



Tecnología Farmacéutica

Eficacia biodescontaminante del peróxido de hidrógeno y formaldehído gas en boxes de nivel 3 de biocontención

G. PASCUAL ÁLVAREZ

Jefe de Ingeniería y Bioseguridad, Centro de Investigación en Sanidad Animal - INIA
Ministerio de Ciencia e Innovación

Ha sido evaluada comparativamente la eficacia de la actividad biodescontaminante del peróxido de hidrógeno gas y formaldehído gas, en boxes de líneas de experimentación largas con animales inoculados con virus de impacto en la sanidad animal (peste porcina africana, fiebre aftosa y *west nile*), donde la carga orgánica de las superficies es alta y las condiciones de bioseguridad y biocontención muy restrictivas, tratando de determinar la aptitud de los descontaminantes frente a bacterias indicadoras de contaminación y que presentan mayor resistencia que los virus inoculados.

Una instalación de alta contención biológica diseñada para trabajos con agentes biológicos patógenos de nivel 3 (NCB3), debe impedir que se produzca cualquier error en el control biológico ya sea por defectos en la concepción estructural o en la implantación de mecanismos técnicos de biocontención, por ineficacia en los procesos de biodescontaminación escogidos o bien por ausencia en el control de los vectores de transmisión, entendiéndose a estos como aquellos seres vivos u objetos que abandonan la instalación NCB3 en un momento dado [1].

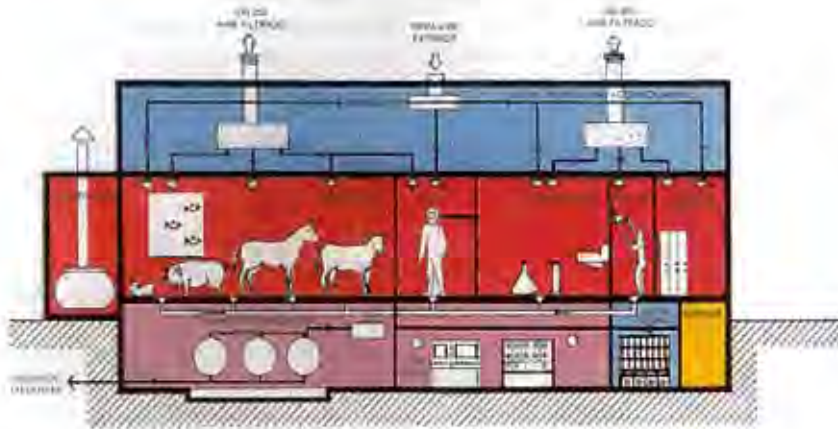
En consecuencia, la instalación y sus espacios de contención biológica, deben contemplar como medidas básicas de biocontención el diseño (preferentemente de tipo *sandwich*) (Fig. 1), los sistemas de ventilación y filtrado de aire (HEPA H14) [3], los sistemas de tratamiento o esterilización de efluentes (*biowastes*, reactores químicos, etc.), la presión negativa en gradiente diferencial unidireccional [2] y finalmente, el control y tratamiento de los residuos biocontaminados tanto sólidos como líquidos ya sea por medios físicos o químicos [4, 5 y 6].

Se debe tener presente que una instalación de alta contención biológica no sólo garantiza su éxito durante su funcionamiento las medidas de biocontención implantadas. Es necesaria la práctica correcta y estricta de bioseguridad basada en el establecimiento de procedimientos normalizados, siendo la descontaminación biológica de áreas de riesgo mediante el uso de sistemas químicos un punto fundamental.

Estos sistemas presentan ventajas y desventajas en su aplicación. Se debe tener en cuenta que pueden manifestarse factores que atenten contra su éxito

FIGURA 1

Estructura de una instalación NCB3



[7] como la incorrecta elección del producto, el exceso en la dilución de la solución y/o un tiempo de contacto insuficiente, unas condiciones termohigrométricas inadecuadas, la presencia de materia orgánica, la aplicación incorrecta, la ausencia de hermeticidad del área o la aplicación continuada de sustancias desinfectantes que actúan como fijadores.

Salvados los anteriores condicionantes, un buen agente biodescontaminante deberá reunir todas o la mayor cantidad posible de las siguientes consideraciones [8 y 9]:

- Acción rápida, eficaz y de amplio espectro.
- Efectivo frente a la presencia de materia orgánica, jabones o detergentes.
- Sin toxicidad para el operario.
- No corrosivo impidiéndose el daño a instalaciones (conductos, rejillas, etc.)
- Buena capacidad de penetración y estabilidad en concentrada y diluida.
- No colorante, sin olor o bien con olor agradable.
- Económico, de fácil uso y fácilmente accesible en el mercado y biodegradable.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es un compuesto químico líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrógeno tal como el agua y que por lo general se presenta como un líquido viscoso. Es capaz de actuar como agente oxidante o como reductor y posee una alta capacidad biodescontaminante con efecto bactericida, esporicida, fungicida y virucida incluso en pequeñas cantidades (0,5 mg/L) y en pocos minutos (1 seg - 12 minutos) dependiendo de la concentración utilizada (0,3 a 12 mg/L) y la temperatura existente (4 a 55°C). Interactúa con la membrana ce-

lular, enzima y ácidos nucleicos, provocando la muerte de los microorganismos por la anulación de las funciones vitales.

