

Nº expediente SDGSISTTER:	0320004292NBQPENS	Nº Expediente Departamento:	NBQ20200183
Código del documento:	Informe de ensayo nº NBQ20200183-02-Mod 1		
Título del documento:	EVALUACIÓN DEL EFECTO VIRUCIDA Y BACTERICIDA DE UNA LUMINARIA DE LUZ UVC SOBRE EL BACTERIÓFAGOMS2 Y LA BACTERIA <i>Escherichia coli</i>		

Cliente:

Cliente:	SUTELCO S. A.
Dirección:	Calle Pilar de Zaragoza, 23 28028 Madrid
Datos POC Cliente (nombre / correo / tfno)	Gonzalo Guerrero Prado Teléfono: 913558603/02/01 e-mail: gonzalo@sutelco.com



SUBDIRECCIÓN GENERAL
DE SISTEMAS TERRESTRES

Emisor del documento:

Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial

Subdirección General de Sistemas Terrestres

Departamento de Sistemas de Defensa NBQ

Área de Defensa Biológica

POC de la SDGSISTTER Tcol Juan Carlos Cabria Ramos (911742229)

	Nombre /Responsabilidad	Firma	Fecha
Realizado por:	Matilde Gil García		
Director Técnico:	Paloma Lorenzo Lozano		
Aprobado por:	Juan Carlos Cabria Ramos		
Visado por:	Responsable Calidad Departamento	P.A.	

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



ÍNDICE

1. Objeto	3
2. Antecedentes	3
3. Muestras, Objetos e ítems recibidos	4
4. Procedimientos de ensayo / Normativa	5
4.1. Selección del material biológico	5
4.2. Medios de cultivo y reactivos.....	6
4.3. Equipos utilizados	7
4.4. Preparación de los microorganismos de ensayo	8
4.5. Desarrollo de los ensayos	10
5. Fechas de ejecución de los ensayos	10
6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable)	10
7. Resultados obtenidos	13
7.1. Evaluación del efecto viricida de la luz UVC.....	13
7.2. Evaluación del efecto bactericida de la luz UVC.....	17
8. Declaración de conformidad (cuando proceda)	23
9. Resumen, opiniones, interpretaciones.....	23
9.1. Reducción de la infectividad del bacteriófago	23
9.2. Reducción de la viabilidad bacteriana	23
10. Anexos	24
10.1. Anexo 1. Recuento de unidades formadoras de placa de la suspensión inicial de bacteriófago.....	24
10.2. Anexo 2. Recuento de unidades formadoras recuperadas en el control positivo de bacteriófago MS2.....	24
10.3. Anexo 3. Recuento de unidades formadoras de placa recuperadas de las muestras de bacteriófago MS2 expuestas a luz UVC.....	24
10.4. Anexo 4. Recuento de unidades formadoras de colonia en el control positivo de <i>Escherichia coli</i>	25
10.5. Anexo 5. Recuento de unidades formadoras de colonia en las muestras de <i>Escherichia coli</i> expuestas a luz UVC.....	25
10.6. Anexo 6. Bibliografía.....	26



1. Objeto

El objeto del presente informe es la evaluación de la actividad viricida y bactericida de una luminaria de la empresa Gealed suministrada por Sutelco S. A., sobre el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli*.

2. Antecedentes

Con fecha 15 de septiembre de 2020, por parte de la empresa Sutelco S. A., se solicitó, al Área de Defensa Biológica, la realización de diferentes ensayos para evaluar la actividad viricida y bactericida de una luminaria LED para su uso en ambientes de interior.

La radiación UVC es el tipo de radiación ultravioleta que se sitúa en un intervalo de longitudes de onda de 280 a 200 nanómetros. La radiación UVC es también producida por el sol, al igual que la UV-A (400 a 315 nm) y la UV-B (315 a 280 nm). La UVC es la longitud de onda ultravioleta más corta y se filtra casi por completo al pasar por la estratosfera (capa de ozono), antes de llegar a la superficie terrestre. Por tanto, las personas están muy poco o nada expuestas a ella de manera natural. Cuanto más corta es la longitud de onda, más impacto podría tener la radiación ultravioleta en la salud humana. Sin embargo, la UVC producida artificialmente se ha utilizado con éxito como germicida y bactericida durante décadas. Puede matar microorganismos, como bacterias, virus y otros patógenos, o impedir su desarrollo, y proporciona una alternativa a otros métodos de desinfección en los que se emplean sustancias químicas. Debido a su efectividad y a sus ventajas, la UVC se está utilizando en una gama de aplicaciones cada vez mayor. Se utiliza, por ejemplo, para la desinfección en estaciones depuradoras de aguas residuales, laboratorios, sistemas de aire acondicionado e incluso piscinas y acuarios, así como en distintas etapas de los procesos industriales de alimentos y bebidas. La UVC también se utiliza en entornos médicos y hospitalarios para la esterilización de instrumentos, superficies de trabajo y aire.

La radiación ultravioleta C es considerada una tecnología de descontaminación emergente que consiste en someter las zonas a descontaminar a iluminación con longitudes de onda que varían desde 200-280 nm, comprobándose que presenta una mayor acción germicida a emisiones entre 254 y 260 nm. La inactivación microbiana por luz ultravioleta se produce mediante la absorción directa de la energía ultravioleta por el microorganismo y una reacción fotoquímica intracelular resultante que cambia la estructura bioquímica de las moléculas (probablemente en las nucleoproteínas) que son esenciales para la supervivencia del microorganismo.

El dispositivo de irradiación, suministrado por el cliente, consiste en una plataforma cuadrada de 28 x 28 x 10,9 cm, con luces led distribuidas en una superficie de 15 x 15 cm, cubiertas por una pantalla de cuarzo y soportada sobre una estructura metálica de 1 x 1 x 2 m (figura 1).

Todas las muestras ensayadas se sometieron a la luminaria led en distintas posiciones y en las siguientes condiciones:

- Distancia a la luminaria: 0,5 y 1 m.
- Tiempo de exposición: 30 y 60 minutos.

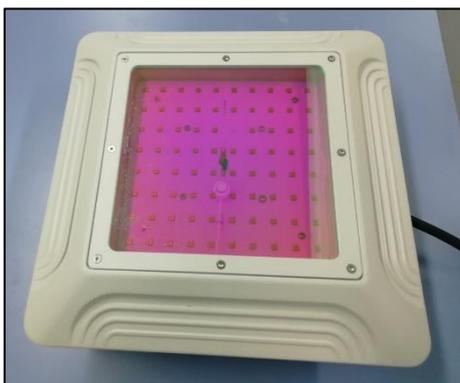


Figura 1. Dispositivo de irradiación.

Para la ejecución de los trabajos solicitados, el Área de Defensa Biológica del INTA dispone de un laboratorio con un diseño de construcción, elementos de contención, equipos y procedimientos requeridos para el trabajo con agentes biológicos pertenecientes al grupo de riesgo 2 o inferior, de acuerdo con las recomendaciones de la O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.

El personal del Área de Defensa Biológica del INTA cuenta con un plan de formación y cualificación que los capacita para manipular agentes biológicos de forma segura a través de la realización de diferentes cursos relacionados con la prevención de riesgos en el laboratorio químico-biológico y han desarrollado su actividad en el campo de la detección y diagnóstico de agresivos biológicos.

El laboratorio dispone de un sistema de gestión de residuos químicos y biológicos, que incluye formación del personal a través de cursos de Gestión de residuos tóxicos y peligrosos, lo que permite una correcta segregación y almacenamiento de los mismos. La eliminación de éstos es llevada a cabo por empresas autorizadas que ofrecen toda la garantía de no contaminar el medio ambiente, según la Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial, y el Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.

