

**Título: ESTUDIO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA Y VIRUCIDA FRENTE A SARS-CoV-2 de un esterilizador de libros basado en Ultravioleta C.**

**1. Descripción de la máquina**

La máquina en la que se ha realizado el ensayo es de origen coreano y se utiliza para la desinfección de libros y documentos: Ultraviolet C Book Sterilizer SELF CLEAN. Consiste en un habitáculo en el que se encuentran las lámparas de Ultravioleta C germicidas y 12 soportes sobre los que colocar los libros y cuadernos por su parte central. Además, tiene un sistema de generación de viento desde la parte frontal inferior hacia atrás donde se localiza un filtro HEPA en el que quedan retenidas cualquier partícula de tamaño superior a 0,20  $\mu\text{m}$ , los virus quedan retenidos por este filtro.

Su uso es muy sencillo: se abre la puerta del habitáculo y los cuadernos se colocan en los soportes, se cierra la puerta, se regula el tiempo de esterilización y se pone en marcha.



Figura 1. Imagen del esterilizador de libros Ultraviolet C Ray Book sterilizer Self Clean en las instalaciones de AENER.

**2. Objetivo**

Comprobar la efectividad del esterilizador, bactericida y virucida, de libros SELF CLEAN basado en una combinación de aire y radiación ultravioleta C en tres periodos de esterilización, 30 segundos, 1 minuto y 2 minutos.

### 3. Materiales y metodología

#### 3.1 Materiales para ensayo bactericida

- Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* CECT110T: *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 Designación de cepa: NCIMB 8295. Datos Genéticos: secuencia de 16S rRNA: HE978271, Secuencia del genoma completo: GCA\_001042925.1

#### Condiciones de cultivo:

Medio de cultivo primario: Agar Nutritivo/ Agar II: extracto de ternera: 1g; Extracto de levadura: 2g, Peptona: 5 g; NaCl: 5g; Agar 15 g en 1 litro de agua destilada, pH 7,2.

Temperatura de cultivo: 36°C

Tiempo de Incubación: 24h

Necesidades atmosféricas: aerobiosis



Figura 2: *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110T en medio CFC Agar a las 24 h, cortesía de la Colección Española de Cultivos Tipo.

- Cultivador con agitación y control de temperatura
- Erlemeyers estériles
- Minibiorreactor Biosan
- Tubos Falcon con membrana para Minibiorreactor
- Criotubos de 1,5 ml estériles
- Pipeta de 1-40  $\mu$ L y puntas con filtro estériles
- Placas de contacto rodac para toma muestra de superficie con medio CN, selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*.
- Medio Cetrimida-Nalidíxico Agar: Peptona pancreática gelatina: 16,0g; Hidrolizado de caseína: 10,0 g; Cetrimida: 0,2 g; Mg Cl 1,4 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10,0 g; en 1 litro de agua destilada Agar 15,0 PH 7,1. Tras el autoclavado y enfriado añadir 0,015 g/L de Ácido Nalidíxico.
- Autoclave
- Espectrofotómetro Celin 1003.
- Microscopio óptico

- Baño de ultrasonidos
- Cámara Neu-Bauer para recuento de células.

### 3.2 Materiales para ensayo virucida frente a SARS-CoV-2

- Control positivo: ALL-WHO-CDC-Genes n CoV-Control-Plasmid PEX-A128-nCoV- all 1 µg Liofilizado.

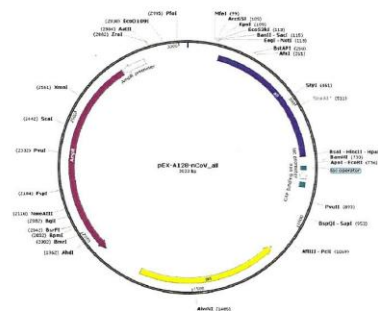


#### Quality Assurance Documentation

#### Corona COVID-19 positive control plasmid

Target Name:	All-WHO-CDC-Genes	Internal Name:	nCoV_all
Plasmid Name:	pEX-A128-nCoV_all	Gene Size:	583 bp
Vector Backbone:	pEX-A128	Antibiotic Selection:	Ampicillin
Cloning:	via Type IIS restriction enzymes	Quantity:	1µg lyophilized plasmid

