

OPTIMIZACIÓN DE UNA PCR EN TIEMPO REAL (qPCR) PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Herpes Virus Asociado a Sarcoma de Kaposi (KSHV)

OPTIMIZATION OF A REAL-TIME PCR (qPCR) FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF KSHV

Carlos Eduardo Ochoa Gamboa

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional del General San Martín, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Microbiología, ANLIS "CARLOS G MALBRAN" Av. Vélez Sarsfield 563, Buenos Aires

carlo8ag@yahoo.es

RESUMEN

El Herpes Virus Asociado al Sarcoma de Kaposi es causante de tres importantes patologías asociadas al SIDA, que en los últimos años han desencadenado importantes epidemias, siendo un objetivo primordial contar con técnicas altamente sensibles y específicas para su detección y cuantificación, por tal razón nos enfocamos en optimizar una metodología molecular, la PCR en tiempo real (qPCR) donde me permita evaluar controles positivos para monitorear el diagnóstico confiable y oportuno, en el presente estudio se evaluó dos controles, una línea celular BCBL-1 infectada con KSHV y un Plásmido con un Inserto de 330 pb del ORF26 del KSHV por medio de una qPCR con sondas taqman en dos sistemas diferentes de detección (FAM-TAMRRA y FAM-MGB), se optimizó cada reacción y se realizó una comparación de la eficiencia donde se eligió la mejor para luego realizar una curva de calibración que me permita detectar con alta sensibilidad y cuantificar el KSHV, obteniendo como resultado dos controles positivos; la línea celular BCBL-1 a una concentración de $2,8 \times 10^6$ copias/ μL (cop/ μL) y un plásmido con una concentración de $6,93 \times 10^9$ cop/ μL de KSHV, se obtuvo la optimización de las reacciones en ambos sis-

temas de sonda la cual presento mejor desempeño la sonda con marcación FAM-MGB con un 98% de eficiencia comparado con un 96% de eficiencia en el sistema FAM-TAMRRA, la curva de calibración se realizó con el sistema FAM-MGB presentando una sensibilidad de 1 copia total de genoma viral y un rango reportable desde 106 copias hasta 1 copia con una eficiencia de reacción de 99%.

PALABRAS CLAVE: BCBL-1, Plásmido, qPCR, Sarcoma de Kaposi, Sondas Taqman.

ABSTRACT

Kaposi's Sarcoma Associated Herpes Virus is the cause of three important pathologies associated with AIDS, which in recent years have triggered major epidemics, being a primary objective to have highly sensitive and specific techniques for their detection and quantification, for this reason we focused on optimizing a molecular methodology, the real-time PCR (qPCR) where I can evaluate positive controls to monitor reliable and timely diagnosis, In the present study two controls, a BCBL-1 cell line infected with KSHV and a Plasmid with a 330 bp ORF26 insert of KSHV were evaluated by means of a qPCR with taqman probes in two

different detection systems (FAM-TAMRRA and FAM-MGB), Each reaction was optimized and a comparison of the efficiency was made where the best was chosen. Then a calibration curve was made which allows me to detect with high sensitivity and quantify the KSHV, obtaining as a result two positive controls; the BCBL-1 cell line at a concentration of 2.8×10^6 copies/ μL (cop/ μL) and a plasmid with a concentration of 6.93×10^9 cop/ μL of KSHV, the optimization of the reactions in both probe systems was obtained, which presented better performance the probe with FAM-MGB marking with 98% efficiency compared to 96% efficiency in the FAM-TAMRRA system, the calibration curve was performed with the FAM-MGB system presenting a sensitivity of 1 total copy of the viral genome and a reportable range from 106 copies to 1 copy with a reaction efficiency of 99%

KEY WORDS: BCBL-1, Plasmid, qPCR, Kaposi's Sarcoma, Taqman Probes

INTRODUCCION

El virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) es un Herpes de ADN bicatenario perteneciente a la familia Herpesviridae, la partícula viral completa o virión está formada por un core central denso y una envol-

tura lipídica de un tamaño de 100 a 150 nm, el ciclo de vida viral comprende los programas virales latentes y líticos, el genoma de KSHV se mantiene en las células huésped como un episoma y durante la etapa latente pocos genes virales se expresan, el descubrimiento del virus fue detectando una secuencia de la proteína menor de cápside (ORF26) en lesiones de pacientes infectados. [1] Es agente etiológico de tres patologías importantes ampliamente asociadas a pacientes con SIDA; La Enfermedad Multicéntrica de Castleman (MCD), el Linfoma Primario de Efusión (PEL) y el Sarcoma de Kaposi (SK), [2] este último es un tumor vascular localmente agresivo que generalmente se presenta con múltiples parches, placas o nódulos cutáneos, en cuanto a la frecuencia del SK se ha presentado un aumento importante en Europa y Estados Unidos durante la epidemia de SIDA [3] respecto a la detección del KSHV la cuantificación viral permite el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en SK, siendo útil para guiar el tipo o la duración de la terapia. [4] La qPCR proporciona una medida cuantitativa de la replicación lítica del virus, que se correlaciona con el riesgo de SK posterior [5] y es una herramienta valiosa para monitorear la viremia, pero no está disponible en muchas partes del mundo. [6] En este trabajo proponemos una metodología que aspira a optimizar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) implementando dos tipos de sistemas de Sondas Taqman; FAM-TAMRA y FAM-MGB en el marco de lectura ORF26, la cual nos permita obtener un procedimiento altamente específico y sensible como herramienta para diagnosticar y cuantificar ADN del KSHV en muestras Biológicas.

