



INFORME TECNICO ENSAYO Nº RB45-2017

DILUCIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y BACTERICIDA DEL PRODUCTO DESINFECTANTE SC1000 EN FASE RESUSPENDIDA Y BIOPELICULAS DE CLOSTRIDIUM SP (*C. PERFRINGENS*; *C. DIFFICILE*)

Solicitante : Santiago Verdugo

Empresa Prorganik SpA

Teléfono +56 2 22471408

Fecha entrega infrome 22 de Diciembre

JOSÉ MIGUEL VIDAL ARAYA

GERENTE TÉCNICO



Índice de contenidos

Contenido	Nº
1.- Antecedentes	3
2.- Objetivos	3
3.- Metodología	4
Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante sobre crecimiento en fase planctónica de la cepa <i>Clostridium</i> sp (<i>C. Perfringens</i> , <i>C. Difficile</i>).	4
Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa <i>Clostridium</i> sp. (<i>C. Perfringens</i> , <i>C. Difficile</i>).	5
4.- Resultados	7
Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante sobre crecimiento en fase planctónica de la cepa <i>Clostridium</i> sp (<i>C. Perfringens</i> , <i>C. Difficile</i>).	7
Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa <i>Clostridium</i> sp. (<i>C. Perfringens</i> , <i>C. Difficile</i>).	9
5.- Referencias	13



1. ANTECEDENTES

Se presenta el siguiente informe respondiendo a la cotización solicitada por Santiago Verdugo, de la empresa Prorganik SpA.

Se recibe una muestra de desinfectante líquido (5 L) que fue recepcionada e ingresada a laboratorio con fecha 10 de noviembre del 2017.

Posteriormente, la muestra fue diluida para la realización de las pruebas solicitadas.

2. OBJETIVOS

- 1) Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) del producto desinfectante en la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).
- 2) Determinación de la dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante en la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).
- 3) Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).
- 4) Determinación de la dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

METODOLOGÍA

3.1. Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante en la cepa *Clostridium sp. (C. Perfringens, C. Difficile)*.

La dilución mínima inhibitoria o CMI se definió como la menor concentración del producto desinfectante que inhibe el crecimiento del microorganismo estudiado.

Para la determinación de la CMI se utilizó el método modificado de macrodilución en caldo (NCCLS, 2000). Para determinar la CMI del producto desinfectante sobre *Clostridium sp.*, se cargó el producto desinfectante concentrado (100%) en el medio de cultivo líquido para Clostridios (extracto de carne 10.0; Peptona 10.0; extracto de levadura 3.0; D(+) Glucosa 5.0; almidón 1.0; cloruro de sodio 5.0; acetato de sodio 3.0; cisteína 0.5; Agar-agar 0.5 (g/litro):), diluyéndolo al 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5 % v/v en tubos de ensayo, usando como control negativo tubos sin adición del producto desinfectante y como control positivo tubos sin inocular, todos en triplicado.

Se preparó el inóculo de la cepa, a partir de una suspensión de 0,5 McFarland con el cual se inocularon los tubos, incubándolos a 30-35°C por 48 h. Luego de la incubación, el crecimiento bacteriano fue identificado por turbidez, y la interpretación del resultado fue facilitada tomando como referencia el crecimiento observado y comparando con los tubos usados como control positivo y negativo.

Determinada la CMI del producto desinfectante se procedió a determinar la dilución mínima bactericida (CMB). La CMB se definió como la menor concentración de producto desinfectante a la cual no fue posible detectar crecimiento o turbidez, producto de la actividad bactericida de compuesto.

