

NOTA TÉCNICA

## Determinación de la permeabilidad viral de los condones de membrana de poliolefina al bacteriófago $\Phi$ X174

Oscar Eugenio Sierra <sup>1</sup>, María Antonia Gaona de Hernández <sup>2</sup>, Gloria Janneth Rey <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología, Unidad de Medicina Tropical y Enfermedades Infecciosas, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario. Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>3</sup> Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

En las membranas utilizadas para la fabricación de los condones existe la posibilidad de encontrar pequeños agujeros, lo cual pone en duda su efectividad como barrera para agentes infecciosos como los virus; por lo anterior, se estandarizó una técnica fundamentada en la capacidad que tienen los virus bacteriófagos para atravesar membranas e infectar una determinada especie de bacterias, consistente en formar placas de lisis en una capa de crecimiento de la bacteria hospedera, para así evaluar la capacidad de barrera física de sesenta condones de membrana de poliolefina frente a la difusión del bacteriófago  $\Phi$ X174(ATCC13706-B1) de 27 nm de diámetro, comparándolos con veinte condones de membrana de látex. Se simularon condiciones fisiológicas de presión, pH, tensión superficial, longitud y tiempo de exposición y título viral. Para el proceso se diseñó un sistema de presurización con el cual se inyectó aire comprimido a diez condones en forma simultánea. Se encontró que cuatro de sesenta condones de poliolefinas, y uno de veinte condones de látex fueron permeables al virus, evidenciándose que más de 93% de los condones evaluados mostraron capacidad de retener el virus. La diferencia de permeabilidad entre los dos tipos de membranas evaluadas no fue estadísticamente significativa ( $p=0,7897$ ).

**Palabras clave:** permeabilidad, condones, virus, transmisión de enfermedad.

### Permeability to $\Phi$ X174 bacteriophages in polyolephin membrane condoms

Membranes used for the manufacture of condoms eventually can develop tiny pores, thereby decreasing dramatically their effectiveness as a physical barrier against the transmission of infectious agents. A technique was designed that was based on the ability of bacteriophage viruses to trespass membranes and to infect certain bacteria species, and then developing lysis plaques in the colonies of the host bacteria. The effectiveness of 60 polyolefin condoms in preventing the diffusion of the bacteriophage  $\Phi$ X174(ATCC13706-B1), 27 nm diameter, was compared to 20 latex condoms. Physiological conditions such as pressure, pH, superficial tension, length, time of exposure and viral titre were simulated. A pressurization system was designed, in which compressed air was injected simultaneously to ten condoms. Four of the 60 polyolefin condoms and one of the 20 latex condoms were permeable to the virus. Therefore, at least 93% of the condoms evaluated were able to contain the virus. The difference in permeability between the two types of membranes was not statistically significant ( $P=0.79$ ).

**Key words:** permeability, condoms, virus, disease transmission.

La determinación de la capacidad de la membrana de los condones para impedir la penetración de agentes infecciosos asociados a las prácticas sexuales constituye un soporte esencial para decidir sobre su empleo como estrategia en la prevención de las infecciones de transmisión sexual (ITS). Se han descrito diversos métodos para realizar este tipo de evaluación (1- 6), que de una u otra forma privilegian los virus por ser los patógenos más pequeños. Entre ellos se destaca por su eficiencia como virus de reto, el bacteriófago  $\Phi$ X174 (ATCC 13706-B1), cuyo diámetro es de 27 nm. Su elección se fundamenta en el hecho de que si una partícula viral tan pequeña no puede atravesar la membrana del condón, tampoco lo podrían hacer los virus humanos que son más grandes (inmunodeficiencia humana-VIH/sida, papiloma humano-VPH y hepatitis B-VHB con 100, 55 y 42 nm de diámetro, respectivamente), así como en otros factores pertinentes, tales como su estabilidad, bajo nivel de unión a pH 7 por interacciones eléctricas e hidrofóbicas (7), y su nivel de bioseguridad en el trabajo bajo condiciones de laboratorio.