METODOLOGÍA

El ADN viral se evaluó con dos controles positivos; 1) a partir del

plásmido pks330 BAM el cual tiene un fragmento de 330 pb del ORF 26 del KSHV y 2) de un stock de ADN viral total proveniente de células BCBL-1 portadoras de KSHV, obtenidas a través del programa para la Investigación del SIDA del INS de Estados Unidos (NIH AIDS RESEARCH PROGRAM). Se realizó la extracción del ADN viral y plasmídico con kits comerciales Invitrogen™ Viral Mini Kit y Accuprep® plasmid mini Bioneer respectivamente. El ADN viral de BCBL-1 y el plásmido se cuantifico realizando diluciones 1:15 en tris EDTA pH8 con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm, se midió la pureza con la lectura de la relación 260/280 nm, obteniendo la concentración en ng/ μ L, Para el cálculo estimado de número de cop/ μ L del plásmido se utilizó herramientas informática URI Genomics & Sequencing Center utilizando la concentración del ADN y la longitud del plásmido, para BCBL-1 se estimó las cop/ μ L partiendo de un consenso científico que cada célula tiene 80 copias virales, confirmándose mediante una comparación con el plásmido cuantificado, las solución Madre fue de 2×10^6 cop/ μ L y soluciones de trabajo de 2×10^5 cop/ μ L para BCBL-1 y solución madre de 2×10^7 cop/ μ L y solución de trabajo de 2×10^6 cop/ μ L para el Plásmido. Se diseñó los Primers y sondas con el Primer Express Software v3.0.1, se utilizó concentraciones madre de 200nM y soluciones de trabajo de 10nM, se realizó la verificación de los Primers y las sondas con el programa Primers BLAST NCBI y realizando amplificaciones de PCR con concentraciones de ADN de 103 cop/ μ L, para la optimización de reacciones se realizó un diseño experimental; primero se optimizo la temperatura de Annealing de los Primers y sondas realizando amplificaciones de qPCR en un ciclador 7500System Applied Biosystem usando una concentración de ADN de 103 y 104 cop/ μ L testeando temperaturas de 57°, 58°, 53°, 56° y 60° C, luego se

realizó un esquema con todas las posibles combinaciones de los Primers utilizando tres concentración 100, 300 y 900 nM para cada primer (Directo y Reverso) y dos concentraciones 125 y 250 nM para las sondas (Fam-Tamrra y Fam- MGB), por último se realizó la elección de las dos combinaciones más eficientes para cada sistema de sondas, los criterios de selección fueron las reacciones que presentaban menor ciclo umbral (Ct) mayor delta ΔR_n , mejor R2 y mejor eficiencia de reacción para realizar una curva de calibración que permita detectar y cuantificar el KSHV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se observa las absorbancias y la concentración obtenida para cada uno de los controles positivos realizadas con una dilución de 1:15 adicionando 8/ μ L de ADN + 112 de Tris EDTA pH8. A 260 se mide la absorbancia de ácidos nucleicos, la relación de 260/280 para medir la pureza del ADN y el volumen final de elución. La concentración del plásmido se obtuvo en base a su longitud en pares de bases (pb) y su concentración en ng, empleando la calculadora del centro de secuencia y genómica de URI [7]

Cuantificación de ADN y Cálculo de cop/μL

Control +	Dilución	260 nm	260/280 nm	Concentración (ng/μL)	Volumen (μL)
BCBL- 1	1:15	0,308	1,9	230	534
Plásmido	1:15	0.210	1,86	29,7	80

Tabla1. Resultados de las concentraciones de ADN.