Es conveniente conocer que los materiales altamente absorbentes y la presencia de líquidos, condicionan su efectividad y que los productos obtenidos tras su acción son de carácter no tóxico, siendo su impacto medioambiental nulo.

El formaldehído gas es un agente que lisa la pared celular de los microorganismos, actúa sobre ácidos nucleicos y proteínas, dando lugar a una alquilación de los grupos amino y sulfhidrilo y los átomos de nitrógeno del anillo de las bases de purinas, provocando una modificación irreversible en enzimas inhibiendo su actividad. En estado gas, resulta muy soluble en agua y de rápido proceso de polimerización, por lo que un cálculo erróneo en la determinación de las condiciones termohigrométricas del ambiente, provocará la generación de una capa de formaldehído polimerizado con gran un poder corrosivo.

Con el fin de poder eliminar o reducir este riesgo, la generación de una solución acuosa (30-55% de formaldehído), la adición de metanol en una concentración entre el 0,05 y el 15% y el uso de la mezcla en un ambiente con una humedad relativa alta, serán unos condicionantes de uso exigido. El formaldehído residual se neutraliza con vapores de amoníaco obtenidos por calentamiento de hidróxido amónico.

Para poder determinar que un producto químico biodescontaminante ha cumplido su función correctamente, es necesario llevar a cabo una validación microbiológica. Una herramienta de uso convencional, ampliamente utilizada y sobradamente validada es la utiliza-

ción de *Bacillus stearothermophilus* [10]. Los controles microbiológicos confirman si el proceso es capaz de alcanzar la pequeñísima probabilidad de supervivencia microbiana (10^{-6}), considerada en toda la legislación internacional como garantía de esterilidad [13].

Se trata de una bacteria del suelo, termófila, de forma bacilar, quimioorganotrofa, Gram-positiva, que puede aparecer como Gram-negativa en la fase estacionaria. Presenta criptobiosis y resistencia a la desecación, ultravioleta, etc. Acumula dipicolinato cálcico que le confiere termorresistencia y refringencia.

Simultáneamente al uso del bioindicador se utilizan quimioindicadores generalmente de la clase 5 [12]. Son sustancias que mediante una reacción química cambian su aspecto cuando se exponen al biodescontaminante proporcionando una lectura inmediata y junto con los parámetros físicos (presión, humedad, temperatura, tiempo etc.), facilitan la primera indicación de si se han alcanzado las condiciones del proceso de biodescontaminación pre-definidas durante el ciclo [11].

1. Objetivo de estudio

El presente estudio pretende encontrar las diferencias existentes entre los sistemas de descontaminación biológica por peróxido de hidrógeno gas y formaldehído gas en boxes de riesgo clasificados como nivel 3 de biocontención, con el fin de poder decidir la idoneidad del método a utilizar según los resultados de validación biológica conseguidos [14].

El espacio que se pretende validar es el de un box destinado a trabajos experimentales con grandes animales, situado dentro del área de un animalario encontrándose el conjunto bajo los requerimientos nacionales e internacionales exigidos a un área de nivel 3 de biocontención necesario para el desarrollo de trabajos *in vivo* con agentes patógenos de alto riesgo. Este tipo de boxes resultan ser los puntos más críticos existentes en este tipo de instalaciones NCB3, ya que la presencia del agente biológico es masiva y las condiciones físico-técnicas del recinto limitantes.

Bajo estas condiciones se pretende valorar la efectividad e idoneidad de los dos sistemas de descontaminación química en base a la presencia o ausencia de crecimiento del bioindicador una vez sometido al tratamiento, atendiendo especialmente a las siguientes condiciones de temperatura ambiental del box ($^{\circ}C$), velocidad del aire en el box (m/s), hu-

medad relativa (%), tiempo de actuación del gas (minutos) y método de suministro o inyección del gas en el box.

2. Materiales y métodos

El estudio se ha basado en la realización de 10 procesos de biodescontaminación con peróxido de hidrógeno vaporizado, de un box destinado a trabajos *in vivo* con grandes animales (équidos, bóvidos, suídos, óvidos, etc.) inoculados con agentes biológicos patógenos de nivel 3 de riesgo y 10 procesos de biodescontaminación con formaldehído vaporizado. Las condiciones físicas de ensayo se corresponden con un nivel 3 de contención biológica.

En el caso de la utilización del peróxido de hidrógeno vaporizado, los 10 procesos establecidos se realizaron en condiciones idénticas para la fase de deshumidificación y variables para el resto de fases de manera que, en 5 de ellas se establecieron condiciones distintas respecto a los otros 5 ensayos en referencia al flujo de aire, generación del gas y tiempo de actuación del gas.

En el caso de descontaminación por formaldehído gas, de los 10 procesos o validaciones, 5 se realizaron mediante la generación del gas biodescontaminante en continuo y 5 mediante su generación en discontinuo o por pulsos, siendo estos en número de 4 a lo largo de la fase de biodescontaminación.