#### Plasmid Map



5' Restriction Site: n/a  
 3' Restriction Site: n/a  
 Cloning: via Type IIS restriction enzymes  
 (Type IIS sites not present in final plasmid)

#### MCS of pEX-A128-nCoV\_all


```
GGAGCAGACAAGCCCTCAGGGCGGTCAGCGGTGTTGGCGGTGTCTCG
GGCTGGCTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGAAAGG
caat tggGTACCgagctcGGGCCGAAGC>ALLWHOCDGenes>ACC
TGCTTTGCTCGGTTGGATCCgaattcAAAGGTGAAATTGTTATCCGCT
CACAAATCCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCCTG
```


#### Please Note:

Verify sequence after each cloning step.

The plasmid DNA has been lyophilised. We recommend to dissolve it in water.

#### Eurofins Genomics

  
 Christian Barth  
 Technician QC, Gene Synthesis

  
 Controlled and Released

00-042QR\_A128 V1.1 / 20170502

Figura 3. Certificado del plásmido con todas las secuencias recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS -WHO) utilizado como control positivo.

- Kit de toma de muestras con Hisopo y tubo contenido 3 ml de solución preservante del ARN e inactivador del virus.

- Kit de Extracción de RNA: Viral RNA GSPin Kit (Genetic PCR Solutions)
- Kit de determinación y cuantificación del SARS-CoV-2: CoVID-19 dtec-RT-qPCR TestGenetic Detection of Severe acute respiratory síndrome coronavirus 2. (Genetic PCR Solutions). Kit Validado por el Instituto de Salud Carlos III (100% de sensibilidad y especificidad)
- StepOne Real-Time PCR System: Applied Biosystems
- Software StepOne Real-Time PCR System: Applied Biosystems
- Pipetas estériles de 100 µL y 20µL y puntas estériles con filtros
- Cabina con Ultravioleta C
- Tubos Microeppendorf 100 µL para PCR
- Tubos eppendorf de 1 mL
- Minicentrífuga
- Vortex

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Preparación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 110T

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* 110T, se descongela durante 30" a 36°C y se cultiva en Agar Nutritivo durante 24h para comprobar su viabilidad y especificidad (domingo 5 de julio).

Se toma una colonia y se cultiva en Caldo nutritivo a 37 °C 24h en cultivador con agitación a 120 rpm (lunes 6 de julio).

De aquí se toman 2 ml y se pasa a un Falcon con 10 ml de Caldo Nutritivo y se coloca en el Minibiorreactor Biosan para controlar su curva de crecimiento y realizar el recuento celular. Se cultiva a 36°C durante 24 h (martes 7 de julio) para obtener 10<sup>8</sup> UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias por mL). Al tiempo que vamos tomando datos de la densidad óptica y correlacionarla con la densidad óptica para la lectura de los resultados.

#### 3.3.2. Cuantificación de células

Para cuantificar el número de bacterias se llevó a cabo una recta de regresión entre la densidad óptica (eje de abscisas) y el número de bacterias UFC/mL en escala logarítmica (eje de ordenadas), para ello se realizaron diluciones seriadas partiendo de la solución de *Ps. aeruginosa* con 10<sup>8</sup> UFC/mL hasta 10<sup>1</sup> y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro.

Esto nos permite obtener una ecuación que se ajusta a una recta y facilitará el cálculo de las UFC/mL que obtengamos en los diversos controles y tratamientos.

En la siguiente figura se observan la tabla con las Absorbancias obtenidas (Densidad Óptica, D.O.) y las UFC/mL y la gráfica para su representación con la ecuación de regresión obtenida y el coeficiente de regresión R<sup>2</sup>. Para su representación los datos de UFC/mL se han transformado logarítmicamente.