Para el cálculo de cop/μL del Control BCBL-1 se parte de la concentración de obtenida 230 μg/μL, si se estima que una célula diploide tiene un peso de 6.6 picogramos (pg) y por consenso científico una célula de BCBL-1 tiene 80 copias virales [3] entonces tenemos:

$$6.6 \text{ pg} \text{ ----- } 1 \text{ Célula (80 cop de KSHV)}$$

$$230000 \text{ pg/}\mu\text{L} \text{ ----- } X = 2,8 \times 10^6 \text{ copias / } \mu\text{L}$$

Control	Concentración (cop/ μL)
BCBL-1	$2,8 \times 10^6$
Plásmido	$6,93 \times 10^9$

Tabla 2. Copia/μL de controles positivos

QUÍMICA	FRAGMENTO	DIRECCIÓN	SECUENCIAS DE CEBADORES Y SONDAS – MARCACIÓN
TAQMAN MGB	ORF 26	Directo	CO1 (8-28) GCAGTGCTACCCCAKTTTTT
		Reverso	CO2 (66-48) CCGTTGGATTTCGAGCACAA
		Sonda	CO Probe (31-47) FAMCCGAAAGGATTCCACCMGB-NFQ
TAQMAN con Quécher (TAMRA)	ORF 26	Directo	CO1 (8-28) GCAGTGCTACCCCAKTTTTT
		Reverso	CO (80-61) ACACGAKGTCAAATCCGTTGGA
		Sonda	Probe FTCO (31-46) FAM5'CCGAAAGGATTCCACC3'TAMRA

Tabla 3. Primes y sondas. Se describen los Primers y sondas diseñados para la amplificación del ORF 26.

Comparación del plásmido y BCBLZ



Fig. 1 Comparación de los controles positivos. Se observa la amplificación por qPCR de los controles positivo; (B) BCBL-1 y (P) plásmido para comparar su concentración en cop/μL

Los resultados de BCBL-1 se obtienen a partir de una curva del plásmido de 4 puntos en diluciones seriadas de 1:10 desde 10⁵ hasta 10² cop/μL, donde observamos una similitud entre los resultados de cada uno de los controles, se observa una diferencia de 0,5 Ct en cada control, resaltando la falta de optimización en las reacciones de qPCR, esta prueba se realiza para verificar los cálculos de las concentraciones en cop/μL.

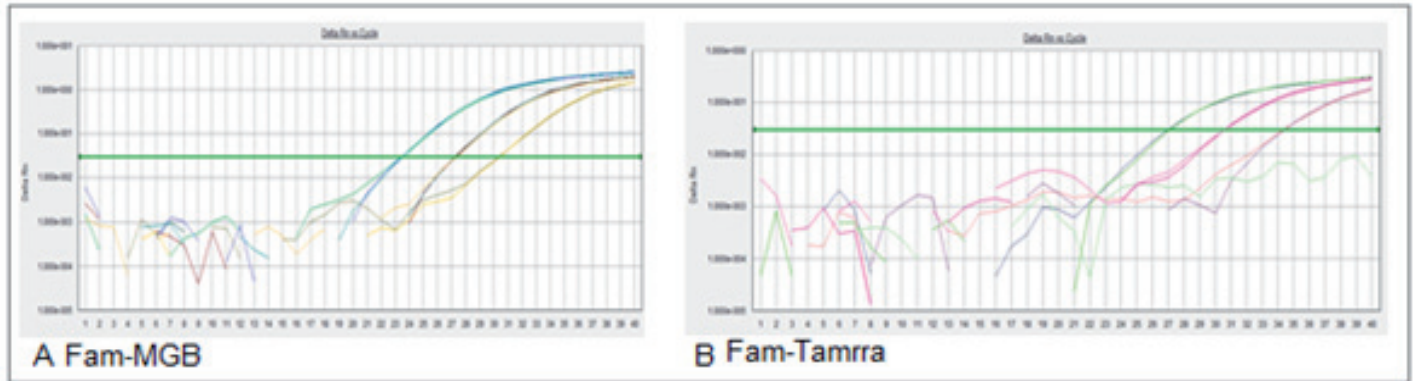


Fig. 2 Amplificación del ORF 26 con el control BCBL-1. se amplificó tres diluciones 10⁴, 10³ y 10² cop/μL, evaluando la eficiencia de las reacciones en los dos sistemas de sondas taqman.

Los resultados obtenidos en la optimización de las reacciones de qPCR como se muestran en la figura 2. A) observamos la reacción con la sonda taqman Fam-MGB con concentraciones de Sonda 125 nM, Primer F 900 nM y R 900 nM donde se obtuvo el mejor valor de Ct de 29,7 para 10² cop/μL, un R² de 0,98 y una eficiencia del 98% con un desvío estándar de 0.01. B) se muestran los resultados de la reacción con la sonda taqman Fam-Tamrra con concentraciones de Sonda 125 nM, Primers F 300 nM R 900 nM Se obtuvo el segundo menor valor de Ct 31,3 en 10² cop/μL, un R² de 0,96 una eficiencia de 96% con una desviación estándar de 0.15. Las temperaturas de Annealing de los primer en la cual presento mejor eficiencia fue de 52°C.