El box de estudio presenta unas medidas de 4,9 m de fondo, 3,75 m de lado y 3,05 m de alto, dando lugar a un volumen total de 56 m³. Las paredes, techo y suelo del espacio, se presentan enlucidas con tres capas de pintura epoxídica de alta resistencia a la corrosión dispuestas sobre emplaste nivelante (murex), minimizando la presencia de rugosidades, grietas y microfisuras en el conjunto de su superficie.

La recirculación del aire y los gases biodescontaminantes tanto en su inyección como en su retorno, se realiza en ambos casos, a través de la presencia de dos filtros HEPA interpuestos en su recorrido y situados dentro de los generadores [1].

La puerta de acceso al conjunto del box (vestíbulo y espacio de animales), presenta una goma neumática en su perímetro que permite el ajuste estanco entre puerta y marco y por lo tanto imposibilita el escape del gas y los sumideros existentes en el espacio, se sellaron mediante placas de metacrilato unidas a la superficie por cordón de masilla expansiva estanca.

Los puntos de impulsión y retorno de aire se mantuvieron cerrados mante-

niéndose la estanqueidad del área. La humedad relativa se fijó baja (<35%) para el caso del peróxido de hidrógeno y alta (>70%) para el caso del formaldehído. De esta forma se concedió al espacio de estudio la humedad más adecuada para cada método garantizándose al máximo el poder descontaminante. La temperatura y la velocidad de flujo de aire se establecieron de igual forma en ambos casos de biodescontaminación.

2.1. Generación de peróxido de hidrógeno gas

La producción de peróxido de hidrógeno gas, está condicionada al uso de un tipo de generador (VHP 1000)[®] de la empresa STERIS que se situó en el exterior del box. En el interior, se instaló un sistema de canalizaciones y valvulería *in-situ* en acero inoxidable AISI 314. Las válvulas permitieron la apertura y/o cierre de los conductos facilitando la inyección del gas mediante acoplamiento de mangueras flexibles fabricadas en polipropileno, situando el punto de salida de la manguera de distribución de peróxido de hidrógeno, en la zona final del box evitando acodamientos. El proceso de biodescontaminación constó de cuatro fases (Fig. 2) [15]:

- Deshumidificación: En esta primera fase, se baja la humedad relativa de la estancia a un rango del 10 al 30 %. El volumen de la estancia es el factor limitante.
- Acondicionamiento: El propósito es la introducción de una alta cantidad de peróxido de hidrógeno en estado de vapor en un breve periodo de tiempo. Los factores limitantes son la temperatura de la estancia y la concentración de microorganismos.

- Biodescontaminación: Donde es mantenida la concentración de peróxido de hidrógeno en estado de vapor por encima del punto de humedad relativa. Los factores limitantes de la fase son el volumen y la temperatura de la estancia [16].

- Aireación: Destinada a la eliminación del peróxido de hidrógeno de la estancia, tal que: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Los factores limitantes de la fase son el volumen de la estancia, el material a descontaminar y la concentración del peróxido de hidrógeno.

El contenido de peróxido de hidrógeno durante el proceso en el box y en el colector de flujo de salida del gas hacia el equipo generador, fue medido mediante un monitor específico dispuesto en continuo y se mantuvo en un rango de 0,1 a 275 ppm. Este hecho se apoyó con la colocación de 25 quimioindicadores.

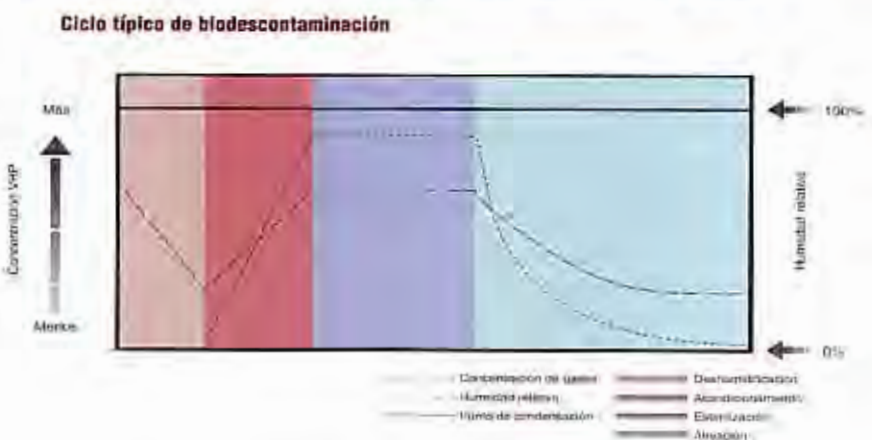
El proceso de biodescontaminación, se dio por finalizado, cuando se aseguró que la concentración del peróxido de hidrógeno en el interior del box era menor de 1 ppm [18]. En ese momento se realizó el acceso al box para llevar a cabo la recogida de los quimioindicadores y bioindicadores. Para la validación del proceso, se programaron dos ciclos distintos de generación de peróxido de hidrógeno, desarrollándose cada ciclo en cinco ocasiones.