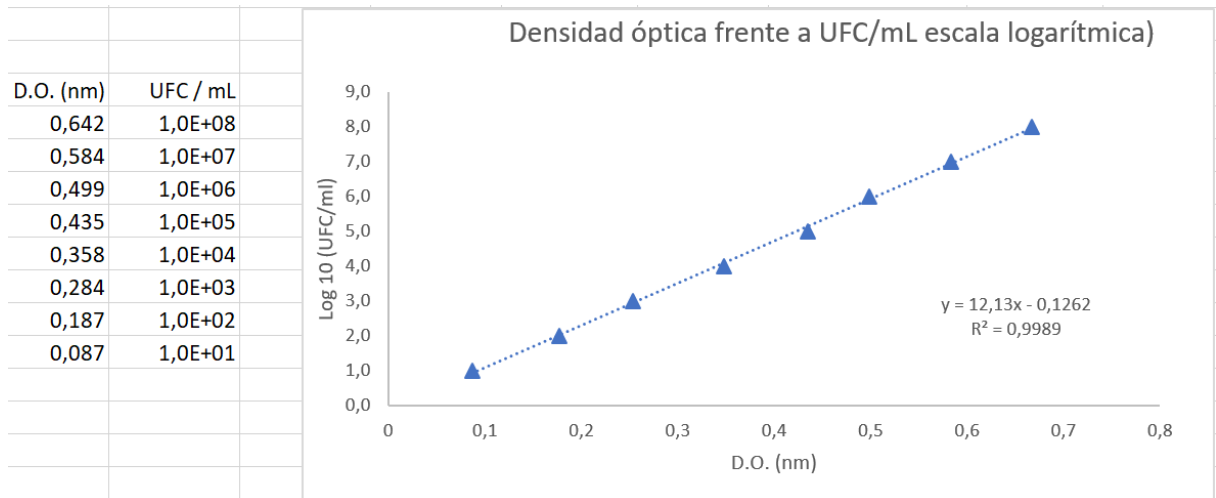


Figura 4. Ecuación para el cálculo de células de Ps. Aeruginosa.

### 3.3.3. Preparación y cuantificación del plásmido

El plásmido con las secuencias del SARS-CoV-2 viene liofilizado y para su uso hay que resuspenderlo con un 1 ml de agua ultrapura en el mismo vial.

Para su cuantificación, se utilizó el Kit comercial de GPS con el que se llevó a cabo la recta de calibrado con los patrones que vienen en el mismo kit, partiendo de una concentración inicial de  $10^6$  copias/mL y cuya ecuación de regresión se ve en la siguiente figura.

El plásmido resuspendido nos dio un CT de 10 que se corresponde con  $10^6$  copias/ mL

La ecuación obtenida nos permitirá cuantificar el número de copias de la secuencia del virus SARS-CoV-2 inserta en el plásmido control utilizado para la prueba y tras los tres tratamientos.

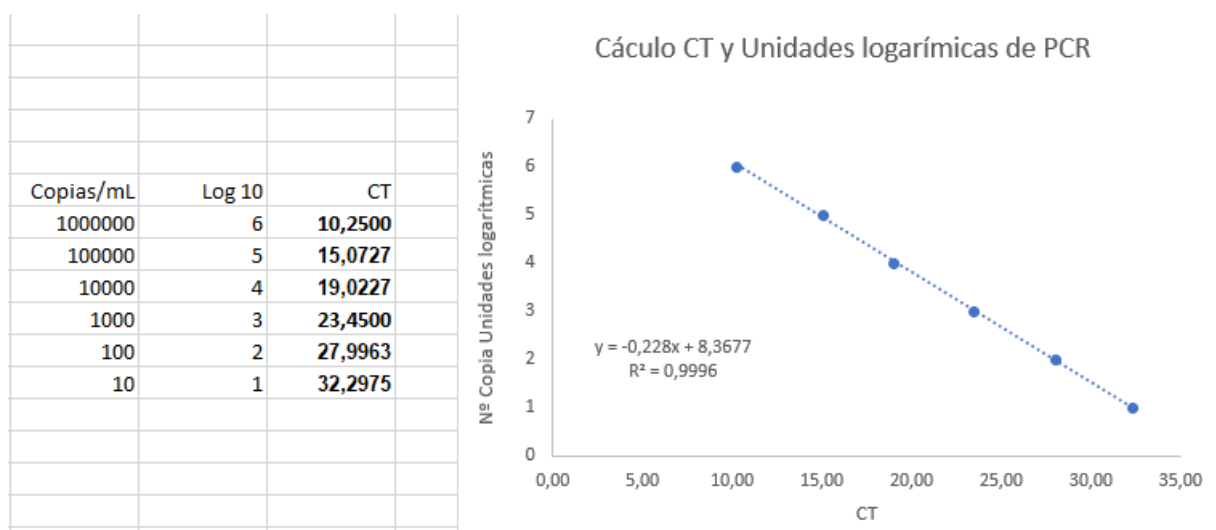


Figura 5. Correlación entre los CT obtenidos en RT-qPCR y el número de copias en unidades logarítmicas

### 3.3.4. Diseño experimental para la toma de muestras tras los tratamientos

Para la prueba se han utilizado cuatro cuadernos nuevos:

Cuaderno de controles: para realizar los controles positivos y negativos.