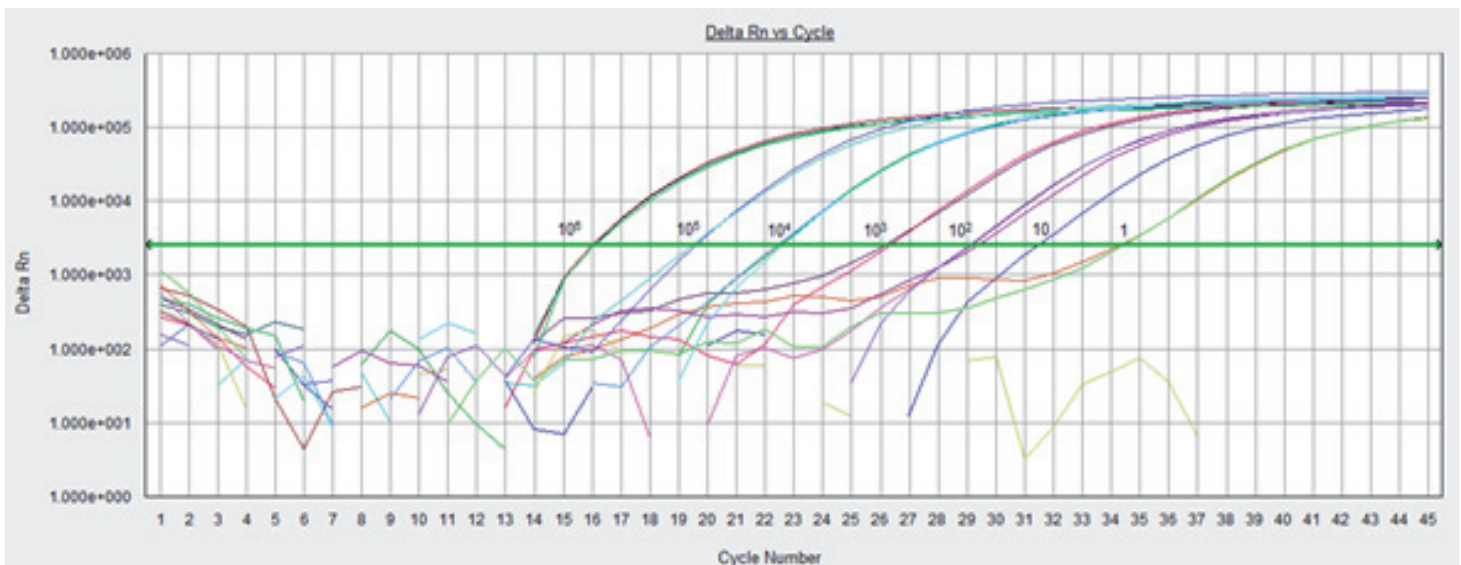


Fig. 3 Amplificación del ORF 26 del Control BCBL-1. Se muestran los resultados de una curva de amplificación desde 10⁶ hasta 1 cop/totales

La reacción de amplificación por qPCR obtenida con el control de BCBL-1 con el sistema de sonda taqman Fam-MGB fue optimizada como se observa en la Fig. 3, detectando hasta 1 copia viral, esto indica que tiene una alta sensibilidad y un amplio rango de cuantificación para el SKHV, la reacción presenta valores de Eficiencia de 99%, y un R² de 0,99.

CONCLUSIONES

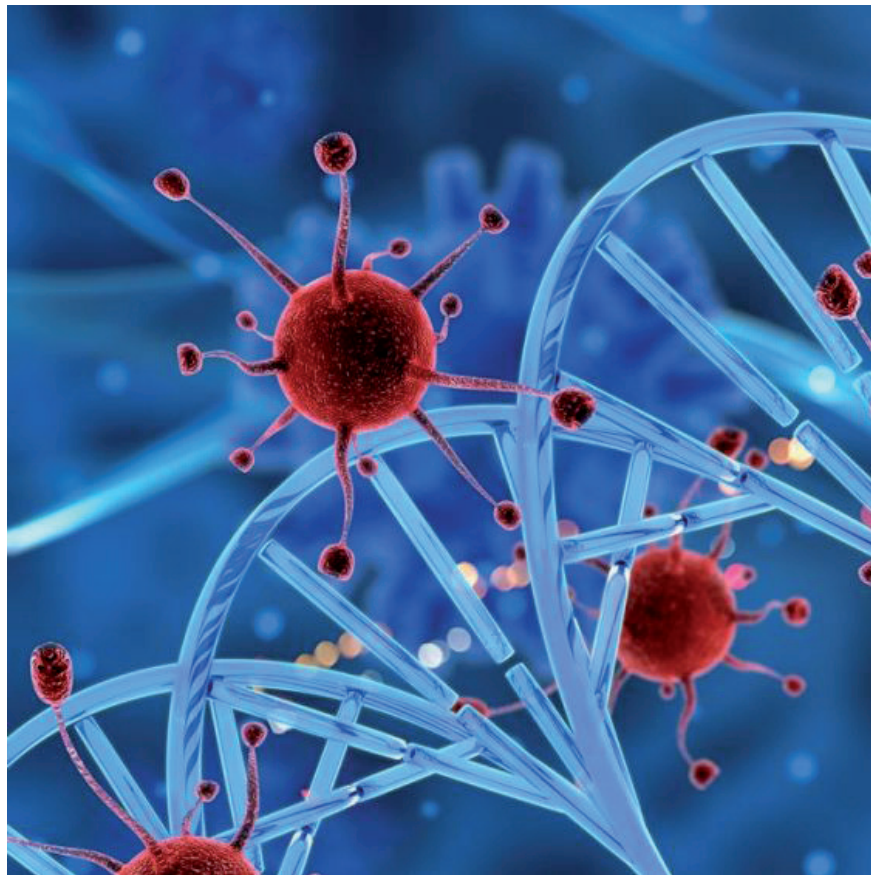
En el presente estudio se propuso varios objetivos que fueron alcanzados de forma satisfactoria, la obtención y cuantificación de dos controles positivos (BCBL-1 y pks330 BAM) que permitirán evaluar la sensibilidad de las técnicas moleculares en estudios posteriores, diseñar oligonucleótidos específicos para la el ORF 26 de KSHV con dos sistemas de sondas, la optimización de dos reacciones de qPCR con sistemas taqman con eficiencias arriba del 98% y una curva de calibración con ADN de HSHV de origen celular (BCBL-1) que permite detectar y cuantificar el KSHV en muestras biológicas con una sensibilidad de detección de una copia viral y un rango dinámico de 106 hasta 1 copias totales.

Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology 21(12):831–44.

5. Golchin, Neda, Maryam Kheirandish, Zohreh Sharifi, Shahram Samiee, Parviz Kokhaei, and Zahra Pourpak. 2015. “Quantification of Viral Genome in Cord Blood Donors by Real Time PCR to Investigate Human Herpesvirus Type 8 Active Infection.” *Transfusion and Apheresis Science* 53(3):378–80.
6. Schneider, Johann W. and Dirk P. Dittmer. 2017. “Diagnosis and Treatment of Kaposi Sarcoma.” *American Journal of Clinical Dermatology* 18(4):529–39.
7. <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>

BIBLIOGRAFÍA

1. Schulz, Thomas F. and Ethel Cesarman. 2015. “Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus: Mechanisms of Oncogenesis.” *Current Opinion in Virology* 14:116–28.
2. Wang, X., H. Wang, B. He, Y. Hui, G. Lv, L. Li, and H. Wen. 2012. “Virological and Molecular Characterization of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Strains from Xinjiang, China.” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31(1):53–59.
3. Speicher, David J., Peter Wanzala, Melvin D’Lima, Anthony Njiru, Mark Chindia, Elisabeth Dimba, and Newell W. Johnson. 2015. “Diagnostic Challenges of Oral and Cutaneous Kaposi’s Sarcoma in Resource-Constrained Settings.” *Journal of Oral Pathology and Medicine* 44(10):842–49.
4. Tedeschi, R., J. Dillner, and P. De Paoli. 2002. “Laboratory Diagnosis of Human Herpesvirus 8 Infection in Humans.” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious*



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIVIRAL DEL DESINFECTANTE RSE-19

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL CAPACITY OF THE RSE-19 DISINFECTANT

Sebastián Ortiz¹, Johann F. Osma¹, Juan C. Cruz², Neils Leal³, Mateo Herreño³, Alexandra Rueda^{3,4}, Nilson Ahumada³

1 CMUA. Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica. Universidad de los Andes. Carrera 1E#19A-40, Bogotá, Colombia, js.ortiz10@uniandes.edu.co, jf.osma43@uniandes.edu.co

2 Departamento de Ingeniería Biomédica. Universidad de los Andes. Carrera 1E#19A-40, Bogotá, Colombia, jc.cruz@uniandes.edu.co

3 Multinsa 1A SA, Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación, neils.leal@multinsa.com, mateo.herreno@multinsa.com, alexandra.rueda@multinsa.com, nilson.ahumada@multinsa.com

4 Biosphere Colombia, Centro de Investigación, Departamento de Investigación, biosphere@biospherecolombia.com

Resumen

En los lugares cerrados y altamente transitados existen altas probabilidades de contagio con el virus SARS-CoV-2 y de contraer la enfermedad COVID-19, la cual ha sido causante de una emergencia sanitaria sin precedentes a nivel global. Uno de las rutas de contagio es el contacto con superficies contaminadas con el virus, por lo que se han establecido protocolos de desinfección periódica de superficies en lugares públicos. La empresa Multinsa, en colaboración con la Universidad de los Andes, desarrolló un desinfectante con un componente nanotecnológico que permite prolongar su acción antimicrobiana. Para comprobar su eficacia, se evaluó su capacidad antimicrobiana y antiviral, así como el tiempo de permanencia en superficies. Si bien su poder antimicrobiano y antiviral es similar al de desinfectantes convencionales como el hipoclorito de sodio, su permanencia extendida en diversos tipos de superficies ofrece una gran ventaja competitiva en la prevención del contagio con el virus.