3. Muestras, Objetos e ítems recibidos

El Área de Defensa Biológica recibió la luminaria, por parte de la empresa Sutelco S. A. con las siguientes características (información suministrada por el cliente):

- Descripción de la luminaria: Plataforma cuadrada de 280 x 280 mm y una altura de 109 mm con luces led distribuidas en una superficie de 150 x 150 mm, cubiertas por una pantalla de cuarzo, con referencia IRUS NUBE UV Sterilize NUB060UVC, de 60W de potencia marca GEALD.
- Identificación del producto: Muestra compuesta por una placa led UVC de 80 leds acoplada a una carcasa blanca de aluminio ADC12.
- Longitud de onda UVC entre 250 y 300nm con un pico de emisión de 275,3nm.

A continuación, se muestra la ficha técnica de la luminaria (figura 2).



INFORMACIÓN GENÉRICA			
Chips LED	3635 UVC	Driver	MEANWELL / MOSO / o similar
Factor de potencia	>0,97	Tensión	90-305V AC ~ 50/60Hz
Desinfección	>99,99% de virus y bacterias	Material construcción	Aluminio ADC12
Apertura	120°	Cristal	Cuarzo JGF2
Temperatura de trabajo	-20°C ~ 50°C	Protección al agua / impactos	IP66
Vida	>10.000 horas		
INFORMACIÓN ESPECÍFICA		60 W	110 W
Irradiancia UVC		1158,6 mW	2124,1 mW
Tipo UVC		275 nm	275 nm
Medidas		280 x 280 x 109 mm	384 x 384 x 117 mm
Pesos		2640 g	3780 g

Figura 2. Ficha técnica de la luminaria.

4. Procedimientos de ensayo / Normativa

Para evaluar la actividad viricida de la luz UVC se calculó la reducción de la infectividad del bacteriófago a partir de las diferencias de los logaritmos de los títulos virales (unidades formadoras de placas de lisis (ufp)), antes y después del proceso de descontaminación. Esto se llevó a cabo mediante cultivo por el método de la doble capa de agar, teniendo en cuenta que cuando el bacteriófago infecta a una célula huésped, de una cepa adecuada, se producen placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa, permitiendo la detección y recuento de las mismas (norma UNE-EN ISO 10705-1).

La actividad bactericida de la luz UVC se evaluó como la reducción logarítmica de la carga bacteriana, en las placas sometidas a la luz UVC respecto a un control positivo (sin descontaminar).

4.1. Selección del material biológico

Para dar cumplimiento al trabajo solicitado se ha seleccionado el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli* pertenecientes al grupo de riesgo biológico 1 (sin riesgo o riesgo muy bajo para el individuo y la comunidad) (Real Decreto 664/1997). Para asegurar un sistema cerrado de conservación, todos los microorganismos que se van a utilizar en los ensayos proceden de una colección de cultivos tipo, minimizando su actividad genética y fisiológica, y evitando así su potencial mutación.

El bacteriófago MS2 es un virus icosaédrico, que tiene como material genético ARN de cadena sencilla, de sentido positivo que infecta a la bacteria *Escherichia coli*, que forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, y a otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. MS2 es miembro de una familia de virus bacterianos estrechamente relacionados entre los que se encuentran los bacteriófagos f2 y R17. MS2 infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F), que codifica para un "pili" el cual sirve de receptor viral. MS2 se une al "pili" a través de su proteína de maduración sencilla. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual el fago ARN se introduce en la bacteria. Las células hospedadoras del fago son lisadas (destruidas) tras la replicación y encapsulación de las partículas virales, de forma que los nuevos virus quedan libres para llevar a cabo una nueva infección, produciendo placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa.

El bacteriófago MS2 es muy resistente a la desecación, por lo que ha sido utilizado en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: "Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad viricida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria" (UNE-EN 13610:2003). "Actividad viricida para superficies inertes" (ASTM-1053:97).

La actividad viricida se va a evaluar utilizando como microorganismos de ensayo el colifago MS2 ATCC 15597-B1 conservado a 4°C en cloroformo al 0,3%. La actividad bactericida se va a evaluar utilizando la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 conservada a -80°C en glicerol al 15%. Ambos custodiados en el cepario del Área de Defensa Biológica (figura 3).

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo

MINISTERIO DE DEFENSA
INSTITUTO NACIONAL DE TÉCNICA
AEROSPAZIAL



Escherichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™)

ATCC® Number: 15597-B1™

Deposited As MS2

Strain Designations: MS2

Type Strain: no

Biosafety Level: 1

Product Format: freeze-dried

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 15597™)

ATCC® Number: 15597™

Strain Designations: C-3000

Type Strain: no

Biosafety Level: 1

Product Format: freeze-dried

Figura 3. Especificaciones del bacteriófago y de la cepa bacteriana utilizada en los ensayos.

4.2. Medios de cultivo y reactivos

Para la preparación de los medios y la uniformidad de los resultados se utilizaron componentes de calidad homologada y productos químicos de calidad analítica reconocida, o un medio completo deshidratado. Se utilizó únicamente agua destilada o agua de pureza equivalente.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

Luria Bertani Agar (LBA)

Fórmula (en g/L):

Triptona -----10,0
 Extracto de levadura-----5,0
 Cloruro sódico-----10,0
 Agar-----15,0

pH final aproximado: $7,3 \pm 0,2$. Se esteriliza en autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Luria Bertani Agar Semisólido (LBAss)

Fórmula (en g/L):

Triptona-----10,0
 Extracto de levadura-----5,0
 Cloruro sódico-----10,0
 Agar-----6,0

pH final aproximado: $7,3 \pm 0,2$. Se esteriliza en autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Caldo de Luria Bertani (LB)

Fórmula (en g/L):

Triptona-----10,0
 Extracto de levadura -----5,0
 Cloruro sódico-----10,0

pH final aproximado: $7,3 \pm 0,2$. Se esteriliza en autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.



Solución SM

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico-----5,8

Sulfato magnésico-----2,0

Se añade 5 mL de Tris-Cl 1M (pH $7,3 \pm 0,2$). Se esteriliza por filtración sobre membrana de $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Buffer Tris-Mg-Ca

10mM Tris-HCl

10mM MgSO_4

5mM CaCl_2

pH final aproximado: $7,5 \pm 0,3$. Se esteriliza por filtración sobre membrana de $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Cloruro Cálcico 0,5M

Fórmula (en g/100mL):

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 5,5

Se esteriliza por filtración sobre membrana de $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Sulfato Magnésico 1M

Fórmula (en g/100mL):

MgSO_4 -----24,6

Se esteriliza por filtración sobre membrana de $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Tris-ClH 0,5M

Fórmula (en g/500mL):

Tris -----60,57 g

Preparar 400 mL de agua destilada en una botella.