2.2. Generación de formaldehído gas

La producción de formaldehído gas está condicionada al uso de un generador que permite la variación de las condiciones físicas del compuesto, que en condiciones de almacenamiento se presenta en estado líquido denominándose formal o formalina.

FIGURA 2

Fases del ciclo de biodescontaminación con peróxido de hidrógeno: deshumidificación, acondicionamiento, biodescontaminación y aireación



El método de generación física pasa por el calentamiento (sublimación) de la solución comercial de paraformaldehído (formaldehído polimerizado obtenido por concentración de fórmol) hasta su estado de vapor, controlando las condiciones de temperatura seca y húmeda dentro de un rango establecido de 18°C a 23°C y oxidando finalmente la formalina en permanganato potásico.

La humedad relativa y la velocidad del aire presente en el área a tratar se obtuvieron mediante un sistema de humidificación automático y regulable y el propio sistema de inyección del gas. Ambos parámetros permitieron la propagación del gas, facilitando su penetración uniforme sobre microirregularidades y microfisuras [17].

El equipo generador se situó en el exterior del box con el fin de minimizar los riesgos sobre las personas, reducir las incidencias sobre los equipos sometidos al gas y permitir el control completo de los procesos a tiempo total.

El proceso de validación se ha basado en el uso de bajas temperaturas, alta humedad relativa y el empleo de formaldehído en fase vapor, partiendo de una solución acuosa de 700 ml de formaldehído al 37%, + metanol al 10% (el conjunto formalina) y 700 ml de agua desionizada. Durante el desarrollo de los procesos, la concentración de formaldehído fue medida mediante un monitor específico en continuo de la marca Foramallow calibrado en mayo del 2009 y se colocaron 25 quimioindicadores en el conjunto del área sin que hubiese coincidencia física con los bioindicadores colocados, de forma que la aparición de viraje (cambio de color) garantizase la presencia y permanencia del gas en el mayor número de puntos posibles.

Alcanzada la humedad relativa requerida, se aplicaron dos ciclos distintos:

- Inyección continua de formaldehído vaporizado.
- Inyección discontinua (por pulsos) de formaldehído vaporizado, alternando con pulsos de vapor de agua desionizada.

3.3. Flujo de aire y distribución de temperaturas y humedades relativas

Tanto la temperatura como la humedad relativa fueron medidas en continuo mediante 5 termohigrómetros integradores compuestos de múltiples sondas marca Testo, calibrados en julio de 2009 y la velocidad del aire fue medida antes de cada ensayo mediante un anemómetro marca Testo, calibrado en julio de 2009. En todos los casos no se detectó

una variación superior al 0,1 m/s y gracias al uso de las máquinas generadoras de humo de la marca Drager, se pudo comprobar que el aire dentro del box, se repartía uniformemente permitiendo el acceso del gas descontaminante a todos los puntos existentes dentro del espacio de estudio.

Para medir la distribución de la temperatura, humedad relativa y el flujo de aire en el espacio de estudio, este fue dividido en tres niveles: 0 a 10 cm respecto al suelo, 30 a 270 cm respecto al suelo y 0 a 10 cm respecto al techo.

La salida del gas inyectado en el interior del box desde las máquinas generadoras, se situó al fondo del espacio a 5 cm del suelo y el punto en el interior del box de recogida del gas hacia los equipos generadores (recirculación), quedó situado a 5 cm del techo y en el punto contrario a la inyección del gas.

3.4. Indicaciones químicas

Los quimioindicadores fueron distribuidos uniformemente en puntos no coincidentes a los establecidos para los bioindicadores, de forma que se pudiese garantizar que los gases descontaminantes alcanzaron todos los puntos del espacio de estudio.

Los quimioindicadores específicos de peróxido de hidrógeno en presencia del gas, viran su color original gris azulado a beige. (Steris NB305 VHP Chemical Indicator; Lote 227519/1/A; Fecha de caducidad 06/01/09).

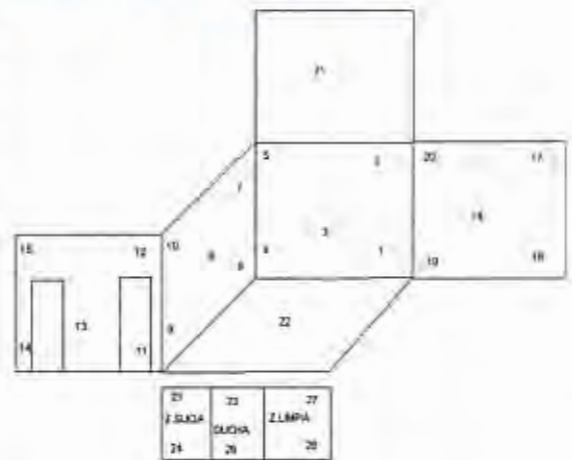
En el caso del formaldehído, el viraje se realiza del blanco al rosa pálido. (Drager formaldehído 2/a Ref 81 01751; Rango 2 a 40 ppm; Temperatura 0-40 °C; Humedad: 3..15 mg H₂O/L; Principio reactivo: HCHO + C₆H₄(CH₃)₂ + H₂SO₄ → productos reactivos quinoides).