Palabras claves: Desinfectante, COVID, Nanotecnología

Abstract

In closed and highly trafficked places there are high probabilities of contagion with the SARS-CoV-2 virus and of contracting the COVID-19 disease, which has caused an unprecedented global health emergency. One of the routes of contagion is contact with surfaces contaminated with the virus, which is why protocols for periodic disinfection of surfaces in public places have been established. The Multinsa company, in collaboration with the Universidad de los Andes, developed a disinfectant with a nanotechnological component that allows its antimicrobial action to be prolonged. To check its efficacy, its antimicrobial and antiviral capacity was evaluated, as well as the residence time on surfaces. Although its antimicrobial and antiviral power is similar to that of conventional disinfectants such as sodium hypochlorite, its extended permanence on various types of surfaces offers a great competitive advantage in the prevention of contagion with the virus.

Keywords: Disinfectant, COVID, Nanotechnology

Introducción

El SARS-CoV-2 es un coronavirus, causante de la enfermedad COVID-19. Su alta tasa de contagio ha dado lugar a una pandemia sin precedentes en la historia más reciente. Esto ha ocasionado miles de muertes a nivel mundial. Es así como para finales de Julio de 2020, la cifra de muertos ya había superado las 640.000 personas². Debido al alto riesgo para las personas, muchos países, incluyendo a Colombia, impusieron medidas encaminadas a mitigar la propagación del virus en la población, tales como la cuarentena³. En Bogotá, la cuarentena comenzó el 20 de Marzo, 5 días antes que en la mayoría del país, sin embargo, solo esta ciudad alberga la tercera parte del total de casos reportados⁴. Los espacios cerrados por los que transitan muchas personas, tales como el sistema de transporte público masivo, son lugares en los que la probabilidad de contagio es extremadamente alta y puede alcanzar valores de hasta el 95% bajo ciertas condiciones⁵. En un intento por dismi-

nuir la tasa de contagio en dichos lugares, se hacen desinfecciones exhaustivas periódicamente con compuestos como el hipoclorito de sodio. Esto permite reducir la carga viral existente en las superficies, lo que resulta en la disminución de la probabilidad de contagio indirecto entre los transeúntes. Desinfectantes basados en sales de amonio cuaternarias^{6,7} y clorhexidina^{8,9} han demostrado tener actividad antimicrobiana y antiviral contra múltiples virus incluyendo aquellos con y sin envoltura. Con el ánimo de apoyar la lucha contra la propagación de este virus, la empresa Multinsa desarrolló un desinfectante basado en dichos compuestos. Teniendo en cuenta la necesidad de lograr un efecto de acción prolongada, se adicionó un componente nanotecnológico que permite incrementar la permanencia del desinfectante en varios tipos de superficies.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la capacidad antibacteriana y antiviral del desinfectante, así como su permanencia en diferentes tipos de superficies en donde es posible encontrar el virus.

Metodología

El desinfectante y demás reactivos fueron utilizados sin purificación o esterilización previa y siguiendo las instrucciones de uso que sugiere el fabricante a menos de que se indique lo contrario. Los medios de cultivo y material de vidrio fueron esterilizados en una autoclave a 121°C durante 30 minutos. La acción antibacteriana del desinfectante fue comprobada con un ensayo de concentración mínima inhibitoria por microdilución (MIC) en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* spp. cultivadas en caldo Luria-Betani (LB) a 37°C. Para ello se preparó un inóculo bacteriano con 1 mL de una suspensión bacteriana a una

densidad óptica a 620 nm (DO₆₂₀) de 0,2. A continuación la suspensión es centrifugada a 1800 rpm durante 5 min a 4°C, se retira el sobrenadante y el pellet se lava con 1 mL de buffer HEPES (pH = 7,01) 2 veces. Posteriormente se resuspende en 1 mL de buffer y se realiza una dilución de 1:1000 para obtener una concentración de aproximadamente 5 ufc/mL.

En un pozo de microplaca se sirven 50 µL de la dilución correspondiente de un tratamiento, posteriormente se adicionan 50 µL de la suspensión bacteriana y se deja incubar a 37°C por 4 horas. A continuación fueron sembradas 9 diluciones seriadas, cada una con la mitad de la concentración de la anterior (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512). Subsecuentemente se adicionaron 100 µL de caldo LB y se incubó por 24 horas. Pasado este tiempo, se midió la DO₆₂₀ en un espectrofotómetro. Se reporta como MIC la concentración mínima a la cual se evidencia la inhibición del crecimiento bacteriano. Como control positivo se utilizó penicilina y como control negativo buffer HEPES pH=7,01. Se aplicaron las pruebas estadísticas F (para comprobar homocedasticidad) y t (para comparar sets de datos) como se sugiere en la literatura.¹ Se consideró inhibición del crecimiento a todo DO₆₂₀ cuyo intervalo de confianza (95%, n=3) contenga al valor de DO correspondiente al control positivo.

