

Actividad y eficacia antibacteriana de Liquid Guard® provisto Dornoch

1. GENERALIDADES

Cliente: Dornoch - Soface

Identificación del ensayo: DA207229A

Material a ensayar: Liquid Guard®

Muestra: Superficies de vidrio tratadas y sin tratar

Norma de ensayo: JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012 Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity

Fecha de inicio del ensayo: 2-7-2020

Fecha de informe: 10-7-2020

2. OBJETIVO DEL ENSAYO

Evaluar la efectividad antimicrobiana *in vitro* de **Liquid Guard®** (LG) frente a *Acinetobacter baumannii* multirresistente siguiendo las especificaciones de la norma JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012.

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Inóculos microbianos:

El cultivo microbiano utilizado fue:

- *Acinetobacter baumannii* multirresistente (aislamiento hospitalario de la colección de cultivos de Stambouliau)

Se preparó un inóculo inicial de $5,0 \times 10^5$ UFC/ml para utilizar en el ensayo.

3.2 Preparación de la muestra:

Se utilizó para el ensayo superficies de vidrio de 5 x 5 cm (25 cm²) sin tratamiento (control) y tratadas con LG según indicaciones del cliente. Previo al inicio del ensayo las superficies se limpiaron con alcohol 70°. Para cubrir el inóculo bacteriano se utilizó film de 4 x 4 cm (16cm²) estéril.

3.3 Ensayo:

Se inocularon 6 muestras control y 3 tratadas con LG con 400 ul de la suspensión de *K. pneumoaniae*.

Las muestras control se lavaron inmediatamente con 10 ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento inicial (N₀).

Las seis muestras restantes (3 tratadas y 3 sin tratar) se incubaron a $35\pm 1^\circ\text{C}$ con 90-95% humedad durante $24\pm 1\text{h}$.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con 10ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento (N_1).

Condiciones del ensayo:

Tamaño de la muestra	25 cm ²
Tamaño del film	16 cm ²
Volumen inoculado	400 ul
Limpieza de la muestra	Alcohol 70°

Cálculo de la actividad antibacteriana:

$$R \text{ (actividad antibacteriana)} = U_1 - A_1$$

Donde U_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la superficie sin tratar luego de la incubación y A_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la superficie tratada luego de la incubación.

Cálculo del % de Eficacia:

$$\% \text{ de Eficacia} = (N_{1a} - N_{1b}) \times 100 / N_{1a}$$

Donde N_{1a} es el recuento de microorganismos viables en la muestra sin tratar y N_{1b} el recuento de microorganismos viables en la muestra tratada.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Muestra	N_0	N_1	U_1	A_1	R	% Eficacia
Control	$3,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	6,40	----	----	----
LG	----	$1,0 \times 10^4$	----	4,00	2,4	99,6

5. CONCLUSIONES

Se observó una actividad antibacteriana de 2,4 a las 24hs de exposición.

Estos resultados confirman que la muestra ensayada posee una eficacia antibacteriana del 99,6% frente a *Acinetobacter baumannii* multirresistente.



Adriana Sucari
Directora Técnica
Bioquímica - MN 6674

Actividad y eficacia antibacteriana de Liquid Guard® provisto Dornoch

1. GENERALIDADES

Cliente: Dornoch - Soface

Identificación del ensayo: DA207230

Material a ensayar: Liquid Guard®

Muestra: Superficies de vidrio tratadas y sin tratar

Norma de ensayo: JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012 Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity

Fecha de inicio del ensayo: 2-7-2020

Fecha de informe: 17-7-2020

2. OBJETIVO DEL ENSAYO

Evaluar la efectividad antimicrobiana *in vitro* de **Liquid Guard®** (LG) frente a *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC a tiempos 1h, 4h y 8h, siguiendo las especificaciones de la norma JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012.

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Inóculos microbianos:

El cultivo microbiano utilizado fue:

- *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC (aislamiento hospitalario de la colección de cultivos de Stambouliau)

Se preparó un inóculo inicial de $3,5 \times 10^5$ UFC/ml para utilizar en el ensayo.