Añadir 60,57 g de Tris base

Ajustar el pH a 7,5 usando HCl

Añadir agua destilada hasta un volumen de 500 mL

pH final aproximado: $7,3 \pm 0,2$. Se esteriliza en autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

4.3. Equipos utilizados

Estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$

Incubador termostático a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación

Microondas

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



pH-metro

McFarlómetro

Tubos, para medir en McFarlómetro

Placas de Petri, ventiladas de 9 cm de diámetro

Placas de Petri, ventiladas de 5 cm de diámetro

Asa de siembra (Digiralsky)

Pipetas graduadas de 0,1 mL, 1mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL de capacidad

Pipetas Pasteur

Frascos de vidrio, de volúmenes adecuados

Tubos de cultivo, con tapa

Tubos eppendorf de 1,5 mL de capacidad

Probetas graduadas

Refrigerador, ajustado a una temperatura de $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Congelador, con control termostático a $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$

Micropipetas de diferente volumen

Puntas para micropipetas de volumen adecuado

Equipo de emisión de luz suministrado por el cliente

4.4. Preparación de los microorganismos de ensayo

4.4.1. Preparación de la suspensión del bacteriófago MS2

Se partió de una suspensión del bacteriófago, conservado a 4°C en cloroformo al 0,3%, preparado según las instrucciones que se describen en la norma UNE-EN ISO 10705-1 y de una suspensión de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 conservada a -80°C en glicerol al 15%. Antes de iniciar los ensayos se calculó el título viral del bacteriófago a utilizar. Para determinar el título viral se añadieron 20 ± 2 mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C , y se inoculó con 200 μL de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 10^8 ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo y se midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla I).

Tabla I. Correspondencia entre Concentración Bacteriana y Unidades de McFarland teóricas

Concentración Bacteriana $\times 10^8/\text{ml}$	Unidades de McFarland
1,5	0,5
3	1
6	2
9	3
12	4
15	5
18	6
21	7

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



Cuando el cultivo bacteriano llegó a la fase de crecimiento exponencial se enfrió rápidamente transfiriendo la botella a un recipiente que contenía hielo. Se hicieron diluciones seriadas, añadiendo 50 µL de una suspensión de fago conservado a 4°C en presencia de cloroformo al 0,3%, a 450 µL del buffer Tris-Mg-Ca. Se mezclaron 120 µL de cada dilución con 120 µL de la cepa hospedadora crecida hasta fase exponencial, mantenida en hielo hasta el momento de la infección, por duplicado. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para que los virus se unieran a las células hospedadoras. A continuación, se cogieron 200 µL de la mezcla, virus/célula hospedadora, y se añadieron a un tubo que contenía 3 mL de medio LBAs precalentado (45°C). Se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió el contenido sobre la superficie de una placa de Petri que contenía LBA. Se dejó solidificar y se incubó en una estufa de cultivo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales (tabla II) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = (N/d) \times 10 \text{ ufp/mL} \quad (\text{ecuación 1})$$

Siendo $N = (n_1 + 0,1n_2)/2$

n_1 : Número de placas de lisis en la dilución más alta que se puede contar

n_2 : Número de placas de lisis en la dilución anterior a la más alta que se puede contar

d : Dilución más alta que se puede contar

Tabla II: Unidades formadoras de placa de lisis a partir de la suspensión inicial del bacteriófago

Dilución	ufp	ufp
Directo	108	114
10^{-1}	53	56
10^{-2}	4	6
10^{-3}	0	0
10^{-4}	0	0
10^{-5}	0	0

Título viral suspensión inicial de bacteriófago: $1,045 \times 10^4$ ufp/mL

Esta suspensión se utilizó en los ensayos de descontaminación.

4.4.2. Preparación de la suspensión bacteriana

Para la realización de los ensayos se revitalizó la cepa bacteriana, *Escherichia coli* ATCC 15597 conservada a -80°C en glicerol al 15%. Para ello, con ayuda de un asa de siembra calibrada, se tomó una porción de la bacteria y se inoculó en 5 mL de caldo LB que se incubó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, durante 20 ± 4 h. Transcurrido en tiempo de incubación se tomó un inóculo de 200 µL del cultivo bacteriano crecido "overnight" y se añadió a 20 ± 2 mL de medio LB (inóculo 1:100), contenido en una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C . Se incubó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm), hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento. Para ello cada 30 minutos se sacó, del incubador, el cultivo y se midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla II).

Cuando el cultivo bacteriano llegó a la fase de crecimiento exponencial ($1,8 \times 10^8$ ufc/mL determinado por MacFarland) se enfrió rápidamente transfiriendo la botella a un recipiente que contenía hielo. Se hicieron diluciones seriadas, añadiendo 100 µL de una suspensión bacteriana a 900 µL del medio de cultivo LB. A continuación, se sembraron 10 placas de LB agar con 100 µL de la dilución 10^{-4} y otras 10 con la dilución

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



10^{-5} , por diseminación en superficie con un asa de siembra Digrafsky. Obteniendo un total de 20 placas inoculadas con la bacteria *Escherichia coli*. Las placas inoculadas se mantuvieron a 4°C hasta su utilización en los ensayos de descontaminación.

4.5. Desarrollo de los ensayos

4.5.1. Ensayos de descontaminación del bacteriófago MS2

Para estos ensayos, se añadió un volumen de 400 μL de la suspensión de bacteriófago MS2 ($1,045 \times 10^4$ ufp/mL), preparado según se describe en el apartado 4.4.1, a 3600 μL de solución SM para obtener la dilución 10^{-1} . Se añadió un volumen de 400 μL de la suspensión del bacteriófago ($1,045 \times 10^4$ ufp/mL) a 9 recipientes estériles y el mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando la dilución 10^{-1} ($1,045 \times 10^3$ ufp/mL). También se preparó un control negativo, en el que se añadieron 400 μL de la solución SM. Todas las muestras se dejaron evaporar en Cabina de Seguridad Biológica clase II durante 12 horas.

Para llevar a cabo el ensayo de descontaminación, dos muestras con la suspensión de bacteriófago y dos con la dilución 10^{-1} se dispusieron en el equipo de UVC en cuatro posiciones diferentes (ver figura 3 y tabla III) para cada distancia (0,5 y 1 m) y tiempo de exposición (30 minutos y 1 hora). También se prepararon dos muestras, una con la suspensión de bacteriófago y otra con la dilución 10^{-1} , que no se sometieron a irradiación (controles positivos).

Una vez finalizado el tiempo de exposición, tanto a los controles como a las muestras se les añadió un volumen de 400 μL de la solución SM y se mantuvo durante 1 hora a 4°C. A continuación, con ayuda de una micropipeta se resuspendieron las muestras, se cogió un volumen de 120 μL de cada una de ellas y se mezcló con 120 μL de la cepa hospedadora crecida hasta fase exponencial, mantenida en hielo hasta el momento de la infección (este proceso se realizó por duplicado para cada una de las muestras). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión de los virus a las células hospedadoras. A continuación, se cogieron 200 μL de la mezcla, virus/célula hospedadora, y se añadieron a un tubo que contenía 3 mL de medio LBAs precalentado (45°C). Se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió el contenido sobre la superficie de una placa de Petri que contenía LBA. Se dejó solidificar y se incubó en una estufa de cultivo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis y el título viral.

4.5.2. Ensayos de descontaminación de la bacteria *Escherichia coli*

Para llevar a cabo el ensayo de descontaminación se utilizaron las placas inoculadas según se ha descrito en el apartado 4.4.2. Dos placas inoculadas de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente, se sometieron a descontaminación con luz UVC, en cuatro posiciones diferentes (ver figura 3 y tabla IV), para cada distancia (0,5 y 1 m) y tiempo de exposición (30 minutos y 1 hora). También se preparó una placa de cada una de las diluciones, que no se sometieron a irradiación (controles positivos). Y otras dos placas que fueron inoculadas sólo con medio LB como controles negativos.

Una vez finalizado el tiempo de exposición, tanto las placas sometidas a la luz UVC como los controles positivos y negativos, se incubaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 ± 4 h. Para evaluar el efecto de la luminaria sobre la viabilidad de las cepas bacterianas, se observa si se ha producido crecimiento bacteriano en las placas sometidas a irradiación y en los controles.