La *Food and Drug Administration (FDA)* de Estados Unidos, a través de su *Division of Life Science – Office of Science and Technology*, estableció y publicó en 1994 la información sobre la determinación de las propiedades de barrera de los condones frente a la penetración de virus (8), detallando los parámetros mínimos que deben tenerse en cuenta para simular en el laboratorio las condiciones fisiológicas reales del uso del condón. Dicha determinación se recomienda como parte esencial del proceso de evaluación al que las membranas utilizadas como aislantes biológicos deben someterse. En ese sentido, una reciente evaluación de condones de látex realizada en los Estados Unidos reportó que 2,6% de ellos

permitió la penetración de algunos virus. Se evaluaron igualmente condones “no látex” (poliuretano) con similares resultados (9), pero no existen reportes para condones con membranas de poliolefina, material que viene siendo promocionado por no causar alergia ni disminuir la sensibilidad. Por otro lado, las técnicas empleadas hasta ahora implican la evaluación de un condón por cada montaje, lo que consume bastante tiempo y no ofrece la posibilidad de comparar simultáneamente diversas clases de condones entre sí y con los correspondientes controles.

### Materiales y métodos

El virus bacteriófago  $\Phi$ X174 (ATCC 13706-B1) y la cepa bacteriana *Escherichia coli* WG5, ATCC 700078 fueron donados por el Laboratorio de Aguas del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana; los sesenta condones de poliolefina fueron seleccionados aleatoriamente por personal ajeno a la investigación entre 1.000 unidades de cinco diferentes lotes proporcionados por Natural Sensation Ltda.; los condones de látex se adquirieron en expendios comerciales y los medios de cultivo y soluciones fueron comprados a la Subdirección de Producción del Instituto Nacional de Salud.

Se planteó un estudio experimental con controles concurrentes independientes para evaluar sesenta condones de membrana de poliolefina provenientes de tres lotes diferentes y compararlos con veinte condones de membrana de látex de un solo lote. Para ello se diseñó y construyó un sistema de presurización múltiple que permitió que se montaran diez condones en cada jornada de trabajo con la siguiente distribución: seis condones de poliolefina para ser evaluados, dos condones de poliolefina como controles (control positivo y control del fago en el eluyente) y dos condones de látex para la comparación. La técnica se basó en los parámetros descritos por Lytle, Routson y Cyr y por la FDA (4,8); la cuantificación del virus se basó en la norma ISO 10705–2 de 2000 y el trabajo de tesis de Díaz-Granados C, Zarama J y Campos C (10,11). La diferencia entre las proporciones se determinó mediante la prueba de  $\chi^2$  y sus valores de  $p$ .

#### Correspondencia:

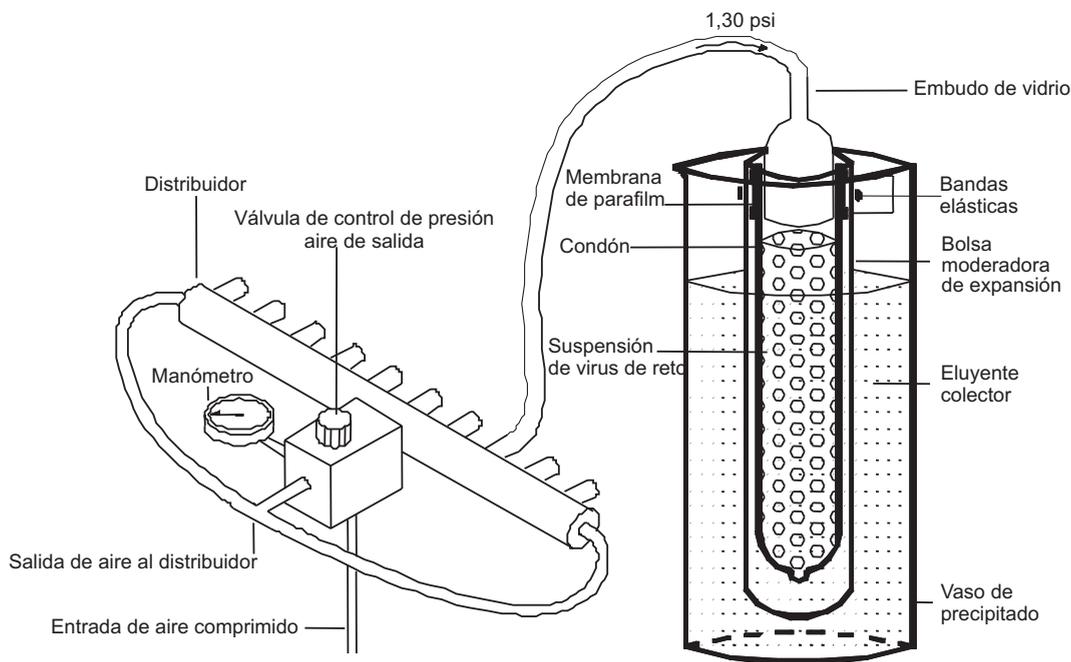
Oscar Eugenio Sierra Ospina, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Laboratorio de Microbiología, Universidad del Rosario, Calle 63D No. 24-31. Bogotá D. C., Colombia.  
Teléfono (57-1) 3474570 extensión 265.  
osierra@urosario.edu.co