3.2 Preparación de la muestra:

Se utilizó para el ensayo superficies de vidrio de 5 x 5 cm (25 cm²) sin tratamiento (control) y tratadas con LG según indicaciones del cliente. Previo al inicio del ensayo las superficies se limpiaron con alcohol 70°. Para cubrir el inóculo bacteriano se utilizó film de 4 x 4 cm (16cm²) estéril.

3.3 Ensayo:

Se inocularon 4 muestras control y 3 tratadas con LG con 400 ul de la suspensión de *K. pneumoaniae*.

Una muestra control se lavó inmediatamente con 10 ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento inicial (N₀).

Las seis muestras restantes (3 tratadas y 3 sin tratar) se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ con 90-95% humedad. Las incubaciones para un par de muestras (una control y una tratada) se concluyeron a la hora, para otro par de muestras a las 4h y para el tercer par de muestras a las 8h.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con 10ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento (N_1).

Condiciones del ensayo:

Tamaño de la muestra	25 cm ²
Tamaño del film	16 cm ²
Volumen inoculado	400 ul
Limpieza de la muestra	Alcohol 70°

Cálculo de la actividad antibacteriana:

$$R \text{ (actividad antibacteriana)} = U_1 - A_1$$

Donde U_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la superficie sin tratar luego de la incubación y A_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la superficie tratada luego de la incubación.

Cálculo del % de Eficacia:

$$\% \text{ de Eficacia} = (N_{1a} - N_{1b}) \times 100 / N_{1a}$$

Donde N_{1a} es el recuento de microorganismos viables en la muestra sin tratar y N_{1b} el recuento de microorganismos viables en la muestra tratada.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Muestra	N_0	N_1	U_1	A_1	R	% Eficacia
Control 1h	$7,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	4,26	----	----	----
LG 1h	----	$6,1 \times 10^3$	----	3,79	0,47	66,1
Control 4h	$7,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	4,32	----	----	----
LG 4h	----	$1,8 \times 10^3$	----	3,26	1,06	91,4
Control 8h	$7,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	4,54	----	----	----
LG 8h	----	$2,7 \times 10^2$	----	2,43	2,11	99,2

5. CONCLUSIONES

Se observó una actividad antibacteriana de 0,47 log a la hora, de 1,06 log a las 4 horas y de 2,11 log a las 8 horas de contacto frente a *Klebsiella pneumoniae* KPC

Estos resultados confirman que la muestra ensayada posee una eficacia antibacteriana mayor al 90% a las 4h y del 99,2% a las 8h frente a *Klebsiella pneumoniae* KPC.



Adriana Sucari
Directora Técnica
Bioquímica - MN 6674

Actividad y eficacia antibacteriana de Liquid Guard® provisto Dornoch

1. GENERALIDADES

Cliente: Dornoch - Soface

Identificación del ensayo: DA207229A

Material a ensayar: Liquid Guard®

Muestra: Superficies de vidrio tratadas y sin tratar

Norma de ensayo: JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012 Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity

Fecha de inicio del ensayo: 2-7-2020

Fecha de informe: 10-7-2020

2. OBJETIVO DEL ENSAYO

Evaluar la efectividad antimicrobiana *in vitro* de **Liquid Guard®** (LG) frente a *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC siguiendo las especificaciones de la norma JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012.

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Inóculos microbianos:

El cultivo microbiano utilizado fue:

- *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC (aislamiento hospitalario de la colección de cultivos de Stambouliau)

Se preparó un inóculo inicial de $1,0 \times 10^5$ UFC/ml para utilizar en el ensayo.

3.2 Preparación de la muestra:

Se utilizó para el ensayo superficies de vidrio de 5 x 5 cm (25 cm²) sin tratamiento (control) y tratadas con LG según indicaciones del cliente. Previo al inicio del ensayo las superficies se limpiaron con alcohol 70°. Para cubrir el inóculo bacteriano se utilizó film de 4 x 4 cm (16cm²) estéril.