3.5. Indicadores biológicos

Como indicadores biológicos para los procesos con peróxido de hidrógeno, se han utilizado discos provistos de un soporte de poliflex (poliestireno) donde se ubican las esporas de *Bacillus stearothermophilus*. Este soporte presenta un diámetro de aproximadamente 3/8". La población de esporas inoculadas es de 1,0 x 10⁵ a 5,0 x 10⁵ (ufc) por disco. Las esporas van colocadas bajo una envuelta de Tyvek®/clar Mylar® específica para uso de peróxido de hidrógeno gas

FIGURA 3

Disposición de bioindicadores en el box



[19]. El Tyvek permite el paso del gas mientras que la porción de Mylar de la envuelta resulta impermeable. Los datos de registro del producto utilizado fueron: Spordex® VHP® NA 300 PBI; embalaje primario: envoltorio Tyvek/clear and Mylar. Portador de esporas: disco de poliestireno de pequeño tamaño. Especie bacteriana: *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953). Pureza: menos de un 1% de bacterias contaminadas de la población marcada. Product N° MSPS N° S125. Prepared by M. Ebers.

Para los controles biológicos en el caso del formaldehído gas, se han utilizado los mismos bioindicadores desprovistos de la envuelta de Tyvek, de manera que se facilitase en todo momento y al máximo la penetración del gas.

3.6. Estrategia de muestreo

En los 10 ensayos realizados para cada biodescontaminante, los bioindicadores se colocaron en idéntica posición, en base a cubrir aquellos puntos en los que existiese mayor dificultad de acceso del gas en el espacio del box (esquinas, conductos, etc.) y aquellos otros en los que por las características del mismo, se pueda presentar mayor carga biológica (suelo) [20] (Fig. 3).

En el proceso de control biológico, se etiquetaron los controles biológicos y se les asignaron números, identificando así las posiciones en las cuales van situados y se señalaron en las hojas de control.

Una vez recogidos los bioindicadores, fueron almacenados a una temperatura de entre 2°C y 8°C y bajo una humedad relativa del 30% al 80%. En ningún momento se mantuvieron en condiciones de congelación y se encontraron apartados durante el almacenamiento lejos de otras muestras bio-

lógicas, compuestos esterilizantes o inhibidores del crecimiento y productos químicos con poder oxidante o reductor (amoníaco, formaldehído, etc.) [21].

La preparación de los bioindicadores para su cultivo se realizó en todo momento bajo cabina de Seguridad Biológica marca Telstar BioIIA [22]. Bajo esta condición, se procedió a la apertura de la envuelta de cada disco, separando los films de Mylar® y de Tyvek®.

El cultivo se llevó a cabo en medio de soja tripticaseína (pH 7.3 ± 0.2), realizándose la transferencia de los discos de esporas mediante un forceps estéril. Se aseguró que los discos quedasen totalmente sumergidos en el medio procediendo a la agitación de los tubos y una vez finalizado el proceso con cada disco, estos se introdujeron en un incubador marca Nuair a 55-60°C durante 7 días.

Los resultados se fijaron como positivos (crecimiento) o negativos (ausencia de crecimiento).

3.7. Monitorización microbiológica. Prueba adicional

Adicionalmente a las pruebas realizadas, se llevó a cabo en dos ocasiones una monitorización microbiológica del conjunto de la estancia. Se realizó un recuento de las colonias totales de bacterias y hongos antes y después de la realización de los ciclos de descontaminación biológica mediante los siguientes métodos:

PROBIS CON HISOPO Y SIEMBRÁ EN PLACA PETRI:

Toma de muestras con hisopos de paredes, suelos y techos en las zonas más desfavorables. Los hisopos se encapsularon en medio estéril y se realizó una siembra en medio sólido (Agar nutritivo) en placa Petri. Tras 48 h de incubación, se observó la existencia de unidades formadoras de colonias.

MUESTREO DE AIRE MEDIANTE SAS:

El muestreo de microorganismos en el aire dentro del box, se realizó con el sistema "RCS Plus" de la marca Biotest el cual está diseñado para determinar la calidad microbiológica del medio ambiente y la eficacia de los métodos de desinfección. Este sistema, permite obtener la disposición cuantitativa de microorganismos del medio ambiente desde un máximo de 1 m³ de aire recogido.

3. Resultados y discusión

3.1 Proceso con peróxido de hidrógeno gas

Las temperaturas y las humedades relativas mantenidas durante los 20 ensayos

realizados (10 + 10) no sufrieron variaciones respecto a los valores prefijados para la acción biodescontaminante en más de 4°C y 15% respectivamente. Los puntos de medición fueron coincidentes con los puntos donde se ubicaron los bioindicadores.

Los resultados finales para condiciones de temperatura (Fig. 4) y de humedad relativa (Fig. 5) obtenidos para ambos ciclos, se corresponden con la media obtenida para cada punto durante el desarrollo de los ensayos.