Recibido: 05/04/05; aceptado: 18/07/05

Cada condón fue removido de su empaque, se extendió y se enjuagó en solución de Tween-80 al 6% para retirar los aditivos, luego se lavó en DPBS (*Dulbecco's buffer* salino fosfato) y se dejó secar en un recipiente de vidrio estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Dado que los condones de poliolefina presentan un aditivo insoluble en agua fue necesario disponer de condones sin lubricar. El condón vacío y limpio se unió por su extremo abierto a la boca ancha de un embudo de 130 mm de circunferencia, dejando libres aproximadamente 140 mm de su longitud. Se rodeó la unión con una banda de parafilm de 50 mm de ancho y se aseguró con dos bandas elásticas de 8 mm de ancho (figura 1). Se introdujo el condón vacío en una bolsa moderadora de expansión de 160 mm de longitud y de 125 mm de circunferencia elaborada en tela de organza, y se aseguró al embudo con una banda elástica. El extremo superior del parafilm fue cubierto con una banda de papel absorbente con el fin de detectar posibles escapes de la solución de reto. Con una jeringa estéril introducida a través de la boca angosta del embudo, se llenó cada uno de

los condones con  $145 \pm 5$  mL de suspensión del virus de reto titulado entre 1 y  $9,5 \times 10^8$  unidades formadoras de placa (UFP/mL) (bacteriófago  $\Phi$ X174 en DPBS pH 7,0  $\pm$  0,1 con 0,1% Tritón X-100). Se sumergió cada condón lleno en un vaso de precipitados que contenía 760  $\pm$  5 mL de eluyente (DPBS pH 7,1  $\pm$  0,1 con 0,1% Tritón X-100), al que en algunos casos se le proporcionó agitación magnética, procedimiento que no afectó los resultados. Para presurizar cada condón a 61 mm Hg (1,30 psi), se empleó un sistema que permitió inyectar aire comprimido simultáneamente a 10 condones a través de una manguera conectada al extremo angosto y libre de cada embudo (figura 1). La presión se mantuvo con una variación de  $\pm$  0,02 psi durante los treinta minutos del ensayo. Toda el área de trabajo se aisló térmicamente con una barrera creada por mecheros de Bunsen encendidos.

Para determinar la presencia de los bacteriófagos que podían haber penetrado a través de la membrana del condón, se tomaron 3 mL de eluyente, se mezclaron con 1,5 mL de suspensión precrecida  $10^8$  bacteria/mL (*E. coli* WG5, ATCC



**Figura 1.** Diagrama de la presurización simultánea de los diez condones y detalle del montaje de uno de ellos.

**Cuadro 1.** Resultado de la penetración viral de los condones de membrana de poliolefina y de látex

Lote y material	Número de muestras		UFP/mL del $\Phi$ X174 en el eluyente colector
	Permeable	Impermeable	
Poliolefina lote # H03002		18	<1*
	1		$1,1 \times 10^3$
	1		0,7
Poliolefina lote # H03202		19	<1*
	1		$7,4 \times 10^3$
Poliolefina lote # H03402		19	<1*
	1		$7,7 \times 10^2$
	1		
Total poliolefina	4 (6,6%)	56 (93,3%)	
Látex		19	<1*
	1		$4,2 \times 10^2$
Total látex	1 (5%)	19 (95%)	

\* Se expresa con < 1 el resultado de las muestras de eluyente que al ser procesadas no formaron placa de lisis alguna y que corresponden a los condones considerados como impermeables al bacteriófago.