Resto de cuadernos para uno de los tratamientos: 30", 1' y 2'.



Figura 6. Cuadernos sobre los que se han realizado las pruebas. El cuaderno rosa corresponde a los controles positivos y negativos realizados en el laboratorio.

Se tomaron dos hojas de papel una en la primera mitad del cuaderno que se dedicaron a la bacteria y otra en la segunda mitad del cuaderno que se dedicó al virus. En cada una de ellas, se realizaron 5 círculos de 25 cm<sup>2</sup> y se numeraron para mantener una posición fija en cada repetición. Las posiciones 1, 2, 3, 4, y 5 son las etiquetas para controles positivos y para los tres tratamientos.

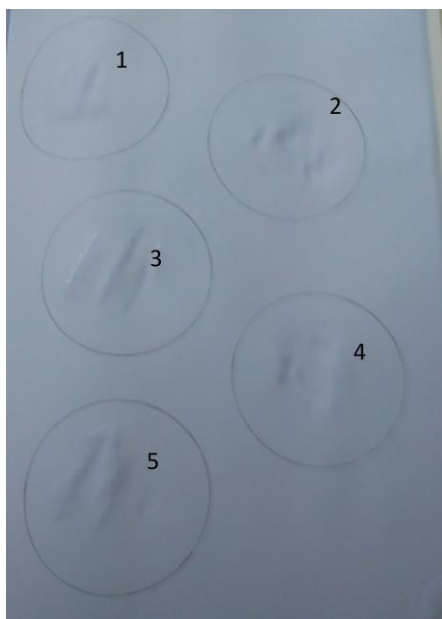


Figura 7. Disposición de los puntos para aplicar inóculos y tomar muestras.

#### 3.3.4.1 Controles negativos

Para el control negativo de la *Pseudomonas aeruginosa* se tomó una hoja sobre la que se aplicó una placa de superficie con medio CN y se puso a cultivar a 36°C durante 24 h.

También se tomó con torunda muestra de la superficie de papel y se insertó en el tubo con líquido inactivador del virus y preservante del RNA para el control negativo del virus.

#### 3.3.4.2. Controles positivos

Para el control positivo de la bacteria, en una hoja con 5 círculos se aplicó en cada uno de ellos 20 µL de inóculo bacteriano con  $10^8$  UFC/mL ( $2,0 \cdot 10^6$  UFC) se extendió por la superficie del círculo y se dejó empapar por el papel durante unos segundos. Tras esto se pasó a tomar muestra con las placas de contacto. En la siguiente imagen se ve la fluorescencia emitida por la bacteria bajo luz UV.

Se hizo una segunda repetición de inoculación y se volvió a tomar muestra, pero en este caso lo que hicimos fue realizar un recuento de bacterias adheridas a la placa para controlar la posible pérdida que hay al empaparse el inóculo en el papel. Tras recoger las bacterias, se posó la superficie de contacto en una placa Petri de 90 mm de diámetro conteniendo 10 ml de Caldo nutritivo, al igual que el inóculo inicial con el que realizamos la recta de calibrado, y se pusieron en el Baño de ultrasonidos durante 5 minutos. 2 ml del caldo con las bacterias en suspensión de los controles positivos se pasaron a una cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido de luz y se midió su densidad óptica a 660 nm.