FIGURA 4

Distribución de temperaturas medias. Puntos 6, 7, 23, 24 y 25 vestíbulo del box; resto, espacio propio del box; puntos de 1 a 6: 10 cm del techo. Puntos de 7 a 14: 150 cm de suelo; puntos de 15 a 25: 10 cm del suelo

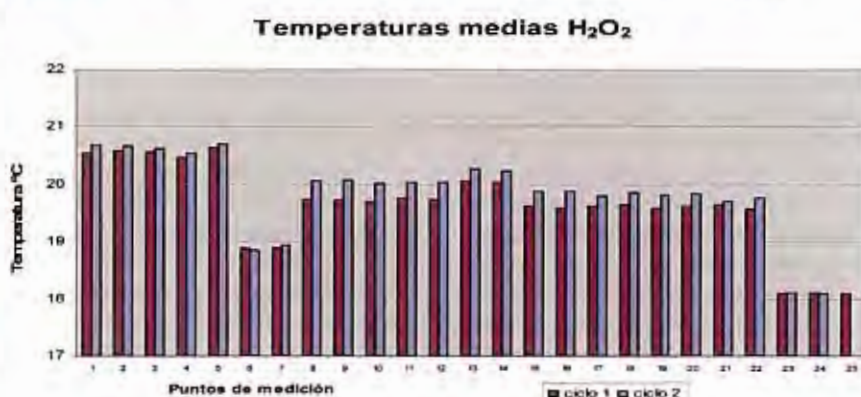


FIGURA 5

Distribución de humedades relativas medias. Puntos: 6, 7, 23, 24, 25 vestíbulo del box; resto, espacio propio del box; puntos de 1 a 6: 10 cm del techo; puntos de 7 a 14: 150 cm de suelo; puntos de 15 a 25: 10 cm del suelo

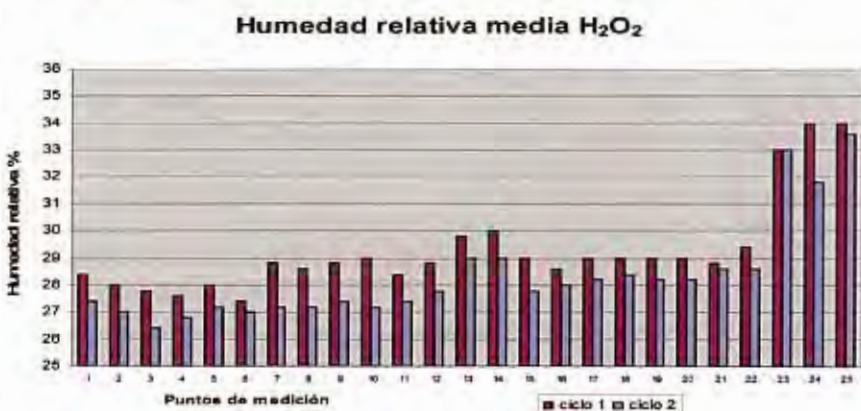


Tabla 1

Comparación de zonas del área testada CICLO 1

| Localización | Indicadores químicos colocados | Indicadores químicos virados | Indicadores biológicos colocados | Indicadores biológicos crecimiento |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Espacio de box | 100 | 100 | 100 | 0 de 100 |
| Vestíbulo de box | 25 | 25 | 25 | 3 de 25 |

Los quimioindicadores empezaron a mostrar cambios en la coloración (amarillo a gris violeta) entre los 20 y los 27 minutos del comienzo de la inyección del peróxido de hidrógeno. La coloración cambió totalmente entre los 45 a 49 minutos.

CICLO 1

Bajo los parámetros fijados previamente de flujo de aire 32 cu m/h, concentración de peróxido de hidrógeno inicial a inyectar en el interior del box de 2,3 y tiempo de actuación del esterilizante químico de 120 min, no se observa crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en ningún punto del interior del box.

Aparece crecimiento en la zona del vestíbulo de acceso al box y en concreto en los suelos de la zona de ducha y “zona de limpio” (Tabla 1).

Estas zonas son las menos comprometidas (no son consideradas a efectos de bioseguridad como zonas críticas) al ser zonas constantemente sometidas a descontaminaciones adicionales por arrastre y dilución.

Una menor temperatura en estas zonas (entre 1,5 y 2,1°C) respecto al propio box, facilita un aumento de la humedad relativa que genera condensaciones de agua favoreciendo la fijación del peróxido de hidrógeno gas limitando su eficacia.

CICLO 2

Bajo los parámetros fijados de flujo de aire 32 cu m/h, concentración de peróxido de hidrógeno inicial a inyectar de 6,0 y tiempo de actuación de 80 min, no se observa crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en ningún punto del box.

Con mayor dominancia que en el CICLO 1, aparece crecimiento en la zona del vestíbulo de acceso al box (Tabla 2) y en concreto en los suelos de la “zona de sucio”, ducha y “zona de limpio”.

Esta diferencia, en condiciones similares de temperatura, velocidad del aire y humedad relativa, se atribuye al uso de una mayor concentración del gas, no influyendo el tiempo de actuación, lo que favorece una mayor fijación del gas a los puntos de condensación de agua generados a lo largo del proceso.

3.2. Proceso con formaldehído gas

Las temperaturas y las humedades relativas mantenidas durante los 20 ensayos realizados (10 + 10) no sufrieron variaciones en más de 4°C y 15% respectivamente.