3.3 Ensayo:

Se inocularon 6 muestras control y 3 tratadas con LG con 400 ul de la suspensión de *K. pneumoaniae*.

Las muestras control se lavaron inmediatamente con 10 ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento inicial (N₀).

Las seis muestras restantes (3 tratadas y 3 sin tratar) se incubaron a $35\pm 1^\circ\text{C}$ con 90-95% humedad durante $24\pm 1\text{h}$.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con 10ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento (N_1).

Condiciones del ensayo:

Tamaño de la muestra	25 cm ²
Tamaño del film	16 cm ²
Volumen inoculado	400 ul
Limpieza de la muestra	Alcohol 70 ^o

Cálculo de la actividad antibacteriana:

$$R \text{ (actividad antibacteriana)} = U_1 - A_1$$

Donde U_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la superficie sin tratar luego de la incubación y A_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la superficie tratada luego de la incubación.

Cálculo del % de Eficacia:

$$\% \text{ de Eficacia} = (N_{1a} - N_{1b}) \times 100 / N_{1a}$$

Donde N_{1a} es el recuento de microorganismos viables en la muestra sin tratar y N_{1b} el recuento de microorganismos viables en la muestra tratada.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Muestra	N_0	N_1	U_1	A_1	R	% Eficacia
Control	7.2×10^4	6.7×10^5	5,82	----	----	----
LG	----	5.9×10^3	----	3,77	2,05	99,2

5. CONCLUSIONES

Se observó una actividad antibacteriana de 2,05 log a las 24hs de exposición.

Estos resultados confirman que la muestra ensayada posee una eficacia antibacteriana del 99,2% frente a *Klebsiella pneumoniae* KPC.



Adriana Sucari

Directora Técnica Bioquímica - MN 6674

Actividad y eficacia antibacteriana de Liquid Guard® provisto Dornoch

1. GENERALIDADES

Cliente: Dornoch - Soface

Identificación del ensayo: DA205920

Material a ensayar: Liquid Guard®

Muestra: Superficies de Acero Inoxidable

Norma de ensayo: JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012 Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity

Fecha de inicio del ensayo: 19-6-2020

Fecha de informe: 2-7-2020

2. OBJETIVO DEL ENSAYO

Evaluar la efectividad antimicrobiana *in vitro* de **Liquid Guard®** (LG) frente a dos géneros bacterianos, uno gram negativo y otro gram positivo siguiendo las especificaciones de la norma JIS Z 2801:2010 Amendment 1-2012.

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Inóculos microbianos:

Los cultivos microbianos utilizados son:

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se preparó un inóculo inicial de $5,0 \times 10^5$ UFC/ml para utilizar en el ensayo.

3.2 Preparación de la muestra:

Se utilizó para el ensayo superficies de acero inoxidable de 5 x 5 cm (25 cm²) sin tratamiento (control) y tratadas con LG según indicaciones del cliente. Previo al inicio del ensayo las superficies se limpiaron con alcohol 70°. Para cubrir el inóculo bacteriano se utilizó film de 4 x 4 cm (16cm²) estéril.

3.3 Ensayo:

Se inocularon 6 muestras control y 3 tratadas con LG con 400 ul de la suspensión de *E. coli* y 6 muestras control y 3 tratadas con LG con 400 ul de la suspensión de *S. aureus*. Se cubrieron con film.

Tres de las muestras control de cada microorganismo se lavaron inmediatamente con 10 ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento inicial (N_0).

Las seis muestras restantes (3 tratadas y 3 sin tratar) de cada microorganismo se incubaron a 35 ± 1 con 90-95% humedad durante 24 ± 1 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con 10ml de caldo, se realizaron diluciones y cultivo para evaluar el recuento (N_1).