La acción antiviral fue primero evaluada en bacteriófagos por el centro de investigaciones microbiológicas de la universidad de los Andes (CIMIC) en Bogotá, usando como modelo el fago 6.1, el cual es activo contra *E. coli*. El fago y la cepa *E. coli* 6 usados hacen parte de la colección del CIMIC y son conservados a -80°C. Para ello se mezclaron 4,5 mL de buffer SM, 0,1 mL de suspensión 1010 UFP/mL del fago (concentración final de 108 UFP/mL) y 0,5 mL del desinfectante diluido adecuadamente para alcanzar una

concentración final de 1/100, 1/1000 o 1/10000. Como control negativo se usó buffer SM. El título de fagos fue monitoreado a los 0, 5, 15 y 24 minutos, empleando la metodología de spot. Para ello se mezcló un medio con baja concentración de agarosa (agar soft) y un cultivo de la bacteria hospedera del fago e inmediatamente se sirvió sobre una caja de Petri con medio de crecimiento y se permitió la solidificación del agar soft. A cada intervalo de tiempo se toma una muestra de 0,5 mL de la mezcla fago/desinfectante a analizar y se centrifuga a 13.000 rpm. Posteriormente, se tomaron 0,1 mL del sobrenadante y se realizaron diluciones seriadas 1:10 en buffer SM. Cada dilución se sembró por triplicado en la superficie del agar soft con bacteria previamente preparado y se incubó a 37°C durante 24 h.

La evaluación de la actividad antiviral contra SARS-CoV-2 fue realizada por el grupo de inmunovirología de la universidad de Antioquia. Para la permanencia en superficies, el desinfectante fue aplicado de acuerdo a las instrucciones de uso recomendadas por el fabricante en superficies de plástico, papel moneda, vidrio, acero inoxidable y tela. La permanencia fue evaluada a las 0, 0,25, 4, 8, 24, 30, 48, 72, 96 y 120 horas. Para ello se agregaron 100 µL de glutaraldehído (1%) y, tras 5 min, se retiró el exceso y se realizaron 2 a 3 lavados con agua tipo 1. A continuación, se agregaron 100 µL de una suspensión de lacasa y se dejó en contacto durante 15 minutos, tras lo cual se retiró el exceso de líquido y se realizaron 2 lavados con agua tipo 1. Esto permitió conjugar químicamente las moléculas de lacasa al componente nanotecnológico incorporado en el producto. Finalmente se adicionaron 100 µL de ABTS (1%) en buffer de pH = 4 y se observó a los 15 minutos. De estar presente la lacasa hay un cambio de color observable de incoloro a verde, lo que al mismo tiempo indicaría la permanencia del desinfectante.

tante en la superficie de estudio.

La actividad antimicrobiana fue confirmada por pruebas realizadas de manera independiente por Laboratorios M&G S.A.S, mientras que la actividad residual se llevó a cabo por la empresa Ingeniería Química especializada MK.

Resultados y Discusión

Para determinar el valor de MIC para cada cepa se calculó una DO620 con un intervalo de confianza del 95% y se evaluó si el valor de DO correspondiente al control positivo estaba contenido en dicho intervalo. Se considera que la concentración corresponde con el MIC si el OD620 del control positivo está contenido en el de dicha concentración, pero no en el intervalo de confianza de la dilución siguiente. Mientras que la concentración mínima inhibitoria para *E. coli* y *S. aureus* fue de 1:28, el crecimiento de *P. aeruginosa* y *Salmonella spp.* se vió inhibido desde la dilución 1:29. El análisis posterior llevado a cabo por parte de Laboratorios M&G S.A.S demostró que el producto tiene concentración mínima inhibitoria de 50 g/L, concentración mínima bactericida de 100 g/L y concentración mínima antifúngica de 25 g/L. Por otra parte, se demostró que se requiere un tiempo de exposición mínimo de 10 minutos para asegurar la eliminación total de las bacterias y levaduras evaluadas en superficies como el acero.

Una primera aproximación para la comprobación de la actividad antiviral consistió en el uso de bacteriófagos como modelo viral, debido a la facilidad de su manipulación. Siguiendo la metodología previamente descrita, se comprobó el efecto del desinfectante sobre un bacteriófago activo contra *E.coli*. El título viral de fagos fue reducido en un orden de magnitud al ser tratado con la dilución 1/100, tras 15 minutos de contacto. Sin embargo, a los

24 minutos esta concentración produjo una reducción de 4 ordenes de magnitud y las otras dos diluciones produjeron una reducción de 1 orden de magnitud. Una segunda prueba, evaluando tiempos más prolongados arrojó que los efectos de la dilución 1/100 se mantenían en periodos de hasta 24 h, mientras que el título de los fagos tratados con la dilución 1/1000 volvía a ser igual al control negativo 4 horas después del contacto.