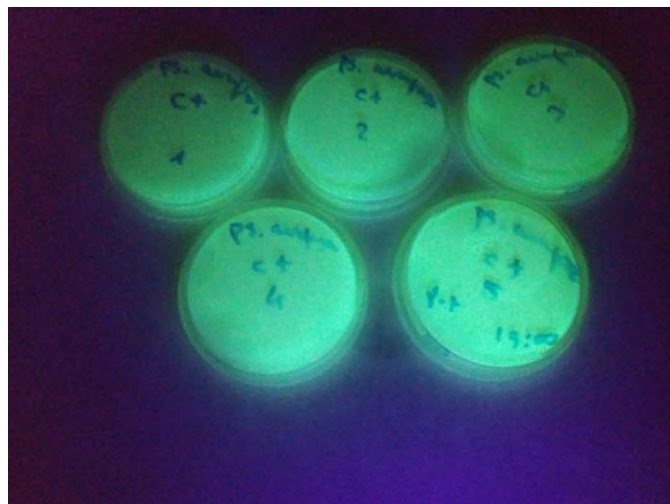


Figura 8. Controles positivos de *Pseudomonas aeruginosa* bajo luz UV. Esta bacteria emite fluorescencia bajo UV. Toda la superficie está cubierta de la bacteria.

Al igual que con la bacteria, de este inóculo se pusieron 20µL en cada uno de los círculos, se extendió con la punta de la pipeta y posteriormente se tomó la muestra con el hisopo y se puso en el tubo con el inactivador del virus y el preservador del RNA hasta la prueba PCR.

#### 3.3.4.3 Toma de muestras tras los tratamientos

En la empresa AENER al día siguiente se realizaron las mismas pruebas que con los controles positivos, en los otros tres cuadernos, el del tratamiento 1 (30"), tratamiento 2 (1') y tratamiento 3 (2'). Se realizaron los inóculos en una hoja de *Pseudomonas aeruginosa* y en otra hoja de la segunda mitad del cuaderno el plásmido viral, se dejaba empapar y posteriormente se introducía el cuaderno en esterilizador de libros 30", 1' y 2', respectivamente.

Tras cada tratamiento, se tomaba, por un lado, muestras de la bacteria mediante placa de contacto rodac con medio CN y, por otro, con hisopo las muestras del virus.

Las placas de contacto se transportaron en frío a 4°C hasta el laboratorio y los tubos con el hisopo con el plásmido en nevera sin refrigerar.

Para ver el rendimiento de eliminación de bacterias se ha colocado la placa con la superficie hacia abajo en otra de Petri con 20 mL de Caldo nutritivo en baño de ultrasonidos durante 5 minutos y agitado en vórtex 30 segundos para extraer el inóculo de cada uno de los tratamientos. El número de células bacterianas se obtuvo mediante la medida de la absorbancia 660 nm y la ecuación obtenida más arriba.

Para el virus se ha tomado como disminución el número de copias detectadas tras cada uno de los tratamientos respecto a los controles positivos sin tratamiento, medido por RT-qPCR.

#### 3.3.5. Cálculos

Ecuación para obtener el rendimiento de disminución de carga bacteria y viral.

Tasa de disminución de bacterias / virus (%)

$$R (\%) = [ (A - B) / A ] * 100$$

R: tasa de disminución

A: UFC/mL del control positivo o N° copias del control positivo

B: UFC/mL del tratamiento o N° copias del tratamiento



#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 Resultados con *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 1: Recuento de bacterias UFC/mL en cada una de las posiciones en las que se puso el inóculo.

	Control Positivo	Tratamiento 30"	Tratamiento 1'	Tratamiento 2"
Posición 1	1,7E+06	4,6E+04	2,2E+04	5,7E+02
Posición 2	1,3E+06	1,5E+04	3,1E+03	1,7E+02
Posición 3	1,8E+06	8,0E+04	2,3E+04	1,3E+03
Posición 4	1,1E+06	1,6E+04	2,1E+03	1,2E+02
Posición 5	8,1E+05	3,4E+04	4,0E+03	3,0E+02
<b>Media</b>	<b>1,3E+06</b>	<b>3,8E+04</b>	<b>1,1E+04</b>	<b>4,8E+02</b>

Tabla 2: Tasa de disminución en % de la carga bacteriana en cada una de las posiciones en las que colocó el inóculo del inóculo.

	Tratamiento 30"	Tratamiento 1'	Tratamiento 2"
Posición 1	97,269	98,714	99,966
Posición 2	98,882	99,759	99,987
Posición 3	95,486	98,714	99,929
Posición 4	98,480	99,802	99,989
Posición 5	95,849	99,502	99,963
<b>Media</b>	<b>97,132</b>	<b>99,192</b>	<b>99,964</b>

##### 4.2 Resultados con plásmido con secuencias del SARS-CoV-2

El CT del control negativo fue 38,91, inferior a 10 copias por mL.