Condiciones del ensayo:

Tamaño de la muestra	25 cm ²
Tamaño del film	16 cm ²
Volumen inoculado	400 ul
Limpieza de la muestra	Alcohol 70°

Cálculo de la actividad antibacteriana:

$$R \text{ (actividad antibacteriana)} = U_1 - A_1$$

Donde U_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la muestra sin tratar luego de la incubación y A_1 es el \log_{10} de las UFC obtenidas en la muestra tratada luego de la incubación.

Cálculo del % de Eficacia:

$$\% \text{ de Eficacia} = (N_{1a} - N_{1b}) \times 100 / N_{1a}$$

Donde N_{1a} es el recuento de microorganismos viables en la muestra sin tratar y N_{1b} el recuento de microorganismos viables en la muestra tratada.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1 Resultados con *E. coli*:

Muestra	N_0	N_1	U_1	A_1	R	% Eficacia
Control	$3,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	6,26	----	----	----
LG	----	$8,7 \times 10^3$	----	3,94	2,32	99,5

4.2 Resultados con *S. aureus*

Muestra	N_0	N_1	U_1	A_1	R	% Eficacia
Control	$6,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	6,40	----	----	----
LG	----	$2,1 \times 10^4$	----	4,32	2,08	99,2

5. CONCLUSIONES

Se observó una actividad antibacteriana de 2,08 log frente a *S. aureus* y 2,32 log frente a *E. coli* a las 24hs de exposición.

Estos resultados confirman que la muestra ensayada posee una eficacia antibacteriana del 99% frente a bacterias gram negativas y gram positivas.



Adriana Sucari
Directora Técnica
Bioquímica - MN 6674



INFORME DE RESULTADOS

FECHA: **17/07/2020**
NUMERO DE PROTOCOLO: **PVA 2810**
SOLICITANTE: **DORNOCH – Andres Morano**
ANALISIS SOLICITADO: **EVALUACION DE LA INACTIVACIÓN VIRAL POR CONTACTO**
Producto para recubrimiento de superficies

Se evaluó la capacidad de inactivación viral por contacto directo del producto LIQUID GUARD (lote/número de serie no especificado), nano-revestimiento antimicrobial de superficie de la empresa DORNOCH sobre el Coronavirus canino (CCoV).

Se realizaron ensayos de contaminación experimental siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 21702:2019 para evaluación de actividad antiviral de plásticos y otras superficies no porosas.

El proceso se realizó de acuerdo al plan de trabajo acordado entre DORNOCH e INTA (“DORNOCH inactivación viral por contacto 28.06.2020”). El ensayo se llevó a cabo y fue verificado por personal del laboratorio de Virus Adventicios del Instituto de Virología de INTA.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO.

Se trataron portaobjetos de vidrio de 7,5 cm x 2,5 cm con el revestimiento en estudio de acuerdo a las indicaciones dadas por DORNOCH. Estas áreas de estudio tratadas, se contaminaron con 300 ul de una suspensión de CCoV y se dejaron en contacto a temperatura ambiente y humedad controlada por 8 hs. A distintos tiempos durante el periodo de incubación se recuperó el virus lavando las áreas de ensayos con 10 ml de medio neutralizante. Portaobjetos de vidrio sin revestimiento fueron contaminadas con 300 ul de CCoV para evaluar la posible inactivación viral sin tratamiento. Areas de trabajo con el tratamiento en estudio fueron inoculadas con medio de cultivo, y analizadas para verificar la ausencia de efecto tóxico o de interferencia sobre los sustratos celulares utilizados. Una fracción del stock viral original de CCoV utilizado en la contaminación experimental fue ensayada simultáneamente con el resto de las muestras. La Tabla 1 sintetiza las condiciones técnicas del procedimiento, volúmenes y muestras tomadas. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (18-25°C) en una cabina de seguridad biológica de tipo A2 certificada.

Tabla 1. Esquema del proceso de contacto. Todas las condiciones fueron evaluadas por triplicado.