Para la determinación de la CMB se utilizó el método modificado de macrodilución en caldo (NCCLS, 2000). Para determinar la CMB del producto desinfectante sobre *Clostridium sp.*, se realizó un subcultivo a partir de los mismos tubos con medio ensayados para la CMI, en nuevo medio de cultivo sin producto desinfectante, evaluando la actividad bactericida. Para esto, se inocularon tubos de ensayo con medio de cultivo líquido para Clostridios con un volumen provenientes del tubo a concentración CMI como de los tubos con concentración mayor de producto desinfectante, en los cuales no se observó crecimiento o turbidez. Estos tubos fueron incubados a 30-35°C por 48 h, luego de la

incubación, el crecimiento bacteriano fue identificado por turbidez, comparando los tubos incubados con tubos control negativo y positivo. Este ensayo fue realizado en triplicado.

3.2. Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa *Clostridium sp.* (*C. Perfringens, C. Difficile*).

El ensayo de formación específica de biopelículas, en adelante SBF, fue realizado según lo descrito por Niu y Gilbert (2004). Este índice relaciona la capacidad de adherencia de los microorganismos o formación de biopelículas con la concentración celular en fase planctónica, normalizando el efecto entre crecimiento y adherencia frente a diferentes diluciones del producto desinfectante. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, donde diferentes pocillos en triplicado fueron cargados con medio de cultivo líquido para Clostridios e inoculados con la cepa, agregando el producto desinfectante diluido a concentración final de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.25 y 1.5 % v/v. Para evaluar el efecto de los factores abióticos (control negativo) se usaron pocillos cargados solo con medio de cultivo, y como control positivo se usaron pocillos con caldo de cultivo inoculado solo con *Clostridium sp.* las microplacas fueron incubadas a 30-35°C por 48 hrs.

Una vez concluida la incubación, una de las microplacas fue tratada, midiéndose la densidad óptica del crecimiento en fase resuspendida a 600 nm (OD_{600}). Los pocillos fueron lavados e incubados con cristal violeta, hasta teñir la biopelícula formada, posteriormente, los pocillos fueron lavados solubilizando el cristal violeta adherido con etanol, para posteriormente medir esta solución a una densidad óptica de 570 nm (OD_{570}).

La formación de la biopelícula fue normalizada con respecto al crecimiento en fase planctónica, y el SBF fue determinado usando la ecuación descrita por Niu y Gilbert (2004).

$SBF = B - NC/G$, donde SBF es el índice específico de formación de biopelículas, B es la OD_{570} de las células adheridas y teñidas relacionada con la biopelícula formada, NC es la OD_{570} de los pocillos control solo con caldo de cultivo libre de bacterias relacionado con la cantidad de cristal violeta adherido a la microplaca por factores abióticos, G es la OD_{600} de las células cultivadas en caldo de cultivo relacionada con el crecimiento bacteriano en la fase planctónica.



Cada ensayo fue realizado en triplicado (Niu y Gilber, 2004), las lecturas de OD fueron realizadas en el lector de microplacas Infinite F200 PRO (TECAN).

Los resultados fueron expresados con respecto al control, siendo analizados estadísticamente (ANOVA de una vía, alfa: 0,05). La CMI en la formación específica de biopelículas fue considerada como la dilución del producto desinfectante que presentó una disminución significativa en la formación específica de biopelículas de *Clostridium sp.*

Obtenida la CMI del producto desinfectante se procedió a determinar la dilución mínima bactericida (CMB) en la formación de biopelículas. La CMB se definió como la menor concentración de producto desinfectante a la cual se inhibió la formación de biopelículas, producto de la actividad bactericida de compuesto.

Para esto, se utilizó una segunda microplaca inoculada e incubada en las mismas condiciones anteriores, desde la cual se tomó un inóculo del sobrenadante de los pocillos a la CMI y a las concentraciones mayores que también inhibieron el desarrollo de la biopelícula con respecto al control, siendo incubado en una microplaca que fue cargada solo con cultivo líquido para Clostridios (100 µl) sin producto desinfectante. Esta placa fue incubada a 30-35°C por 48 h. Luego de la incubación, el desarrollo de biopelículas fue analizado de la misma manera ya detallada.