700078) y con 5 mL de MSA<sub>ss</sub> (Agar Scholtens Modificado semisólido). Esta mezcla se dispensó sobre tres placas sólidas de agar MSA (Agar Scholtens Modificado) a una razón de 3 mL por placa. Se incubó a 37°C durante 18 a 24 horas. Posteriormente, por inspección ocular se cuantificó el número de placas de lisis presentes en cada caja de agar MSA.

Para garantizar la calidad de las pruebas, se realizaron 7 controles diferentes.

1. Control de estabilidad del fago: a partir de 3 mL de la suspensión del fago al inicio y al final de la prueba, se hicieron diluciones en serie comenzando con  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ ; cada dilución se sometió a este control.

2. Control del eluyente: se tomaron 3 mL del eluyente al inicio de la prueba y se procesaron para determinar presencia del fago.

3. Control de estabilidad del fago en el eluyente: se llenó un condón con  $145 \pm 5$  mL de DPBS pH 7,1+/-0,1 y con 0,1% Tritón X-100 sin fago. Se agregaron 0,1 mL de la suspensión del virus de reto a los  $760 \pm 5$  mL del eluyente. Se tomaron 3 mL del eluyente al inicio y al final de la prueba y se hicieron diluciones que se procesaron para determinar la presencia del virus.

4. Control comparativo: se realizaron montajes paralelos de dos condones de látex hasta

completar 20 unidades, ejecutando idénticos procedimientos para los condones de poliolefina.

5. Control de bacteria: se mezclaron 1,5 mL de la solución precrecida  $10^8$  bacterias/mL con 5 mL de MSA<sub>ss</sub>; tres mL se dispensaron sobre dos placas sólidas de agar MSA. Se incubó.

6. Control de aerosoles del fago: para cada uno de los grupos de diez montajes se expusieron 3 placas de agar MSA al ambiente de trabajo del laboratorio durante todo el tiempo del ensayo, luego se mezclaron 3 mL de DPBS con 1,5 mL de la solución precrecida  $10^8$  bacteria/mL y 5 mL de MSA<sub>ss</sub> y se les dispensaron tres mL. Se incubó.

7. Control positivo de la prueba: en forma intencional y con extremo cuidado, se debilitó la membrana de un condón de poliolefina, ocasionándole pequeñísimos agujeros. Se llenó el condón con 140 a 150 mL de suspensión del virus de reto. Al final de la prueba se tomaron 3 mL del eluyente, que se procesaron para determinar la presencia del fago.

Para evaluar la capacidad de barrera física de las membranas de los condones, se detectó la presencia del bacteriófago en el eluyente mediante el recuento de las placas de lisis (calvas) existentes en cada una de las cajas de MSA, expresado en unidades formadoras de placa por

mL de suspensión (UFP/mL), y calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \frac{N}{nVF},$$

donde, N=número total de placas de lisis, n=número de réplicas por muestra, V=volumen de prueba usado y F=factor de dilución.

El factor de dilución se determinó dividiendo el volumen de la muestra (multiplicado por la correspondiente dilución cuando fue necesario) entre volumen de la muestra + volumen del MSA<sub>ss</sub> + volumen de bacteria.

### Resultados

Se determinó que los condones de membranas de poliolefina fueron 93,3% impermeables al bacteriófago, mientras que la impermeabilidad de los condones de látex fue de 95%, sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $p$  de  $\chi^2 = 0,7897$ ; cuadro 1). Con respecto a la variación del título viral del bacteriófago en la suspensión de reto dentro de los condones y en la solución eluyente, se encontró que las tasas de variación promedio fueron 0,92 y 0,913, respectivamente. Con respecto a la variación del título viral del bacteriófago en la suspensión de reto dentro de los condones y en la solución eluyente, se encontró que las tasas de variación fueron en promedio de 0,92 y 0,913, respectivamente, hecho que otorga confiabilidad a la viabilidad del virus durante la prueba; además, los controles positivos evidenciaron la fuga de los bacteriófagos a través de la membrana, alcanzando títulos similares a los determinados para la suspensión de reto al final de la prueba.