5. Fechas de ejecución de los ensayos

Los ensayos se llevaron a cabo entre los días 1, 2 y 3 de diciembre de 2020.

6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable)

Las muestras preparadas como se ha descrito en los apartados 4.4.1 y 4.4.2 se detallan en las tablas III y IV (figura 4).

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*


Tabla III. Identificación de las muestras de bacteriófago MS2 objeto de ensayo

Identificación	Alias	Fecha recepción	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQ202001830039	C ⁻	3/12/2020	400 µL de tampón SM, llevado a sequedad y no expuesto a luz UVC. Control negativo.	1
NBQ202001830040	DC ⁺	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y no expuesta a luz UVC. Control positivo.	1
NBQ202001830041	10 ⁻¹ C ⁺	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y no expuesta a luz UVC. Control positivo.	1
NBQ202001830042	D1-1-2	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 2.	1
NBQ202001830043	D1-1-4	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 4.	1
NBQ202001830044	10 ⁻¹ 1-1-1	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 1.	1
NBQ202001830045	10 ⁻¹ 1-1-3	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 3.	1
NBQ202001830046	D1-2-2	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 2.	1
NBQ202001830047	D1-2-4	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 4.	1
NBQ202001830048	10 ⁻¹ 1-2-1	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 1.	1
NBQ202001830049	10 ⁻¹ 1-2-3	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 3.	1
NBQ202001830050	D2-1-2	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 2.	1
NBQ202001830051	D2-1-4	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 4.	1
NBQ202001830052	10 ⁻¹ 2-1-1	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 1.	1
NBQ202001830053	10 ⁻¹ 2-1-3	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2, dilución 10 ⁻¹ (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 3.	1
NBQ202001830054	D2-2-2	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 2.	1
NBQ202001830055	D2-2-4	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ⁴ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 4.	1
NBQ202001830056	10 ⁻¹ 2-2-1	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 1.	1
NBQ202001830057	10 ⁻¹ 2-2-3	3/12/2020	400 µL de suspensión de bacteriófago MS2 (1,045 x 10 ³ ufp/mL), llevada a sequedad y expuesta a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 3.	1

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*


Tabla IV. Identificación de las muestras de bacteria *Escherichia coli* objeto de ensayo

Identificación	Alias	Fecha recepción	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQ202001830058	C ⁻	3/12/2020	Inóculo de LB utilizado como control negativo.	2
NBQ202002020059	10 ⁻⁴ C ⁺	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y no expuesto a luz UVC. Control positivo.	2
NBQ202002020060	10 ⁻⁵ C ⁺	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y no expuesto a luz UVC. Control positivo.	2
NBQ202002020061	10 ⁻⁴ 1-1-3	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 3.	1
NBQ202002020062	10 ⁻⁴ 1-1-4	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 4.	1
NBQ202002020063	10 ⁻⁴ 1-2-3	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 3.	1
NBQ202002020064	10 ⁻⁴ 1-2-4	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 4.	1
NBQ202002020065	10 ⁻⁴ 2-1-3	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 3.	1
NBQ202002020066	10 ⁻⁴ 2-1-4	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 4.	1
NBQ202002020067	10 ⁻⁴ 2-2-3	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 3.	1
NBQ202002020068	10 ⁻⁴ 2-2-4	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁴ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ⁴ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 4.	1
NBQ202002020069	10 ⁻⁵ 1-1-1	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 1.	1
NBQ202002020070	10 ⁻⁵ 1-1-2	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 50 cm en la posición 2.	1
NBQ202002020071	10 ⁻⁵ 1-2-1	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 1.	1
NBQ202002020072	10 ⁻⁵ 1-2-2	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 50 cm en la posición 2.	1
NBQ202002020073	10 ⁻⁵ 2-1-1	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 1.	1
NBQ202002020074	10 ⁻⁵ 2-1-2	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 30 minutos , a una distancia de 100 cm en la posición 2.	1
NBQ202002020075	10 ⁻⁵ 2-2-1	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 1.	1
NBQ202002020076	10 ⁻⁵ 2-2-2	3/12/2020	Dilución 10 ⁻⁵ de un cultivo de <i>Escherichia coli</i> a una concentración de 1,8 x 10 ³ ufc/mL por MacFarland y expuesto a luz UVC durante 1 hora , a una distancia de 100 cm en la posición 2.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo

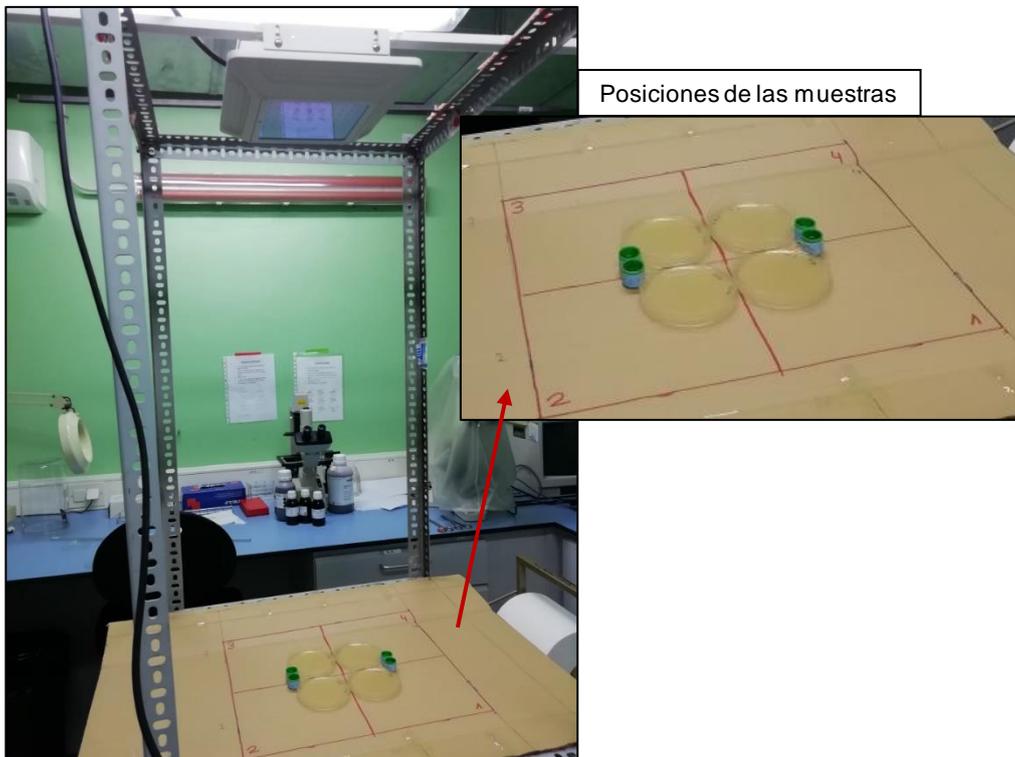


Figura 4. Posiciones de las muestras en el ensayo de irradiación.

7. Resultados obtenidos

7.1. Evaluación del efecto viricida de la luz UVC

7.1.1. Cálculo del título viral en las muestras de bacteriófago MS2

Una vez transcurrido el tiempo necesario para que se produzca el crecimiento de la suspensión bacteriana infectada con el bacteriófago, se procedió a contar el número de placas de lisis (células hospedadoras del fago lisadas tras la replicación y encapsulación de las partículas virales) y el cálculo del título viral (tablas V, VI, VII y VIII).