La acción antiviral en un modelo de SARS-CoV-2 fue confirmada con una concentración de 20 g/L y un tiempo de contacto de 30 minutos, en solución. Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas, el desinfectante RSE-19 se puede clasificar como un desinfectante de nivel bajo¹⁰, de acuerdo a los lineamientos del ministerio de salud, debido principalmente al tiempo de contacto que requiere para tener efecto.

Posteriormente, se procedió a evaluar el tiempo de permanencia en superficies del desinfectante. Para ello se realizó una prueba enzimática sobre moléculas de lacasa conjugadas a los componentes nanotecnológicos del producto. La actividad de la lacasa puede ser detectada fácilmente con el uso de un sustrato cromogénico, como el ABTS, el cual se torna de color verde intenso al ser oxidado por la lacasa. A través de esta técnica fue posible comprobar la permanencia del desinfectante por periodos de hasta 120 horas en diferentes superficies, como se muestra en la tabla 1.

Superficie	Tiempo de permanencia (h)
Tapabocas	120
Bata Desechable	120
Vidrio	120
Plástico	120
Acero	8

Tabla 1. Pruebas de adherencia del RS-19 en diferentes superficies

Actualmente, el principal agente desinfectante utilizado en lugares altamente transitados, tales como los sistemas de transporte público, es el hipoclorito de sodio. Este también se encuentra clasificado como un desinfectante de nivel bajo por el ministerio de salud¹⁰, por lo que su poder desinfectante es comparable con el producto RSE-19 desarrollado en este trabajo. Sin embargo, este último tiene una ventaja adicional y es su tiempo de permanencia en las superficies. Como se demostró anteriormente, el desinfectante RSE-19 puede permanecer en diversas superficies por hasta 120 horas, además, puede ser aplicado de forma segura en superficies de acero inoxidable, ya que no es corrosivo ni produce daños al material. Este no es el caso del hipoclorito de sodio, cuyos principios pueden desatar procesos de corrosión.

Conclusiones

El alto tiempo de permanencia, la baja toxicidad y su efectividad comparable con la de otros desinfectantes convencionales, sugieren que el RSE-19 podría ofrecer una mayor protección contra la posibilidad de transmisión indirecta de COVID mediada por el contacto con superficies infectadas.

Bibliografía

1. Velavan, T. P.; Meyer, C. G. The

- COVID-19 Epidemic. *Trop Med Int Health* 2020, 25 (3), 278–280. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>.
2. Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (accessed Jul 28, 2020).
 3. Amariles, P.; Granados, J.; Ceballos, M.; Montoya, C. J. COVID-19 in Colombia Endpoints. Are We Different, like Europe? *Research in Social and Administrative Pharmacy* 2020, S1551741120302874. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.03.013>.
 4. CORONAVIRUS (COVID-19) <https://covid19.minsalud.gov.co/> (accessed Jul 28, 2020).
 5. Nishiura, H.; Oshitani, H.; Kobayashi, T.; Saito, T.; Sunagawa, T.; Matsui, T.; Wakita, T.; MHLW COVID-19 Response Team; Suzuki, M. Closed Environments Facilitate Secondary Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19); preprint; *Epidemiology*, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.28.20029272>.
 6. Rajkowska, K.; Koziróg, A.; Otłowska, A.; Piotrowska, M.; Nowicka-Krawczyk, P.; Brycki, B.; Kunicka-Styczyńska, A.; Gutarowska, B. Quaternary Ammonium Biocides as Antimicrobial Agents Protecting Historical Wood and Brick. *Acta Biochim Pol* 2015, 63 (1). https://doi.org/10.18388/abp.2015_1134.
 7. Shiga, T.; Mori, H.; Uemura, K.; Moriuchi, R.; Dohra, H.; Yamawaki-Ogata, A.; Narita, Y.; Saito, A.; Kotsuchibashi, Y. Evaluation of the Bactericidal and Fungicidal Activities of Poly([2-(Methacryloyloxy) Ethyl]Trimethyl Ammonium Chloride)(Poly (METAC))-Based Materials. *Polymers* 2018, 10 (9), 947. <https://doi.org/10.3390/polym10090947>.
 8. Bailey, A.; Longson, M. Virucidal Activity of Chlorhexidine on Strains of Herpesvirus Homnis, Poliovirus, and Adenovirus. *Journal of Clinical Pathology* 1972, 25 (1), 76–78. <https://doi.org/10.1136/jcp.25.1.76>.
 9. Eggers, M.; Koburger-Janssen, T.; Ward, L. S.; Newby, C.; Müller, S. Bactericidal and Virucidal Activity of Povidone-Iodine and Chlorhexidine Gluconate Cleansers in an In Vivo Hand Hygiene Clinical Simulation Study. *Infect Dis Ther* 2018, 7 (2), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s40121-018-0202-5>.
 10. Ministerio de Salud y Protección Social. Limpieza y Desinfección En Servicios de Salud Ante La Introducción Del Nuevo Coronavirus (SARS-CoV-2) a Colombia. March 16, 2020.