RESULTADOS

4.1. Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante sobre crecimiento en fase planctónica de la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

En la tabla 1, se observa que a la concentración de 1,5 % del producto desinfectante, tres de los tres tubos inoculados no mostraron turbidez o crecimiento en fase planctónica de la cepa ensayada *Clostridium* sp., lo que define a esta concentración como la CMI o dilución mínima inhibitoria a la cual el producto desinfectante inhibe el crecimiento de la cepa ensayada.

Tabla 1. Resultado cualitativo del ensayo de dilución mínima inhibitoria (CMI) de diferentes concentraciones del desinfectante en fase resuspendida de la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

Dilución desinfectante (%)	Crecimiento fase resuspendida		
	1	2	3
0	+	+	+
1,5	-	-	-
3,125	-	-	-
6,25	-	-	-
12,5	-	-	-
25	-	-	-
50	-	-	-

+ crecimiento positivo o turbidez detectado en el tubo inoculado; - crecimiento negativo o sin turbidez detectado en el tubo inoculado.

La tabla 2 muestra que a la concentración de 6,25 % del producto desinfectante, tres de los tres tubos inoculados no mostraron turbidez o crecimiento en fase planctónica de la cepa ensayada *Clostridium* sp., lo que define a esta concentración como la CMB o dilución mínima bactericida a la cual el producto desinfectante presenta actividad bactericida sobre la cepa ensayada.

Tabla 2. Resultado cualitativo del ensayo de dilución mínima bactericida (CMB) de diferentes concentraciones del desinfectante en fase resuspendida de la cepa *Clostridium* sp. (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

Dilución desinfectante (%)	Crecimiento fase resuspendida		
	1	2	3
0	+	+	+
1,5	+	+	+
3,125	+	+	+
6,25	-	-	-
12,5	-	-	-
25	-	-	-
50	-	-	-

+ crecimiento positivo o turbidez detectado en el tubo inoculado; - crecimiento negativo o sin turbidez detectado en el tubo inoculado.

4.2. Determinación de la dilución mínima inhibitoria (CMI) y dilución mínima bactericida (CMB) del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa *Clostridium sp.* (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

La tabla 3 y el Figura 1, muestran que a la concentración de 6.25, 12.5, 25 y 50 % del producto desinfectante se genera una disminución significativa de la formación específica de la biopelícula o índice SBF con respecto al control, lo que define a la concentración de 6.25% como la CMI o dilución mínima inhibitoria a la cual el producto desinfectante inhibe la formación de biopelículas de la cepa ensayada.

Tabla 3. Resultado cuantitativo del ensayo de dilución mínima inhibitoria (CMI) de diferentes concentraciones del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa *Clostridium sp.* (*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

Dilución desinfectante (%)	Crecimiento Fase Biopelículas				
	SBF	SBF	SBF	Prom	DE
0	2,3	2,21	2,65	2,39	0,232
1,5	1,76	1,57	1,72	1,68	0,1
3,125	1,59	1,45	1,65	1,56	0,102
6,25	0,75	0,72	0,56	0,68	0,102
12,5	0,65	0,61	0,59	0,62	0,031
25	0,46	0,51	0,4	0,46	0,055
50	0,57	0,73	0,71	0,67	0,087