En la figura 5 se muestran las placas de lisis observadas en las células hospedadoras tras la replicación y encapsulación de las partículas virales recuperadas de las muestras no expuestas a luz UVC (controles positivos), de las muestras expuestas a luz UVC durante 30 y 60 minutos y a 0,5 m, y del control negativo.

5

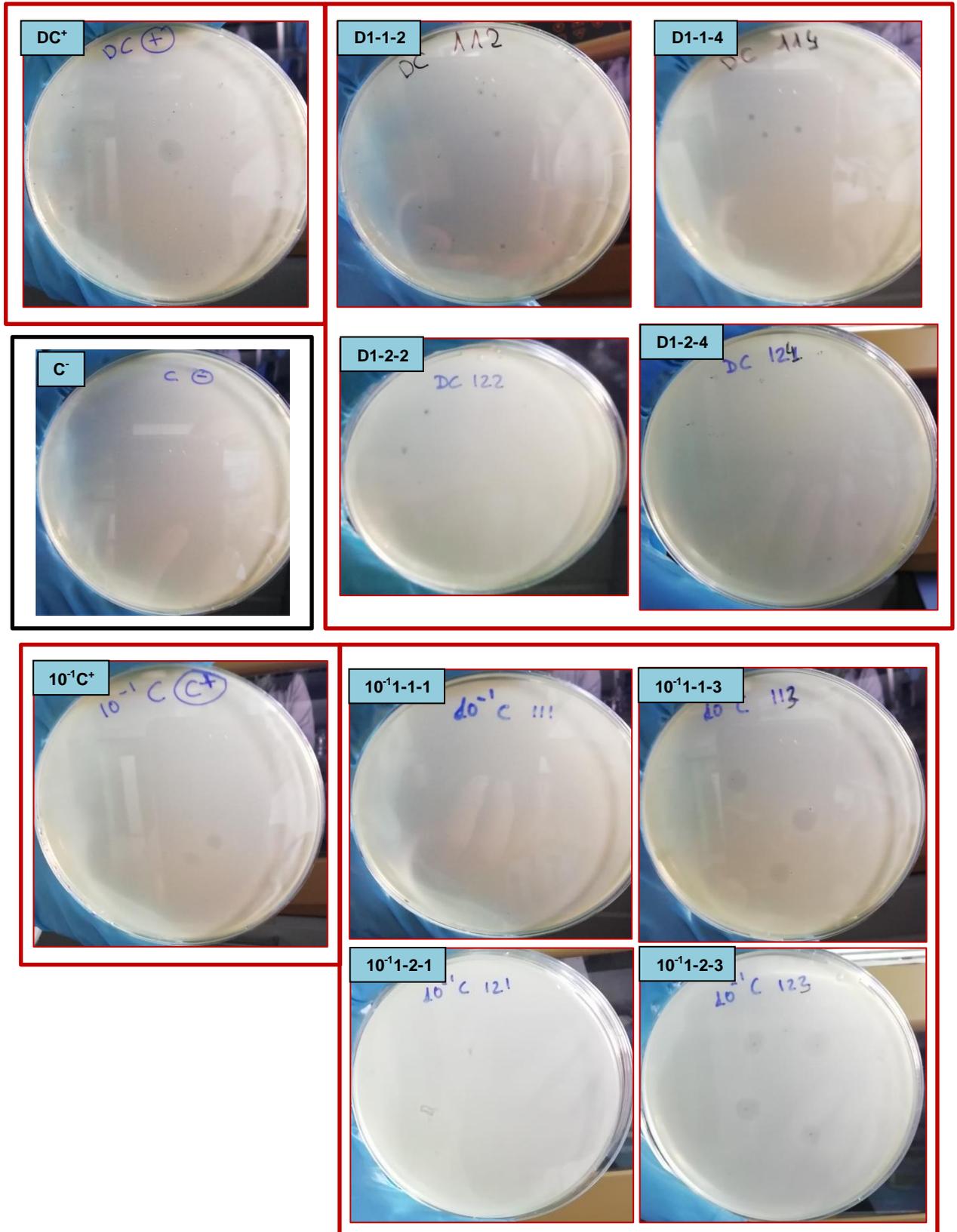


Figura 5. Placas de lisis observadas en las células hospedadoras, tras la replicación y encapsulación de las partículas virales recuperadas de las muestras expuestas a luz UVC, controles positivos y negativo.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Tabla V: Título viral de los bacteriófagos recuperados de los controles positivos y negativos no expuestos a luz UVC y de las muestras expuestas a luz UVC, a una distancia de 50 cm y durante 30 minutos.

Muestra (alias)	ufp	Título viral (ufp/mL)
C ⁻	0	0
DC ⁺	22	1,83 x 10 ²
10 ⁻¹ C ⁺	1	8,33 x 10 ⁰
D1-1-2	11	9,17 x 10 ¹
D1-1-4	12	1 x 10 ²
10 ⁻¹¹ -1-1	1	8,33 x 10 ⁰
10 ⁻¹¹ -1-3	2	1,67 x 10 ¹

Tabla VI: Título viral de los bacteriófagos recuperados de los controles positivos y negativos no expuestos a luz UVC y de las muestras expuestas a luz UVC, a una distancia de 50 cm y durante 1 hora.

Muestra (alias)	ufp	Título viral (ufp/mL)
C ⁻	0	0
DC ⁺	22	1,83 x 10 ²
10 ⁻¹ C ⁺	1	8,33 x 10 ⁰
D1-2-2	7	5,83 x 10 ¹
D1-2-4	8	6,67 x 10 ¹
10 ⁻¹¹ -2-1	0	0
10 ⁻¹¹ -2-3	4	3,33 x 10 ¹

Tabla VII: Título viral de los bacteriófagos recuperados de los controles positivos y negativos no expuestos a luz UVC y de las muestras expuestas a luz UVC, a una distancia de 100 cm y durante 30 minutos.

Muestra (alias)	ufp	Título viral (ufp/mL)
C ⁻	0	0
DC ⁺	22	1,83 x 10 ²
10 ⁻¹ C ⁺	1	8,33 x 10 ⁰
D2-1-2	13	1,08 x 10 ²
D2-1-4	6	5 x 10 ¹
10 ⁻¹² -1-1	0	0
10 ⁻¹² -1-3	1	8,33 x 10 ⁰

Tabla VIII: Título viral de los bacteriófagos recuperados de los controles positivos y negativos no expuestos a luz UVC y de las muestras expuestas a luz UVC, a una distancia de 100 cm y durante 1 hora.

Muestra (alias)	ufp	Título viral (ufp/mL)
C ⁻	0	0
DC ⁺	22	1,83 x 10 ²
10 ⁻¹ C ⁺	1	8,33 x 10 ⁰
D2-2-2	8	6,67 x 10 ¹
D2-2-4	7	5,33 x 10 ¹
10 ⁻¹² -2-1	0	0
10 ⁻¹² -2-3	0	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



7.1.2. Evaluación de la reducción de la infectividad en los ensayos de descontaminación del bacteriófago MS2

La reducción de la infectividad del bacteriófago (tablas IX y X) se expresó como la diferencia de los logaritmos del título viral de los controles positivos y de las muestras expuestas a luz UVC durante distintos tiempos, posiciones y distancias (tabla V) aplicando la ecuación 2.

$$\log R = \log N - \log N' \quad (\text{ecuación 2})$$

Siendo:

N: Título viral de los controles positivos

N': Título viral de las muestras expuestas a luz UVC durante diferentes tiempos, posiciones y distancias

Tabla IX: Cálculo de la reducción de la infectividad expresada como log R en las muestras sometidas a luz UVC a una distancia de 50 cm y durante 30 minutos y 1 hora.