### Discusión

Dado el carácter de impermeabilidad de la membrana objeto de evaluación en este trabajo (superior a 93%), y teniendo en cuenta los datos reportados en recientes publicaciones internacionales (9) sobre una impermeabilidad a agentes virales de hasta 97,4%, se considera que la membrana de poliolefina ofrece un importante porcentaje de protección contra la infección con agentes causantes de ITS. Por lo tanto, es importante continuar estimulando el uso del condón como una estrategia relevante para el control de las infecciones de transmisión sexual.

Con la metodología aquí descrita se logró una alta sensibilidad de la técnica, dado que se detectó la presencia de hasta dos partículas virales en tres mililitros de muestra procesada (0,7 UFP/mL). Si se explica este resultado a la luz del principio virológico según el cual cada UFP se origina a partir de una única partícula viral, se puede deducir que en el volumen de eluyente (750 mL) del segundo positivo correspondiente al lote #H03002 de condones de poliolefina, había, aproximadamente 500 partículas virales, las cuales fueron transportadas por un volumen de suspensión de reto de  $5 \times 10^{-6}$  mL que atravesó la membrana, correspondiendo al flujo viral más bajo detectado; además, la viabilidad del virus durante la prueba se mantuvo en alrededor de 92%, reafirmando que el bacteriófago  $\Phi$ X174 es una excelente opción para evaluar la permeabilidad de membranas empleadas como aislantes biológicos. Este estudio facilita una técnica de procesamiento múltiple y simultáneo que permitió por primera vez la evaluación de los condones de membrana de poliolefina como barrera física frente a la difusión de agentes patógenos, y que puede emplearse también en la evaluación de otras membranas utilizadas como aislantes biológicos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen de manera especial el apoyo irrestricto de Ciro Alfonso Casadiego, director del Instituto de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario y a María Claudia Campos, directora del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana por la donación del material biológico.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener vinculación laboral alguna con Natural Sensation Ltda., ni con otra empresa o laboratorio interesado en obtener resultados favorables o desfavorables de esta investigación.

### Financiación

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario y fue cofinanciado por la Universidad del Rosario y Natural Sensation Ltda.

### Referencias

1. **Lytle CD, Carney PG, Vohra S, Cyr WH, Bockstahler LE.** Virus leakage through natural membrane condoms. *Sex Transm Dis* 1990;17:58-62.
2. **Lytle CD, Truscott W, Budacz AP, Venegas L, Routson LB, Cyr WH.** Important factors for testing barrier materials with surrogate viruses. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:2549-54.
3. **Retta SM, Herman WA, Rinaldi JE, Carey RF, Herman BA, Athey TW.** Test method for evaluating the permeability of intact prophylactics to viral-size microspheres under simulated physiologic conditions. *Sex Transm Dis* 1991;18:111-8.
4. **Lytle CD, Routson LB, Cyr WH.** A simple method to test condoms for penetration by viruses. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:3180-2.
5. **Fujito BT, Lytle CD.** Elution of virus by ionic and nonionic surfactants. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3470-3.
6. **Lytle CD, Duff JE, Fleharty B, Bidinger RL, Cyr WH, Routson LB.** A sensitive method for evaluating condoms as virus barriers. *J AOAC Int* 1997;80:319-24.
7. **Lytle CD, Routson LB.** Minimized virus binding for test of barrier materials. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:643-9.
8. **Federal Drug Administration.** Testing guidance for male condoms made from new material. Information for determining barrier properties of condoms to virus penetration. Rockville MD: Division of Life Sciences, Office of Science and Technology, Center for Devices and Radiological Health; Attachment A; 1994.
9. **Lytle CD, Routson LB, Seaborn GB, Dixon LG, Bushar HF, Cyr WH.** An in vitro evaluation of condoms as barriers to a small virus. *Sex Transm Dis* 1997;24:161-4.
10. **International Organization for Standardization.** ISO10705-2. Water Quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Enumeration of somatic coliphages; Geneva: International Organization for Standardization; 2000. p.1-16.
11. **Díaz-Granados C, Zarama J.** Puesta a punto de una nueva técnica para evaluar la permeabilidad a virus en preservativos de polietileno utilizando el bacteriófago  $\Phi$ X174 como modelo viral experimental (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2001.