Los resultados finales, se corresponden con la media obtenida para cada

punto durante el desarrollo de los ensayos. La temperatura (Fig. 6) se mantuvo durante el proceso por debajo de los 21, 5°C y la humedad relativa (Fig. 7) por encima del 70% en todos los puntos del conjunto del box.

Los puntos de medición fueron coincidentes con los puntos donde se ubicaron los bioindicadores.

Los quimioindicadores, mostraron cambios en la coloración (amarillo a gris violeta) entre los 15 y los 20 minutos

FIGURA 6

Distribución de temperaturas. Puntos: 6, 7, 23, 24, y 25 vestíbulo del box; Resto, espacio propio del box; puntos de 1 a 6: 10 cm del techo; puntos de 7 a 14: 150 cm de suelo; puntos de 15 a 25: 10 cm de suelo

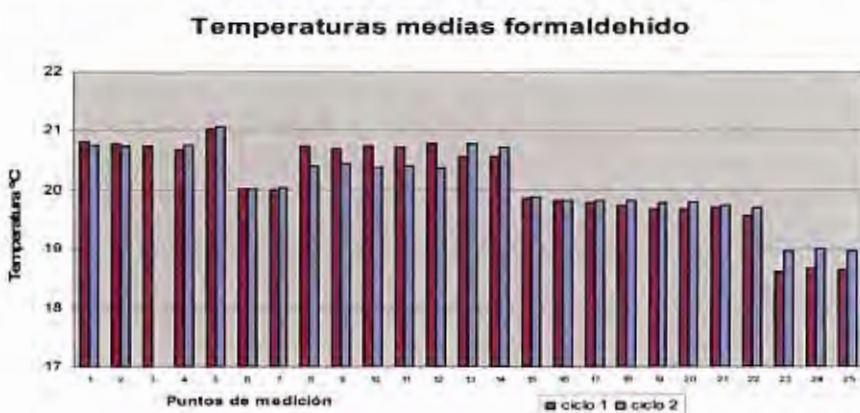
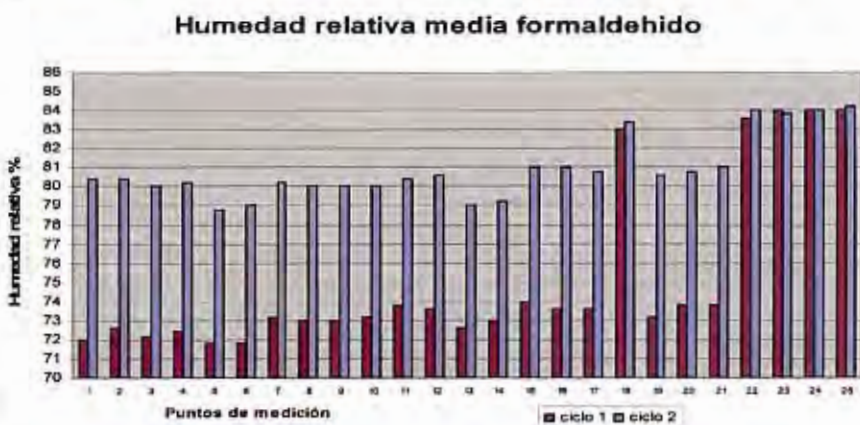


FIGURA 7

Distribución de humedades relativas medias; puntos: 6, 7, 23, 24 y 25 vestíbulo del box; resto, espacio propio del box; puntos de 1 a 6: 10 cm del techo; puntos de 7 a 14: 150 cm de suelo; puntos de 15 a 25: 10 cm de suelo



| Tabla 2 | | | | |
|--|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Comparación zonas del área testada CICLO 2 | | | | |
| Localización | Indicadores químicos colocados | Indicadores químicos virados | Indicadores biológicos colocados | Indicadores biológicos crecimiento |
| Espacio de box | 100 | 100 | 100 | 0 de 100 |
| Vestíbulo de box | 25 | 25 | 25 | 5 de 25 |

Tabla 3

Comparación zonas del área testada CICLO 1

| Localización | Indicadores químicos colocados | Indicadores químicos virados | Indicadores biológicos colocados | Indicadores biológicos crecimiento |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Espacio de box | 100 | 100 | 100 | 2 de 100 |
| Vestíbulo de box | 25 | 25 | 25 | 7 de 25 |

Tabla 4

Comparación zonas del área testada CICLO 2

| Localización | Indicadores químicos colocados | Indicadores químicos virados | Indicadores biológicos colocados | Indicadores biológicos crecimiento |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Espacio de box | 100 | 100 | 100 | 6 de 100 |
| Vestíbulo de box | 25 | 25 | 25 | 7 de 25 |

del comienzo de la inyección del formaldehído. La coloración cambió totalmente entre los 25 y 30 minutos.

CICLO 1

Bajo los parámetros fijados previamente de flujo de aire 36 cu m/h, concentración de formaldehído inicial a inyectar en el interior del box de 6,0 y tiempo de actuación del esterilizante químico de 120 min, se observan dos puntos de crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en el interior del box.

