

Septiembre 25 de 2020

Doctora
Leyla Cueter
KEMICAL PRODUCTS

Ref.: Informe de resultados de evaluación de capacidad de una muestra de desinfectante BACOXIN LPU lote 3467 para inactivar virus usando un bacteriófago (virus de bacteria) como modelo

Informe preparado por Ángela Holguín, Martha Vives.

Ensayos realizados por Ángela Holguín.

Introducción

En el presente trabajo se determinó la capacidad antiviral de un desinfectante suministrado por KEMICAL PRODUCTS, empleando un virus bacteriano (bacteriófago) como modelo de virus. Para esto, se emplearon dos concentraciones del desinfectante, y se evaluó la actividad en el tiempo contra un bacteriófago que actúa contra la bacteria *Salmonella* Enteritidis.

La empresa KEMICAL PRODUCTS entregó dos (2) muestras del desinfectante BACOXIN LPU del Lote 3467, a una concentración de 1000 ppm.

Decanatura

Cra. 1 No. 18A-10, Bloque I - Casa Capilla, Bogotá, Colombia | Tel:(571) 3324533 | Conm: (571) 3394949 /99 – Ext. 3309

<http://ciencias.uniandes.edu.co> | E-mail: facciencias@uniandes.edu.co

Metodología

1. Microorganismos

Para las pruebas se empleó el bacteriófago (o fago) ϕ San23 activo contra *Salmonella* Enteritidis, el cual hace parte de la colección de bacteriófagos del Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC. Para su propagación y ensayo de inactivación se usó su cepa hospedera *Salmonella* Enteritidis s25pp. Tanto la bacteria como el fago se encuentran conservados a -80°C .

2. Diseño del experimento para la evaluación de la actividad del desinfectante

Se empleó una suspensión del fago ϕ San23 a una concentración de $\sim 10^{10}$ UFP/mL, y una solución del desinfectante proporcionado por KEMICAL PRODUCTS.

Se emplearon dos concentraciones del desinfectante las cuales corresponden a 500 ppm y 1000 ppm. Las diluciones se realizaron empleando como diluyente el buffer SM (1).

Para cada concentración se realizaron tres réplicas biológicas. El control consistió en la solución de fago en buffer SM sin desinfectante. Todas las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante el experimento.

Una vez en contacto la suspensión de fagos con las diferentes concentraciones del desinfectante, se monitoreó la concentración de los fagos a los 0, 1 y 5 min, de acuerdo con las instrucciones de KEMICAL PRODUCTS. Para realizar el recuento se tomó un alícuota de 0,5 ml de la suspensión y se llevó a centrifugar a 13000 rpm por 5 min; los fagos permanecen en el sobrenadante por lo que se tomaron 0,1ml de este para realizar el respectivo recuento de los virus.

3. Cuantificación de los virus

El título de los fagos se realizó empleando la metodología de *spot* (2). Esta metodología consiste en mezclar un medio con baja concentración de agar (agar *soft*),

agregar un cultivo activo de la bacteria hospedera del fago, e inmediatamente verter la mezcla sobre cajas de petri con medio de crecimiento, buscando una distribución uniforme del agar *soft*. Una vez solidificado el agar *soft* se agregaron sobre la superficie en forma de *spot*, 5 μ l de las diluciones de cada suspensión de fagos provenientes de la centrifugación.

4. Efecto del diluyente en los fagos y bacteria hospedera

Con el fin de verificar que la lisis observada en los recuentos fuera por la acción del fago y no un efecto residual del sobrenadante del desinfectante, se evaluó el efecto del sobrenadante del desinfectante en los fagos. Para esto se tomaron 0,5 ml del desinfectante y se llevaron a centrifugar por 5 min a 13000 rpm y se tomó 0,1mL del sobrenadante; se sembraron 10 μ l de este sobrenadante sobre un césped de la bacteria. Se llevó a incubar y a las 24 horas se evaluó la presencia de zonas claras.

Además, se evaluó si el sobrenadante tenía algún efecto en la concentración de los fagos. Para esto se tomó 1 ml del desinfectante, se llevó a centrifugar, se tomaron 0,5mL del sobrenadante y se agregaron a 4,5 mL de buffer SM. A esta solución se agregó 0,1 mL de la suspensión del fago y se realizó recuento de los fagos.

