

Agosto 28 de 2021

Ingeniero
Edgar Unigarro
Sigma Laboratorios

Ref.: Informe de resultados de evaluación de la capacidad del electrodo generador de plasma para inactivar virus usando un bacteriófago (virus de bacteria) como modelo.

Informe preparado por Laura Tatiana Morales y Martha Vives.

Ensayos realizados por Laura Tatiana Morales, en presencia de Edgar Unigarro.

Introducción

El presente informe entrega los resultados de la determinación de la capacidad antiviral de un electrodo de plasma desarrollado por Sigma Laboratorios, utilizando para las pruebas un virus bacteriano (bacteriófago) como modelo. Para esto se probaron 3 tiempos de exposición al electrodo de una suspensión de un bacteriófago que actúa contra la bacteria *Salmonella* Enteritidis. El ingeniero Edgar Unigarro suministró y operó el electrodo en las instalaciones de la Universidad de los Andes.

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 (fago) Φ San23 activo contra la bacteria *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 utilizó su cepa hospedera *Salmonella* Enteritidis s25pp.

2. Diseño experimental de inactivación del virus por el electrodo de plasma.

Se empleó una suspensión del fago Φ San23 a una concentración de $\sim 10^{10}$ UFP/mL, y el electrodo de plasma suministrado por Sigma Laboratorios.

Se emplearon tres tiempos de exposición: 1, 5 y 7 min.

Para cada tiempo se utilizaron 3 réplicas biológicas. El control consistió en una suspensión de fago en buffer SM sin exposición al electrodo de plasma. Los ensayos se hicieron colocando 100 μ L de la suspensión de fagos en una caja de Petri de vidrio estéril y colocando encima de este volumen el electrodo de plasma a 2 mm de distancia. Una vez en contacto la suspensión de fagos y el electrodo de plasma, se mantuvieron juntos durante los tres tiempos de exposición evaluados (1, 5 y 7 min); luego se hicieron diluciones en buffer SM (150mM NaCl, 40mM Tris-Cl, 10mM MgSO₄, pH 7.4) para hacer el recuento de los virus en la solución. Para hacer estas diluciones se tomaron 50 μ L de la suspensión de los fagos luego del tiempo de exposición, se llevaron a un volumen de 500 μ L y se hicieron diluciones seriadas de esta solución.

3. Cuantificación de bacteriófagos

El título (concentración) de los fagos se determinó empleando la metodología de siembra por *spot* [1]. Esta metodología consiste en mezclar un medio con baja concentración de agar (agar *soft*) con un cultivo activo de la bacteria hospedera y colocarlo en cajas de Petri con medio de cultivo sólido de una manera homogénea. Una vez esta capa de agar *soft* se encuentra solidificada se agregan 5 μ L de cada dilución del bacteriófago en forma de gota circular, o *spot*. Luego, las cajas son incubadas a 37°C durante 16 h (O.N.), aproximadamente.

Esta técnica permite cuantificar los bacteriófagos que se encuentren a una concentración de hasta 200 UFP/mL; las concentraciones por debajo de este valor no logran ser detectadas por esta metodología por lo cual se debe hacer una evaluación de la viabilidad de las muestras para las que no se observan bacteriófagos en *spot*.

4. Ensayos de viabilidad.

Para verificar la viabilidad de los bacteriófagos en las muestras que negativas por *spot*, se hace un proceso de enriquecimiento [2] que consiste en colocar 100 μ L de las diluciones de los fagos en erlenmeyers que contienen 25 mL de medio de cultivo junto con la bacteria hospedera. Estos erlenmeyers se incuban a 37°C a 130 rpm O.N. Al otro día, la solución se centrifuga a 5000 rpm por 20 min y se transfiere el sobrenadante a otro recipiente estéril. El sobrenadante se siembra en cajas de Petri mediante la metodología de *spot* descrita previamente, y se evalúa la presencia zonas claras que indican la presencia de bacteriófagos activos.