Muestra (alias)	Sometida a luz UVC	Título viral	log R
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,30
D1-1-2 (N')	Sí	9,17 x 10 ¹	
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,26
D1-1-4 (N')	Sí	1 x 10 ²	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	0
10 ⁻¹ -1-1 (N')	Sí	8,33 x 10 ⁰	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	0
10 ⁻¹ -1-3 (N')	Sí	1,67 x 10 ¹	
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,50
D1-2-2 (N')	Sí	5,83 x 10 ¹	
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,44
D1-2-4 (N')	Sí	6,67 x 10 ¹	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	≥ 0,92
10 ⁻¹ -1-2-1 (N')	Sí	0	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	0
10 ⁻¹ -1-2-3 (N')	Sí	3,33 x 10 ¹	

Cuando el número de unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/mL) es cero, en las muestras expuestas a luz UVC, el valor del Log R está condicionado por la concentración de los controles utilizados como referencia y se indicará con el símbolo mayor o igual (≥).

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



Tabla X: Cálculo de la reducción de la infectividad expresada como log R en las muestras sometidas a luz UVC a una distancia de 100 cm y durante 30 minutos y 1 hora.

Muestra (alias)	Sometida a luz UVC	Título viral	log R
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,23
D2-1-2 (N')	Sí	1,08 x 10 ²	
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,56
D2-1-4 (N')	Sí	5 x 10 ¹	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	≥ 0,92
10 ⁻¹² -1-1 (N')	Sí	0	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	0
10 ⁻¹² -1-3 (N')	Sí	8,33 x 10 ⁰	
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,44
D2-2-2 (N')	Sí	6,67 x 10 ¹	
DC ⁺ (N)	No	1,83 x 10 ²	0,55
D2-2-4 (N')	Sí	5,33 x 10 ¹	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	≥ 0,92
10 ⁻¹² -2-1 (N')	Sí	0	
10 ⁻¹ C ⁺ (N)	No	8,33 x 10 ⁰	≥ 0,92
10 ⁻¹² -2-3 (N')	Sí	0	

Cuando el número de unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/mL) es cero, en las muestras expuestas a luz UVC, el valor del Log R está condicionado por la concentración de los controles utilizados como referencia y se indicará con el símbolo mayor o igual (≥).

7.2. Evaluación del efecto bactericida de la luz UVC

7.2.1. Cálculo del número de unidades formadoras de colonia por mililitro

Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por conteo directo de las colonias crecidas sobre las placas de LBA (figuras 6 y 7). Para el cálculo del número de ufc/mL viables (tablas XI, XII, XIII y XIV) se aplicó la ecuación 3.

$$N = c \times 10 \quad (\text{ecuación 3})$$

Siendo:

c: suma de las colonias contadas en cada dilución

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*

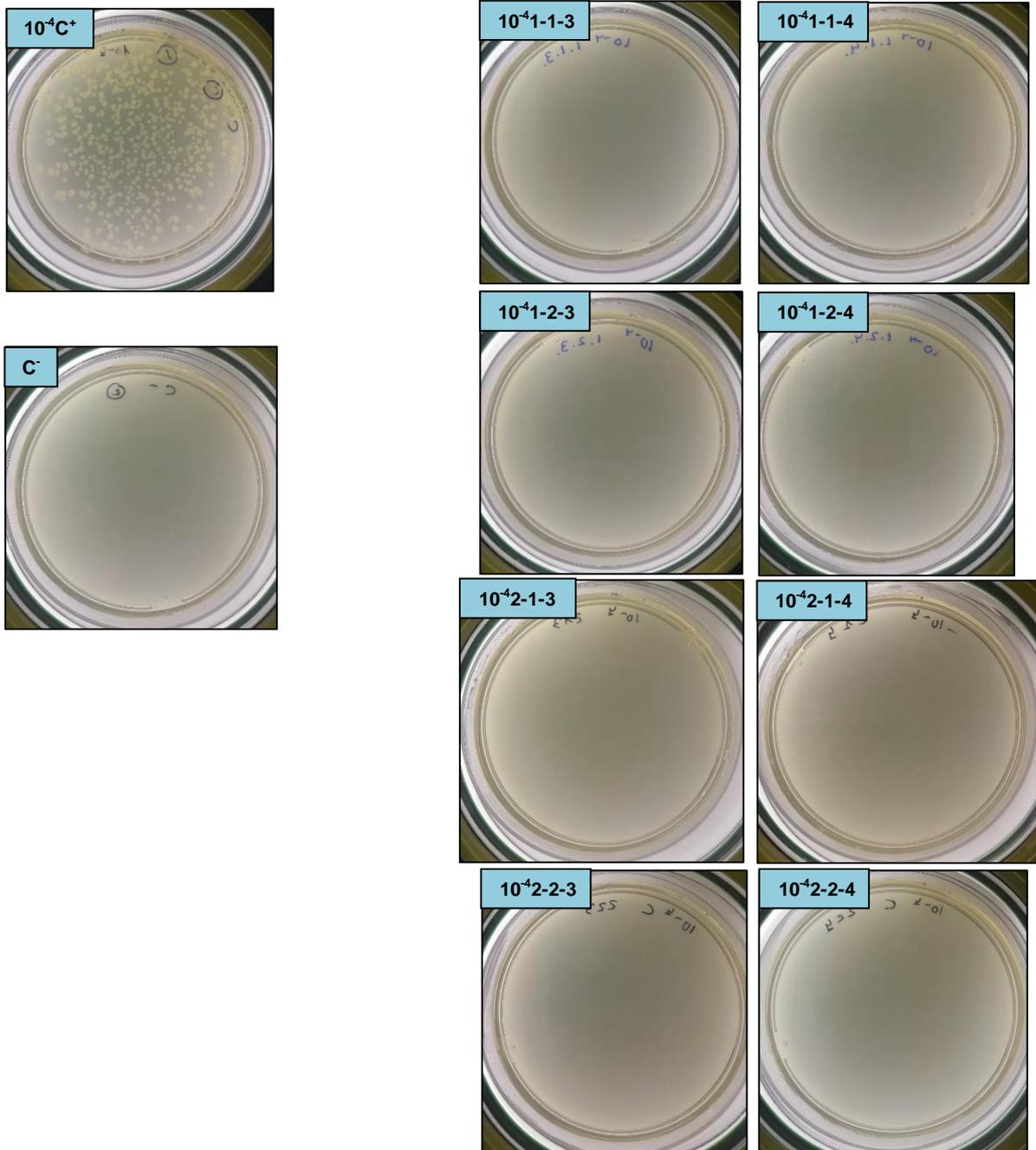


Figura 6. Placas de LB agar inoculadas con las muestras recuperadas de la bacteria *Escherichia coli* (dilución 10^{-4}) expuestas a luz UVC, su respectivo control positivo y control negativo.