Tabla 3: Número de copias de plásmido con SARS-CoV-2 en cada posición y tratamiento.

	Control Positivo	Tratamiento 30"	Tratamiento 1'	Tratamiento 2"
Posición 1	2,3E+04	5,7E+03	1,0E+03	1,3E+02
Posición 2	3,9E+04	4,5E+03	1,4E+03	8,9E+01
Posición 3	5,6E+04	3,2E+03	2,1E+03	3,0E+02
Posición 4	9,7E+04	2,2E+03	1,0E+03	1,2E+02
Posición 5	7,8E+04	6,0E+03	5,8E+02	1,8E+02
<b>Media</b>	<b>5,9E+04</b>	<b>4,3E+03</b>	<b>1,2E+03</b>	<b>1,6E+02</b>

Tabla 4: Tasa de disminución en % de la carga vírica en cada una de las posiciones en las que colocó el inóculo del inóculo.

	Tratamiento 30"	Tratamiento 1'	Tratamiento 2"
Posición 1	75,383	95,601	99,429
Posición 2	88,681	96,358	99,773
Posición 3	94,189	96,162	99,467
Posición 4	97,693	98,967	99,873
Posición 5	92,285	99,258	99,775
<b>Media</b>	<b>92,617</b>	<b>97,895</b>	<b>99,721</b>

## **5. Discusión y Conclusiones**

La pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) ha causado un gran desastre en todo el mundo, devastando las métricas de salud y económicas a nivel mundial. El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al SARS-CoV-2 como una emergencia de salud pública mundial [1]. COVID-19 se caracteriza por una alta morbilidad y baja mortalidad, por lo que representa una gran amenaza, particularmente para personas inmunocomprometidas, personas mayores e individuos con problemas de salud preexistentes. Los datos hasta ahora sugieren que el virus tiene una tasa de letalidad de alrededor del 1% [2]. Por lo tanto, es varias veces más grave que la gripe estacional típica, con una gravedad que se sitúa en algún lugar entre las pandemias de gripe de 1957 (0,6%) y 1918 (2%) [2], pero parece ser inferior al SARS (9,5%) y media Síndrome respiratorio del este (34,4%) [3]. Adicionalmente, la persona promedio infectada con COVID-19 propaga la enfermedad de manera eficiente a otras dos o tres: una tasa de aumento exponencial. También existe una fuerte evidencia de que el virus puede ser transmitido por individuos infectados que son asintomáticos o que experimentan síntomas leves [4].

Los métodos para esterilizar en Microbiología son muy variados desde el autoclavado a 121 °C 20' filtración por tamaños de poro inferiores a 0,20 mm o el uso de radiación ultravioleta C germicida. La esterilización es especialmente importante cuando hablamos de microorganismos patógenos para humanos, es decir, aquellos que se reproducen en nuestro organismo y nos causan enfermedades como ha ocurrido en los últimos meses con el SARS-CoV-2. El uso de Ultravioleta C en los laboratorios de Microbiología es muy habitual para trabajar en ambientes estériles para lo cual el tiempo que de erradicación oscila entre los 30 y 45 minutos, periodo de tiempo en el desaparece todo resto de vida bacteria, viral o material genético.

Esta pandemia ha condicionado nuestra vida de tal forma que en todos los ámbitos se buscan soluciones para que la actividad económica no tenga que parar, pero siempre garantizando las mejores condiciones laborales y de atención al público posibles.

La máquina en la que se han realizado los ensayos persigue ese fin, que se puedan esterilizar libros y documentos en un tiempo relativamente corto para que se puedan seguir utilizando por los diferentes usuarios y disminuir, así, el riesgo de transmisión del virus a través del contacto con el papel.

Como resultado del ensayo bactericida observamos que al aumentar el tiempo de exposición se reduce la carga bacteriana reduciéndose hasta 4 unidades logarítmicas de media, resultando una disminución de carga bacteriana del 99,96%. Si atendemos a la posición de las muestras, se ve que las posiciones 2 y 4 tienden a tener menor cantidad de UFC/mL que las 1, 3 y 5 debido a que las primeras se encuentran hacia el margen exterior derecho de la hoja, mientras que las otras tres se encuentran hacia el centro del cuaderno.

