0,70 ± 0,00 TCID <sub>50</sub> / cm <sup>2</sup>						
Actividad antiviral (R)	R= 3,50 ± 0,07						
Control de susceptibilidad celular (Sn-Su) .....log10 <sup>-0,19</sup>							
Control de susceptibilidad celular (Sn-St) .....log10 <sup>-0,50</sup>							
Control de eficacia de supresión de la actividad del producto (Sn-Su) .....log10 <sup>-0,13</sup>							
Control de eficacia de supresión de la actividad del producto (Sn-St) .....log10 <sup>-0,36</sup>							
<p>NA: no aplica; NR: no realizado</p> <p>PBS: tampón fosfato salino, SAB: seroalbúmina bovina</p> <p>U<sub>0</sub>: promedio del título de infectividad de las soluciones recuperadas de las 3 muestras de ensayo no tratadas inmediatamente después de la inoculación, en TCID<sub>50</sub>/ cm<sup>2</sup>.</p> <p>U<sub>t</sub>: promedio del título de infectividad de las soluciones recuperadas de las 3 muestras de ensayo no tratadas tras la incubación de las piezas 24h, en TCID<sub>50</sub>/ cm<sup>2</sup>.</p> <p>A<sub>t</sub>: promedio del título de infectividad de las soluciones recuperadas de las 3 muestras de ensayo tratadas tras la incubación de las piezas 24h, en TCID<sub>50</sub>/ cm<sup>2</sup>.</p> <p>R: Actividad antiviral (R= U<sub>t</sub> – A<sub>t</sub>).</p> <p>Los valores de U<sub>0</sub>, U<sub>t</sub>, A<sub>t</sub> y R se expresan como valor promedio con desviación estándar.</p> <p>Sn: Promedio del logaritmo del título de infectividad del virus en TCID<sub>50</sub> de las 3 réplicas del control negativo con medio de cultivo.</p> <p>Su: Promedio del logaritmo del título de infectividad del virus en TCID<sub>50</sub> de las 3 réplicas de la solución recuperada de tres muestras de ensayo no tratadas.</p> <p>St: Promedio del logaritmo del título de infectividad del virus en TCID<sub>50</sub> de las 3 réplicas de la solución recuperada de tres muestras de ensayo tratadas.</p>							

**Tabla 2.** Resultados de la actividad del producto “Grafclean Ag+”, lote 8321, con Coronavirus 229E (ATCC VR-740), durante 24 horas de contacto (prueba de titulación con 12 pocillos).

Producto	Réplicas	Tiempo de contacto	Diluciones (log10)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Grafclean Ag+ (piezas con antiviral)	pieza nº 1	24 horas	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
	pieza nº 2		0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
	pieza nº 3		0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Citotoxicidad	NA	NA	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Control de virus (piezas sin antiviral)	pieza nº 1	0 horas	4444	4444	4444	4444	4344	2203	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	0243	0020	1000	0000	
			4444	4444	4444	4444	0230	0202	0000	0000	
	pieza nº 2		4444	4444	4444	4444	3030	0022	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	2220	0020	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	3233	0102	0000	0000	
	pieza nº 3		4444	4444	4444	4444	3442	0020	0002	0000	
			4444	4444	4444	4444	0403	0302	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	2403	0220	0000	0000	
Control de virus (piezas sin antiviral)	pieza nº 1	24 horas	4444	4444	4444	4444	2030	0010	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	2220	0000	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	3023	1002	0000	0000	
	pieza nº 2		4444	4444	4444	4444	2220	0020	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	3020	0102	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	2023	1000	0000	0000	
	pieza nº 3		4444	4444	4444	4444	3023	0020	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	0300	2000	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	2030	1002	0000	0000	
Citotoxicidad Formaldehído	NA	NA	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldehído	NA	5 min	4444	4444	0202	0001	0000	0000	0000	0000	
			4444	4444	3022	0000	0000	0000	0000	NR	
			4444	4444	3000	0010	0000	0000	0000	NR	
	NA		15 min	4444	2033	0200	0000	0000	0000	0000	NR
				4444	0203	0110	0000	0000	0000	0000	NR
				4444	3203	2000	0000	0000	0000	0000	NR
Control de virus de formaldehído	NA	0 min		4444	4444	4444	4444	3320	2202	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3334	0010	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3233	2200	0000	0000
	NA		15 min	4444	4444	4444	4444	3223	0020	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2023	2210	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2230	0020	0000	0000
Control de la susceptibilidad: Sn	pieza nº 1	NA		CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	CCC0	0CC0	0000	0000
				CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	CCC0	C0C0	C000	0000
				CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	CC0C	00C0	C000	0000
	pieza nº 2		CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	C0CC	00C0	0000	0000	
			CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	CCC0	000C	0000	0000	
			CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	C0CC	0CCC	0000	0000	
	pieza nº 3		CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	0CC0	C0CC	0000	0000	
			CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	0C00	0000	0000	
			CCCC	CCCC	CCCC	CCCC	CCC0	C00C	0000	0000	

Control de la susceptibilidad: Su	pieza nº 1	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	C0C0 00C0 0C0C	000C 00C0 0CC0	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 2	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CC0C 0CCC 0CCC	00C0 000C 0C00	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 3	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	C00C CCCC C0CC	00C0 00C0 C0C0	0000 0000 0000	0000 0000 0000
Control de la susceptibilidad: St	pieza nº 1	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	C0C0 C0C0 C0C0	000C 00C0 0000	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 2	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CC0C 0C00 CC00	000C 00CC 0000	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 3	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	C0C0 0CC0 C0C0	0C0C 0000 C000	0000 0000 0000	0000 0000 0000
Control de la eficacia de supresión: Sn	pieza nº 1	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CC0C CC0C 0CCC	00C0 0C00 CCC0	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 2	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	0CCC CCC0 C0CC	00C0 00C0 00CC	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 3	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCC0 0CCC CC0C	00CC 0C00 00C0	0000 0000 0000	0000 0000 0000
Control de la eficacia de supresión: Su	pieza nº 1	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CC0C 0CCC 0C0C	0C0C 00C0 000C	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 2	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	C0CC CC0C CCC0	0000 C000 C0C0	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 3	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	C0C0 CCCC 0CCC	0C0C 000C C000	0000 0000 0000	0000 0000 0000
Control de la eficacia de supresión: St	pieza nº 1	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	0C0C 0CC0 C0CC	0C0C 000C 0000	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 2	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CC0C 0CC0 CCC0	00C0 C000 0000	0000 0000 0000	0000 0000 0000
	pieza nº 3	NA	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCCC CCCC CCCC	CCC0 C0C0 C0CC	000C 0000 CC00	0000 0000 0000	0000 0000 0000

a) 1 a 4, virus presente y grado de efecto citopático en 12 unidades de cultivo celular, o grado de lesión celular en prueba de citotoxicidad.

C = efecto citopático con presencia de virus (en este caso y según norma no se tiene en cuenta el grado de efecto citopático únicamente, la presencia o ausencia del mismo).

0 = virus no presente, o ausencia de lesión celular en prueba de citotoxicidad.

NA: no aplica; NR: no realizado; PBS: tampón fosfato salino; SAB: seroalbúmina bovina

\*: ver "Observaciones especiales" para entender el significado de estas concentraciones.

**Figura 1.** Resultados de la actividad del producto “Grafclean Ag+”, lote 8321, con Coronavirus 229E (ATCC VR-740), para los tiempos de contacto indicados:

Mire a ves si le gustan así las gráficas, me parece que queda bien poner el porcentaje de reducción, como lo ponían los del otro laboratorio / RN