<i>Condición a evaluar</i>	<i>Muestra</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>ID Muestras</i>	<i>Momento de toma de la muestra</i>
Control citotoxicidad	Superficie tratada con nano-recubrimiento LIQUID GUARD	Inoculación con 300 ul de medio de cultivo. Incubar a temperatura ambiente y humedad controlada.	ORI	8 hs post-contacto
Propiedad antiviral	Superficie tratada con nano-recubrimiento LIQUID GUARD	Inoculación con 300 ul de suspensión viral. Incubar a temperatura ambiente y humedad controlada.	T.1	1 hs post-contacto
			T.4	4 hs post-contacto
			T.8	8 hs post-contacto
Control no tratado	Superficie sin tratamiento	Inoculación con 400 ul de suspensión viral.	C.0	Inmediatamente post-contacto



INFORME DE RESULTADOS

		Incubar a temperatura ambiente y humedad controlada.	C.1	1 hs post-contacto
			C.4	4 hs post-contacto
			C.8	8 hs post-contacto
Control virus	Stock viral original	N/A	VIRUS	Antes del inicio del proceso

Se determinó la infectividad viral en cada una de las muestras tomadas por ensayos de titulación viral por dosis infecciosas 50% en cultivo de tejidos (TCID₅₀), utilizando el estimador estadístico de Reed y Muench (por duplicado). Se utilizaron como células indicadoras la línea CRFK.

Se realizó el cálculo de la actividad antiviral (A) de acuerdo a la fórmula:

$$A = C - T = \log_{10} [\text{concentración viral en superficie no tratada (C)}] - \log_{10} [\text{concentración viral en superficie tratada (T)}]$$

RESULTADOS

Ensayo de contaminación: EVA 14902

Ensayo de titulación EVA 14903 y EVA 14911

Tabla 2. Log del título viral promedio (TCID₅₀/ml) de cada una de las muestras tomadas durante el ensayo. IC95%: intervalo de confianza 95%.

Muestra	ID Muestras	Título viral (log TCID₅₀ ± IC95%)	Actividad antiviral (A)
Control citotoxicidad	ORI	no detectado	-
Propiedad antiviral	T.1	5,98 ±0,28	0,33
	T.4	5,09 ±0,39	1,72
	T.8	4,14 ±0,43	2,56
Control no tratado	C.0	6,81 ±0,22	-
	C.1	6,31 ±0,10	-
	C.4	6,81 ±0,44	-
	C.8	6,70 ±0,38	-
Control virus	VIRUS	6,42 ±0,29	-

- La muestra correspondiente al medio de cultivo en contacto con el área tratada con el revestimiento, así como las muestras tomadas durante todo el ensayo demostraron no ser citotóxicas cuando fueron inoculadas puras y diluidas 1/10 sobre las monocapa de células de la línea CRFK, ya que no se observó desadherencia, redondeamiento, lisis, depósito o precipitado. El límite de detección (LD) de la técnica se determinó en 10^{2.50} TCID₅₀/ml.
- No se observó reducción de la infectividad viral en la suspensión del CCOV en contacto con la superficie no tratada durante todo el periodo de contacto de 8 hs.



INSTITUTO DE VIROLOGIA
Centro de investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA

INFORME DE RESULTADOS

- Se observó una actividad antiviral por contacto de las áreas en estudio tratadas con el revestimiento LIQUID GUARD frente al CCoV de 0,33 log luego de 1 h de contacto, de 1,72 log luego de 4 h de contacto y de 2,56 log luego de 8 hs de contacto.

NOTA:

El valor de actividad antiviral puede ser usada para caracterizar la efectividad del agente antiviral. El valor de actividad antiviral utilizado para definir la efectividad debe ser acordado.

Los resultados emitidos en este informe se aplican a las muestras recibidas en el laboratorio exclusivamente utilizando el virus CCoV.

Todos los registros de ensayo originales se encuentran disponibles en el laboratorio de Virus Adventicios del Instituto de Virología del INTA, bajo el código interno PVA2810.

Dra. Irene Alvarez
Laboratorio de Virus Adventicios - Instituto de Virología - INTA