En cuando a la carga viral se observa el mismo patrón que para *Pseudomonas aeruginosa*, solo que en este caso la disminución son dos unidades logarítmicas del control positivo al tratamiento de dos minutos de duración, lo que supone una reducción media del 99,72%.

No obstante, hemos de tener en cuenta que estamos utilizando siempre cargas bacterianas y virales elevadas y que la reducción de 3 o 4 unidades logarítmicas, de por sí, nos dan reducciones importantes cuando hablamos porcentualmente. Sin embargo, es importante conocer si esa carga que todavía queda remanente en el papel significa una dosis transmisible y esto va a depender del microorganismo o virus del que se trate.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* que resulta un patógeno ubiquista, la dosis infectiva mínima en la actualidad aún se desconoce [5], por tanto, no podemos afirmar que las dosis remanentes que quedan en el papel sean o no infectivas.

Y en el caso del SARS-CoV-2 tampoco hay evidencias sobre la dosis mínima infectiva, parece que con varios centenares de copias ya es infectivo, sin embargo, para su transmisibilidad parece que se necesitan más copias por encima de  $10^5$  [6]. Así, al menos el tratamiento que dura 2 minutos sí disminuiría la transmisibilidad del virus.

Como conclusión del ensayo el sistema utilizado disminuye el riesgo de propagación tanto de la bacteria ensayada como del virus en más de un 99%, especialmente cuando la duración del tratamiento es mayor.

Por otro lado, la máquina con la que se ha trabajado tiene la ventaja de combinar dos sistemas de desinfección, por un lado la radiación ultravioleta C germicida y, por otro lado una corriente aire que arrastra partículas hacia un filtro HEPA que evita la propagación de virus y bacterias fuera del habitáculo de la máquina. Esto significa que esta máquina necesita un mantenimiento para conseguir resultados más óptimos, como son el cambio de filtros cuando sea preciso y de las lámparas UV-C en función de las horas de uso para mantener la eficacia del sistema de desinfección.

lunes, 13 de julio de 2020

Directora Técnica e I+D+i

Dra. M<sup>a</sup> Angélica García Álvaro



Clean-Biotec  
Biotecnología Ambiental  
C.I.F.B-26340950

## ANEXOS



*Unidad de Virus Respiratorios y Gripe  
Laboratorio de Referencia e Investigación en Virus Respiratorios  
Centro Nacional de Microbiología*

### **INFORME DE VALIDACIÓN DEL SISTEMA COMERCIAL CoVID-19 dtec-RT-qPCR Test F100 format DE LA EMPRESA GENETIC PCR SOLUTIONS PARA LA DETECCIÓN DEL NUEVO CORONAVIRUS SARS-CoV2 EN MUESTRAS RESPIRATORIAS**

**Responsable del informe:** Jesús Oteo Iglesias. Director del Centro Nacional de Microbiología.  
Instituto de Salud Carlos III.

**Fecha del informe:** 10 de marzo de 2020

#### **Objetivo.**

Validación de un sistema comercial de la empresa GENETIC PCR SOLUTIONS (GENETIC ANALYSIS STRATEGIES S.L.) para la detección del coronavirus SARS-CoV2 en muestras respiratorias. El sistema es el COVID-19 dtec-RT-qPCR Test, en su formato de 100 reacciones, que consiste en una PCR en tiempo real para la amplificación de un solo gen de SARS-CoV2, no incluye análisis de un gen alternativo.

#### **Metodología.**

El sistema COVID-19 dtec-RT-qPCR Test se ha probado con un panel de 80 muestras respiratorias (exudados nasofaríngeos) anonimizadas del biobanco del Centro Nacional de Microbiología (CNM). Este panel incluye 41 muestras positivas y 39 muestras negativas previamente caracterizadas según metodología recomendada por la OMS y optimizada en el CNM, mediante dos PCRs en tiempo real según procedimientos de referencia en cuanto a su extracción y amplificación (1).

#### **Resultados.**

Los resultados obtenidos mediante el sistema COVID-19 dtec-RT-qPCR Test (Tabla 1) muestran un total de 41 muestras positivas y 39 negativas, con un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad.