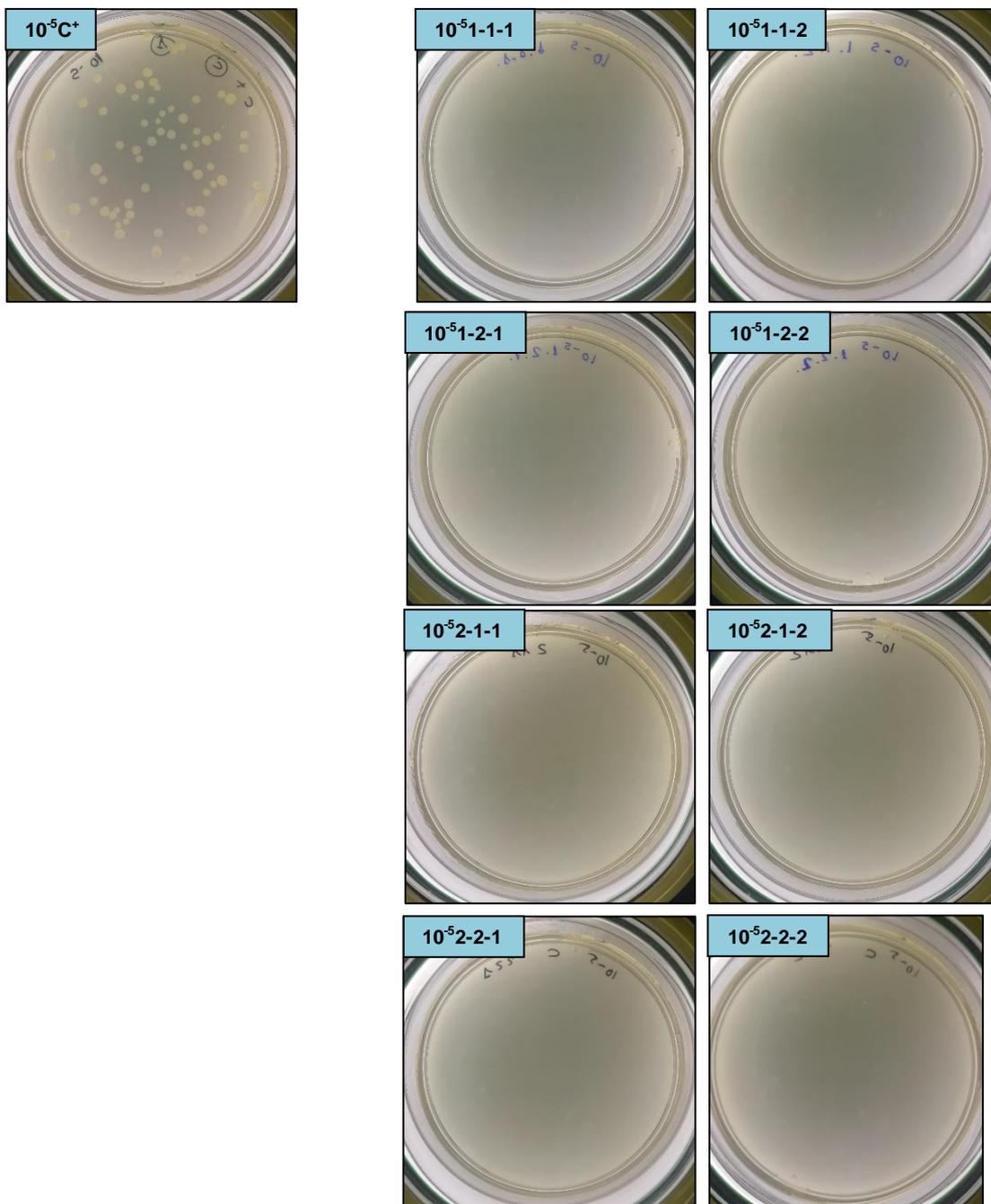


Figura 7. Placas de LB agar inoculadas con las muestras recuperadas de la bacteria *Escherichia coli* (dilución 10^{-5}) expuestas a luz UVC y su respectivo control positivo.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Tabla XI: Cálculo del número de ufc/mL viables en los controles negativos y positivos de *Escherichia coli* no expuestos a luz UVC y en las muestras de *Escherichia coli* expuestas a luz UVC, a una distancia de 50 cm y durante 30 minutos.

Muestra (alias)	c	N (ufc/mL)
C ⁻	0	0
10 ⁻⁴ C ⁺	704	7,04 x 10 ³
10 ⁻⁵ C ⁺	94	9,4 x 10 ²
10 ⁻⁴ 1-1-3	0	0
10 ⁻⁴ 1-1-4	0	0
10 ⁻⁵ 1-1-1	0	0
10 ⁻⁵ 1-1-2	0	0

Tabla XII: Cálculo del número de ufc/mL viables en los controles negativos y positivos de *Escherichia coli* no expuestos a luz UVC y en las muestras de *Escherichia coli* expuestas a luz UVC, a una distancia de 50 cm y durante 1 hora.

Muestra (alias)	c	N (ufc/mL)
C ⁻	0	0
10 ⁻⁴ C ⁺	704	7,04 x 10 ³
10 ⁻⁵ C ⁺	94	9,4 x 10 ²
10 ⁻⁴ 1-2-3	0	0
10 ⁻⁴ 1-2-4	0	0
10 ⁻⁵ 1-2-1	0	0
10 ⁻⁵ 1-2-2	0	0

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



Tabla XIII: Cálculo del número de ufc/mL viables en los controles negativos y positivos de *Escherichia coli* no expuestos a luz UVC y en las muestras de *Escherichia coli* expuestas a luz UVC, a una distancia de 100 cm y durante 30 minutos.

Muestra (alias)	c	N (ufc/mL)
C ⁻	0	0
10 ⁻⁴ C ⁺	704	7,04 x 10 ³
10 ⁻⁵ C ⁺	94	9,4 x 10 ²
10 ⁻⁴ 2-1-3	0	0
10 ⁻⁴ 2-1-4	0	0
10 ⁻⁵ 2-1-1	0	0
10 ⁻⁵ 2-1-2	0	0

Tabla XIV: Cálculo del número de ufc/mL viables en los controles negativos y positivos de *Escherichia coli* no expuestos a luz UVC y en las muestras de *Escherichia coli* expuestas a luz UVC, a una distancia de 100 cm y durante 1 hora.

Muestra (alias)	c	N (ufc/mL)
C ⁻	0	0
10 ⁻⁴ C ⁺	704	7,04 x 10 ³
10 ⁻⁵ C ⁺	94	9,4 x 10 ²
10 ⁻⁴ 2-2-3	0	0
10 ⁻⁴ 2-2-4	0	0
10 ⁻⁵ 2-2-1	0	0
10 ⁻⁵ 2-2-2	0	0

7.2.2. Evaluación de la reducción de la viabilidad bacteriana en los ensayos de descontaminación de la bacteria *Escherichia coli*

La reducción de la viabilidad bacteriana (tabla VIII) se expresó como la diferencia de los logaritmos del número de ufc/mL en los controles positivos y en las muestras expuestas a luz UVC durante distintos tiempos y posiciones (tablas XV y XVI) aplicando la ecuación 2.

$$\log R = \log N - \log N' \quad (\text{ecuación 2})$$

Siendo:

N: ufc/mL en los controles positivos

N': ufc/mL en las muestras expuestas a luz UVC durante diferentes tiempos, posiciones y distancias

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Tabla XV. Cálculo de la reducción de la viabilidad bacteriana expresada como log R en las muestras sometidas a luz UVC a una distancia de 50 cm y durante 30 minutos y 1 hora.

Muestra (Alias)	Sometida a luz UVC	ufc/mL	log R
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 1-1-3 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 1-1-4 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 1-2-3 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 1-2-4 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 1-1-1 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 1-1-2 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 1-2-1 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 1-2-2 (N ⁺)	Si	0	

Cuando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) es cero, en las muestras expuestas a luz UVC, el valor del Log R está condicionado por la concentración de los controles utilizados como referencia y se indicará con el símbolo mayor o igual (≥).