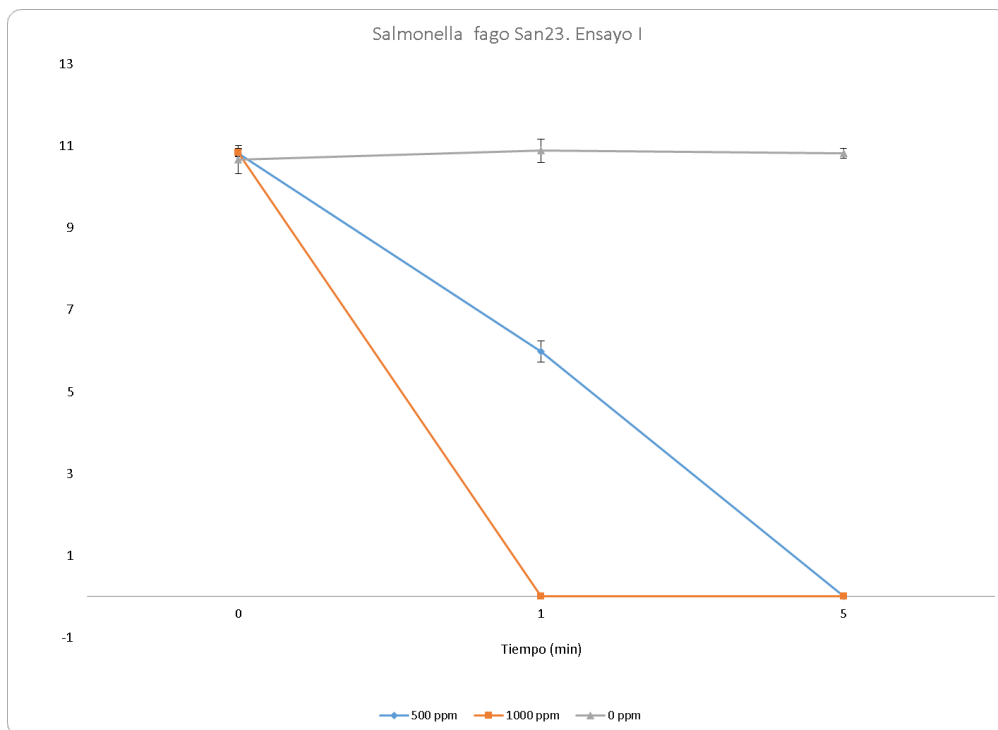
Resultados

1. Actividad inhibidora sobre el virus ϕ San23 de la muestra de desinfectante BACOXIN LPU Lote 3467.

Los resultados del experimento mostraron una inhibición del 100% de la actividad viral a los 5 minutos para ambas concentraciones del desinfectante (500 y 1000 ppm).

En el caso de las pruebas realizadas durante 1 minuto de contacto, la muestra de concentración 1000 ppm también produjo inhibición del 100% de los virus. Con la dilución 500 ppm se redujo la concentración de virus activos de 10^{10} UFP/mL a 10^6 UFP/mL, lo que representa una reducción del 99,998%.

La Gráfica 1 muestra el promedio de las réplicas y repeticiones de cada punto medido a los 0, 1 y 5 minutos de las dos concentraciones y el control.



Gráfica 1. Actividad del desinfectante BACOXIN LPU Lote 3467 sobre el virus ϕ San23.

Decanatura

Cra. 1 No. 18A-10, Bloque I - Casa Capilla, Bogotá, Colombia | Tel:(571) 3324533 | Conm: (571) 3394949 /99 – Ext. 3309

<http://ciencias.uniandes.edu.co> | E-mail: facciencias@uniandes.edu.co

2. Efecto del diluyente en los fagos y bacteria hospedero.

No se observó ningún efecto del diluyente sobre el crecimiento bacteriano ni sobre la concentración de los virus.

Análisis de resultados

Los resultados del experimento muestran que el desinfectante BACOXIN LPU Lote 3467 de KEMICAL PRODUCTS tiene un efecto de inactivación del virus ϕ San23. La concentración de 1000 ppm inhibe completamente la actividad viral en los dos tiempos de contacto ensayados, 1 y 5 minutos. La concentración de 500 ppm también presenta efecto inhibitorio pero su actividad depende del tiempo de contacto: parcial con 1 minuto de contacto, y completa a los 5 minutos.

Datos entregados

Además del presente informe, se entregan los archivos originales de los datos.

Decanatura

Cra. 1 No. 18A-10, Bloque I - Casa Capilla, Bogotá, Colombia | Tel:(571) 3324533 | Conm: (571) 3394949 /99 – Ext. 3309

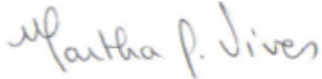
<http://ciencias.uniandes.edu.co> | E-mail: facciencias@uniandes.edu.co

Referencias

1. Sullivan Matthew, Lab, University of Arizona, The Ohio State University. Protocolos.IO <https://www.protocols.io/view/Phage-Buffer-c5ey3d>
2. Kutter, Elizabeth & Sulakvelidze, Alexander & Summers, William & Guttman, Burton & Raya, Raul & Brüssow, Harald & Ecology, Phage & Carlson, Karin. (2004). Bacteriophages: Biology and Applications.

Quedamos a su disposición para la resolución de cualquier duda sobre el presente informe.

Cordialmente,



Martha J. Vives
Profesora titular
Departamento de Ciencias Biológicas