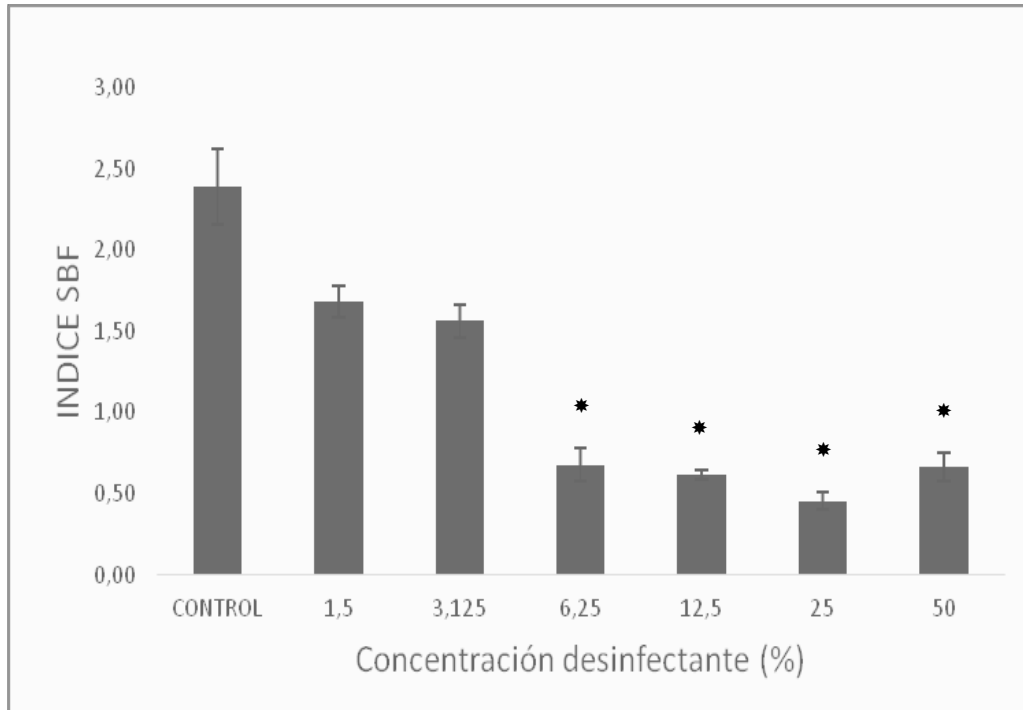


Figura 1. Resultado cuantitativo del ensayo de dilución mínima inhibitoria (CMI) de diferentes concentraciones del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (índice SBF) de la cepa *Clostridium sp.* * diferencia significativa con respecto al control.

La tabla 4 y el Figura 2, muestra que a la concentración de 12.5, 25 y 50 % del producto desinfectante se genera una disminución significativa de la formación específica de la biopelícula (índice SBF) con respecto al control, lo que define a la concentración de 12.5% como dilución mínima bactericida (CMB) a la cual el producto desinfectante logra disminuir significativamente la formación de biopelículas de la cepa ensayada.

Tabla 4. Resultado cuantitativo del ensayo de dilución mínima bactericida (CMB) de diferentes concentraciones del producto desinfectante en la formación específica de biopelículas (SBF) de la cepa *Clostridium sp*(*C. Perfringens*, *C. Difficile*).

Dilución desinfectante (%)	Crecimiento Fase Biopelículas				
	SBF	SBF	SBF	Prom	DE
0	2,1	1,85	1,92	1,96	0,129
6,25	1,75	1,52	1,55	1,61	0,125
12,5	0,2	0,17	0,05	0,14	0,079
25	0,15	0,11	0,03	0,10	0,061
50	0,22	0,09	0,16	0,16	0,065