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos para el sistema analizado en cada una de las muestras probadas y en comparación con los resultados de referencia.

#### **Conclusiones**

En este estudio, el sistema probado ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 100% en la detección de material genético de SARS-CoV2 en muestras respiratorias.

#### **Referencias**

1. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by realtime RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3). PMID: 31992387.

Valores de densidad óptica obtenidos y el cálculo en UFC/mL

	C +	UFC/mL Log 10	UFC/mL
P1	0,524	6,2	1,7E+06
P2	0,515	6,1	1,3E+06
P3	0,526	6,2	1,8E+06
P4	0,508	6,0	1,1E+06
P5	0,498	5,9	8,1E+05

	t= 30"	UFC/mL Log 10	UFC/mL
P1	0,395	4,7	4,6E+04
P2	0,354	4,2	1,5E+04
P3	0,415	4,9	8,0E+04
P4	0,358	4,2	1,6E+04
P5	0,384	4,5	3,4E+04

	t=1'	UFC/mL Log 10	UFC/mL
P1	0,368	4,3	2,2E+04
P2	0,299	3,5	3,1E+03
P3	0,370	4,4	2,3E+04
P4	0,285	3,3	2,1E+03
P5	0,308	3,6	4,0E+03

	t=2'	UFC/mL Log 10	UFC/mL
P1	0,238	2,8	5,7E+02
P2	0,194	2,2	1,7E+02
P3	0,266	3,1	1,3E+03
P4	0,183	2,1	1,2E+02
P5	0,215	2,5	3,0E+02

Valores Ct obtenidos de la RT-qPCR

Control negativo: CT = 39,91 <10 copias/mL

	Controles +	Ulog	copias/mL
P1	17,56	4,36402	2,3E+04
P2	16,54	4,59658	3,9E+04
P3	15,88	4,74706	5,6E+04
P4	14,83	4,98646	9,7E+04
P5	15,24	4,89298	7,8E+04

	t= 30"	Ulog	copias/mL
P1	20,23	3,75526	5,7E+03
P2	20,69	3,65038	4,5E+03
P3	21,3	3,5113	3,2E+03
P4	22,01	3,34942	2,2E+03
P5	20,12	3,78034	6,0E+03

	t= 1'	Ulog	copias/mL
P1	23,51	3,00742	1,0E+03
P2	22,85	3,1579	1,4E+03
P3	22,09	3,33118	2,1E+03
P4	23,54	3,00058	1,0E+03
P5	24,58	2,76346	5,8E+02

	t= 2'	Ulog	copias/mL
P1	27,4	2,1205	1,3E+02
P2	28,14	1,95178	8,9E+01
P3	25,85	2,4739	3,0E+02
P4	27,54	2,08858	1,2E+02
P5	26,85	2,2459	1,8E+02

## BIBLIOGRAFÍA

1. Novel Coronavirus (2019-nCoV ) Situation Report 48. [(accessed on 13 March 2020)]; Available online: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200308-sitrep-48-covid-19.pdf?sfvrsn=16f7ccef\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200308-sitrep-48-covid-19.pdf?sfvrsn=16f7ccef_4).
2. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., Zimmer T., Thiel V., Janke C., Guggemos W., et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. N. Engl. J. Med. 2020; 382:970–971. doi: 10.1056/NEJMc2001468.
3. Phan L.T., Nguyen T.V., Luong Q.C., Nguyen T.V., Nguyen H.T., Le H.Q., Nguyen T.T., Cao T.M., Pham Q.D. Importation and Human-to-Human Transmission of a Novel Coronavirus in Vietnam. N. Engl. J. Med. 2020; 382:872–874. doi: 10.1056/NEJMc2001272.
4. WHO, Novel Coronavirus, Situation Dashboard. [(accessed on 9 March 2020)]; Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>
5. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2016. Pseudomonas aeruginosa. <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonas+aeruginosa+2017.pdf/7e1ed73b-eca5-4578-a4f7-1c8847e6a799>
6. Gobierno de España, Ministerio de Sanidad, ISCIII.. 2020. Interpretación de las Pruebas Diagnósticas frente a SARS-CoV-2. [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/INTERPRETACION\\_DE\\_LAS\\_PRUEBAS.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/INTERPRETACION_DE_LAS_PRUEBAS.pdf)