Resultados

1. Efecto inhibitor del electrodo de plasma sobre el virus Φ San23

Los resultados del experimento mostraron una inhibición del 8,0 % de la actividad viral cuando se tuvo una exposición al electrodo de plasma por 1 min. Una inhibición que correspondería al 99,999997 % cuando se exponen a 5 min, y del 100 % cuando se exponen a 7 min.

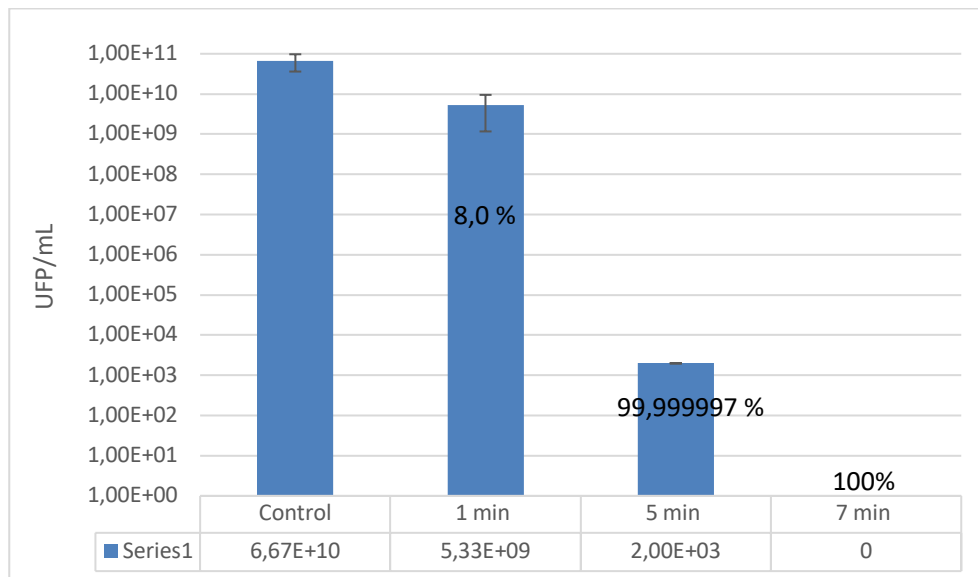


Figura 1. Efecto de tres tiempos de exposición al electrodo de plasma suministrado por Sigma Laboratorios de una suspensión del virus Φ San23. Los porcentajes mostrados en la figura corresponden a la inhibición en virus activos con respecto al control.

Para el caso de tiempo de exposición 5 min, sólo en una de las tres réplicas se evidenció viabilidad del bacteriófago tanto por la técnica de *spot* como en los resultados después del enriquecimiento. En las otras dos réplicas se evidenció la completa inhibición del virus.

Para el caso de tiempo de exposición 7 min al electrodo de plasma, no se observó viabilidad del bacteriófago ni por la técnica de *spot* ni después del enriquecimiento, lo que indica una inhibición del 100 % de la actividad del virus.

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

Análisis de resultados

Los resultados evidenciaron que 1 min de exposición no es suficiente para la inhibición del bacteriófago, ya que sólo se reduce su viabilidad en un 8,0 %, mientras que una exposición de 5 min alcanza una inhibición de por lo menos el 99,999997 %. Para este tiempo de exposición se detectó viabilidad de virus únicamente en una de las réplicas; esto se puede deber a una distribución no homogénea de la interacción con el electrodo por lo que pudo quedar una pequeña región de los 100 μ L sin exposición al plasma en esa réplica y por lo tanto algunos bacteriófagos siguieron activos.

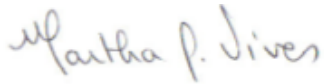
Cuando la exposición es de 7 min se inhibe totalmente la viabilidad del bacteriófago; con este tiempo de exposición también se observa una reducción del volumen de la muestra por evaporación debido a la temperatura que alcanza el electrodo.

Bibliografía

- [1] Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (Eds.). (2004). Bacteriophages: biology and applications. Crc press.
- [2] Fineran, P. (2012). [Isolation of bacteriophage from environmental samples].

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

Cordialmente,



Martha J. Vives

Profesora titular

Departamento de Ciencias Biológicas