Tabla XVI. Cálculo de la reducción de la viabilidad bacteriana expresada como log R en las muestras sometidas a luz UVC a una distancia de 100 cm y durante 30 minutos y 1 hora.

Muestra (Alias)	Sometida a luz UVC	ufc/mL	log R
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 2-1-3 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 2-1-4 (N ⁺)	Si	1 x 10 ¹	
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 2-2-3 (N ⁺)	Si	1 x 10 ¹	
10 ⁻⁴ C ⁺ (N)	No	7,04 x 10 ³	≥ 3,85
10 ⁻⁴ 2-2-4 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 2-1-1 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 2-1-2 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 2-2-1 (N ⁺)	Si	0	
10 ⁻⁵ C ⁺ (N)	No	9,4 x 10 ²	≥ 2,97
10 ⁻⁵ 2-2-2 (N ⁺)	Si	0	

Cuando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) es cero, en las muestras expuestas a luz UVC, el valor del Log R está condicionado por la concentración de los controles utilizados como referencia y se indicará con el símbolo mayor o igual (≥).



8. Declaración de conformidad (cuando proceda)

No aplica.

9. Resumen, opiniones, interpretaciones

9.1. Reducción de la infectividad del bacteriófago

De los resultados obtenidos en las tablas IX y X, en las condiciones ensayadas, se puede concluir que después de 1 hora de exposición a la luz UVC, tanto a 0,5 como a 1 m de distancia, la reducción de la infectividad del bacteriófago está entre 0,5 y 1 orden de magnitud en función de la dilución, esto supone una reducción aproximada del 68,38% y del 90% en las suspensiones directa y diluida (10^{-1}), respectivamente.

9.2. Reducción de la viabilidad bacteriana

De los resultados obtenidos en las tablas XV y XVI se puede deducir que no se observa crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras expuestas a luz UVC en los tiempos y distancias ensayadas. En consecuencia, se puede concluir que la reducción de la viabilidad bacteriana es aproximadamente de 3 órdenes de magnitud ($\log R \geq 3,85$ en la dilución 10^{-4} y $\log R \geq 2,97$ en la dilución 10^{-5}), esto supone una reducción superior al 99,90%.



10. Anexos

10.1. Anexo 1. Recuento de unidades formadoras de placa de la suspensión inicial de bacteriófago

Dilución	ufp	ufp
Directo	108	114
10 ⁻¹	53	56
10 ⁻²	4	6
10 ⁻³	0	0
10 ⁻⁴	0	0
10 ⁻⁵	0	0

10.2. Anexo 2. Recuento de unidades formadoras recuperadas en el control positivo de bacteriófago MS2

Muestra	ufp	ufp
DC+	35	9
10 ⁻¹ C+	0	2

10.3. Anexo 3. Recuento de unidades formadoras de placa recuperadas de las muestras de bacteriófago MS2 expuestas a luz UVC

Muestra	ufp	ufp
D1-1-2	5	16
D1-1-4	18	6
10 ⁻¹ 1-1-1	2	0
10 ⁻¹ 1-1-3	3	1
D1-2-2	6	8
D1-2-4	5	11
10 ⁻¹ 1-2-1	0	0
10 ⁻¹ 1-2-3	5	2
D2-1-2	12	14
D2-1-4	6	6
10 ⁻¹ 2-1-1	0	0
10 ⁻¹ 2-1-3	0	1
D2-2-2	8	7
D2-2-4	9	4
10 ⁻¹ 2-2-1	0	0
10 ⁻¹ 2-2-3	0	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



10.4. Anexo 4. Recuento de unidades formadoras de colonia en el control positivo de

Escherichia coli

Muestra	ufc	ufc
10 ⁻⁴ C ⁺	613	795
10 ⁻⁵ C ⁺	66	122

10.5. Anexo 5. Recuento de unidades formadoras de colonia en las muestras de *Escherichia*

coli expuestas a luz UVC

Muestra	ufc
10 ⁻⁴¹ -1-3	0
10 ⁻⁴¹ -1-4	0
10 ⁻⁴¹ -2-3	0
10 ⁻⁴¹ -2-4	0
10 ⁻⁴² -1-3	0
10 ⁻⁴² -1-4	0
10 ⁻⁴² -2-3	0
10 ⁻⁴² -2-4	0
10 ⁻⁵¹ -1-1	0
10 ⁻⁵¹ -1-2	0
10 ⁻⁵¹ -2-1	0
10 ⁻⁵¹ -2-2	0
10 ⁻⁵² -1-1	0
10 ⁻⁵² -1-2	0
10 ⁻⁵² -2-1	0
10 ⁻⁵² -2-2	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



10.6. Anexo 6. Bibliografía

- Adams M.H. Agar overlay methods for routine phage production. Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- American Type Culture Collection (ATCC) PO Box 1549. Manassas, VA 20108 USA. www.atcc.org.
- ASTM-1053:97. Actividad virocida para superficies inertes.
- Cormier J. and Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2. J Virol Methods. 2014, 196:86-92.
- Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular Cloning a Laboratory Manual. (Third Edition). 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-576-5 (cloth) -- ISBN 0-87969-577-3 (pbk).
- Kurt Bedell, Adam Buchaklian and Stanley Perlman, MD. Efficacy of an automated multi-emitter whole room UVC disinfection system against Coronaviruses MHV and MERS-CoV. Infect Control Hosp Epidemiol. 2016; 37(5): 598–599. doi:10.1017/ice.2015.348.
- Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998), 144: 2579-2587.
- Markus Eickmann, Ute Gravemann, Wiebke Handke, Frank Tolksdorf, Stefan Reichenberg, Thomas H. Müller and Axel Seltsam. Inactivation of three emerging viruses – severe acute respiratory syndrome coronavirus, Crimean–Congo haemorrhagic fever virus and Nipah virus – in platelet concentrates by ultraviolet C light and in plasma by methylene blue plus visible light. 2020 International Society of Blood Transfusion, DOI: 10.1111/vox.12888.
- Markus Eickmann, Ute Gravemann, Wiebke Handke, Frank Tolksdorf, Stefan Reichenberg, Thomas H. Müller and Axel Seltsam. Inactivation of Ebola virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus in platelet concentrates and plasma by ultraviolet C light and methylene blue plus visible light, respectively. TRANSFUSION 2018; 5:2202–2207.
- McDevitt, J.J., Rudnick, S. N., and Radonovich, L. J. Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UVC Light. Appl Environ Microbiol. (2012), 78(6): 1666–1669.
- O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.
- Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.
- Shu-Ming Duan, Sin-Sheng Zhao, Rui- Fu Wen, Jing-Jing Huang, Guo-Hua Pi, Su-Xiang Zhang, Jun Han, Sheng-Li Bi, Li Ruan, Xiao-Ping Dong and SARS Research Team. Stability of SARS Coronavirus in Human Specimens and Environment and Its Sensitivity to Heating and UV Irradiation. Biomedical and Environmental Sciences 2003, 16:246-255.
- UNE_EN 13610:2003. Ensayo cuantitativo para evaluación de la actividad viricida frente a bacteriófagos.
- UNE-EN ISO 10705-1. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 1: recuento de bacteriófagos ARN F específicos.
- Wallace, J. UV Sterilization: Far-UVC light kills airborne flu viruses without danger to humans. Lasers & Sources 2017. <https://www.laserfocusworld.com/lasers-sources/article/16555364/uv-sterilization-faruvc-light-kills-airborne-flu-viruses-without-danger-to-humans>, abril 2020.