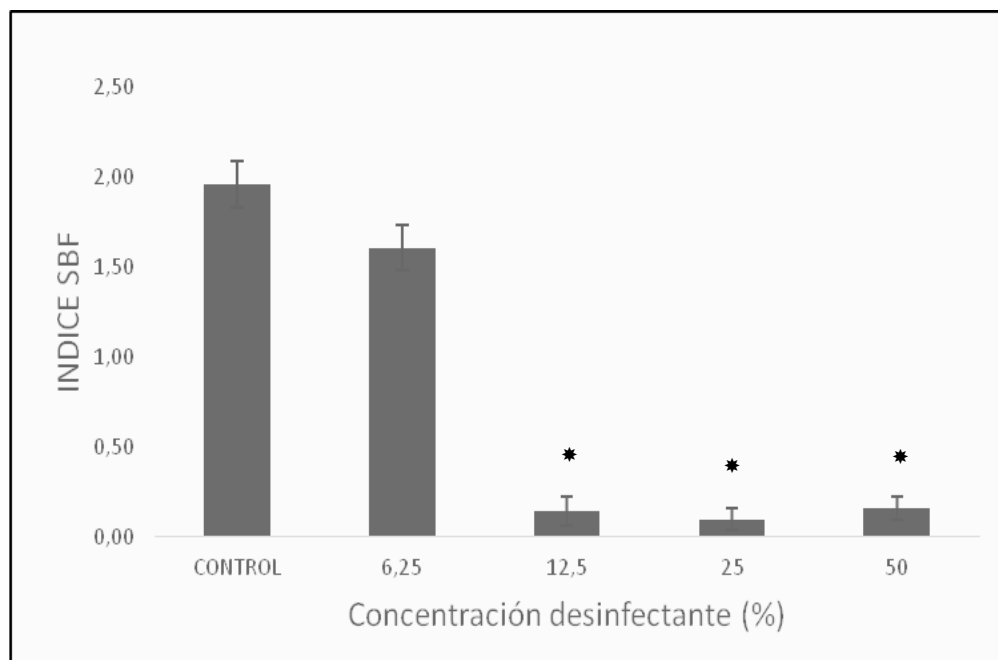


Figura 2. Resultado cuantitativo del ensayo de dilución mínima bactericida (CMB) de diferentes concentraciones del producto desinfectante (eje X) en la formación específica de biopelículas o índice SBF (eje Y) de la cepa *Clostridium sp.* * diferencia significativa con respecto al control.

En la tabla 5, se aprecia el resumen de resultados obtenidos con los diversos ensayos (se indica metodología), en esta se aprecian los índices CMI y CMB para *Clostridium* en contacto con el desinfectante líquido proporcionado por la empresa Prorganik SpA, resultados que se describen en los apartados anteriores tanto para cultivos en fase planctónica como en biopelículas.

Tabla 5. Resumen resultados del ensayo.

N°	Análisis	Resultado	Metodología	Fecha ensayo
1	Dilución mínima inhibitoria del desinfectante en fase re-suspendida cepa <i>Clostridium</i> sp.	1,5 %	Modificado de macrodilución en caldo (NCCLS, 2000)	17/11/2017
2	Dilución mínima bactericida del desinfectante en fase resuspendida cepa <i>Clostridium</i> sp	6,25 %	Modificado de macrodilución en caldo (NCCLS, 2000)	24/11/2017
3	Dilución mínima inhibitoria del desinfectante en fase biopelícula cepa <i>Clostridium</i> sp.	6,25 %	Formación específica de biopelículas SBF (Niu and Gilbert, 2004).	01/12/2017
4	Dilución mínima bactericida del desinfectante en fase biopelícula cepa <i>Clostridium</i> sp.	12,5 %	Formación específica de biopelículas SBF (Niu and Gilbert, 2004).	07/12/2017



REFERENCIAS

1. Adrián Camacho-Ortiz, Alfredo Ponce-de-León y José Sifuentes-Osornio. (2009). Enfermedad asociada a Clostridium difficile en América Latina. Artículo de revisión.
2. Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI).
3. Fred C. Tenover, Ellen Jo Baron, Lance R. Peterson, and David H. Persing.(2011) Review: Laboratory Diagnosis of Clostridium difficile Infection Can Molecular Amplification Methods Move Us Out of Uncertainty?. The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 13, No. 6.
4. Jhon Walter Zea y Clara Lina Salazar. (2012). Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. Infectio. 2012;16(4):211–222pp..
5. NCCLS (2000) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard- Fifth Edition. NCCLS document M7-A5. NCCLS: Wayne, Pennsylvania.
6. Niu C. and Gilbert E. (2004) Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. Applied and Environmental Microbiology 70(12): 6951-6956.