Aparece crecimiento en el vestíbulo de acceso al box y en concreto en los suelos de la zona de ducha, “zona de limpio” y zona de sucio” (Tabla 3). Una mayor humedad relativa presente en esta zona genera condensaciones de agua que permite la fijación del formal-

dehído gas, limitándose su eficacia biodescontaminante.

CICLO 2

Bajo los parámetros prefijados de flujo de aire 32 cu m/h, concentración inicial del gas en el box de 6,0 y tiempo de actuación de 180 min, se observa crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en puntos del box cercanos al vestíbulo de acceso.

Con mayor dominancia que en el desarrollo del CICLO 1, aparece crecimiento en la zona del vestíbulo de acceso al box y en concreto en los suelos de la zona “de sucio”, ducha y “zona de limpio” (Tabla 4). Esta diferencia, se debe al incremento de la humedad relativa en estos puntos generada por la aplicación de pulsos de vapor de agua durante el proceso, lo que provoca una mayor condensación de vapor de agua.

A partir de un grado de humedad del 83% aumenta significativamente la cantidad de condensaciones, fijándose con rapidez el formaldehído en esos puntos, descendiendo su concentración en ambiente dando lugar a una pérdida de efectividad.

3.3 Monitorización microbiológica. Prueba adicional

Los resultados obtenidos (Tablas 5 y 6), expresan resultados totales medios conseguidos con los diferentes métodos en muestreos de superficies y aire.

3.4 Comparación de procesos

Se ha podido observar que la difusión del peróxido de hidrógeno se realiza de forma más completa que en el caso del formaldehído, obteniéndose un menor número de puntos críticos. Para conseguir similares resultados con el formaldehído gas, es necesario aumentar la concentración y el tiempo de actuación del formaldehído, resultando entonces el método muy poco ventajoso para este ambiente de estudio.

Por otro lado se han podido determinar dos situaciones con origen común que influyen negativamente en la eficacia de los métodos. Si el proceso limpieza del box previo a la biodescontaminación no se realiza de una forma profunda, se permite la presencia de materia orgánica e inorgánica y la generación de cristales de sales capaces de bloquear la difusión de los agentes biodescontaminantes, situación que ya describieron Abbott, Cockton y Jones en 1956.

Si después del proceso de limpieza no se lleva a cabo un secado idóneo de los paramentos, la presencia de agua en rugosidades y fisuras fijan tanto al peróxido de hidrógeno como al formaldehído con afinidad, inutilizándolos y generando en el caso del formaldehído, además, una fina película de paraformal-

Tabla 5

Resultados microbiológicos antes y después de la esterilización del box por H₂O₂

| Localización de la muestra | Total CFU ^a antes de la gasificación | Total CFU ^a después de la gasificación | Colonias hongos antes de la gasificación ^b | Colonias hongos después de la gasificación ^b |
|----------------------------|---|---|---|---|
| Superficies del box | 426 ± 151 | 2 ± 1 | 337 ± 83 | 0 CICLO 1 |
| | 431 ± 160 | 3 ± 1 | 341 ± 85 | 0 CICLO 2 |
| Aire | 330 ± 107 | 0 | 290 ± 76 | 0 CICLO 1 |
| | 328 ± 105 | 1 ± 1 | 293 ± 80 | 0 CICLO 2 |

^a Número de unidades formadoras de colonias por 100 cm² por superficie de contacto en suelo o por 1 L de aire muestreado. Resultados totales de 10 test con ± 1% de desviación estándar. CFU ≥ 5 son consideradas significativas.

^b Número total de colonias de hongos por 100 cm² por superficie de contacto en suelo ó por 1 L de aire muestreado.

Tabla 6

Resultados microbiológicos antes y después de la esterilización del box por HCHO

| Localización de la muestra | Total CFU ^a antes de la gasificación | Total CFU ^a después de la gasificación | Colonias hongos antes de la gasificación ^b | Colonias hongos después de la gasificación ^b |
|----------------------------|---|---|---|---|
| Superficies del box | 435 ± 160 | 3 ± 1 | 344 ± 90 | 0 CICLO 1 |
| | 431 ± 155 | 4 ± 1 | 345 ± 90 | 1 CICLO 2 |
| Aire | 342 ± 119 | 0 | 299 ± 85 | 0 CICLO 1 |
| | 431 ± 155 | 3 ± 1 | 297 ± 81 | 1 CICLO 2 |

^a Número de unidades formadoras de colonias por 100 cm² por superficie de contacto en suelo o por 1 L de aire muestreado. Resultados totales de 10 test con ± 1% de desviación estándar. CFU ≥ 5 son consideradas significativas.

^b Número total de colonias de hongos por 100 cm² por superficie de contacto en suelo ó por 1 L de aire muestreado.

dehído. Este, se incorpora en la microrugosidades y microfisuras existentes en los paramentos, resultando muy complicada su eliminación, necesiéndose largos tiempos de neutralización y aireación.

Los pulsos de vapor saturado en el caso del formaldehído, permiten la disolución de los cristales tanto de sales como de proteínas presentes en la materia orgánica e inorgánica no eliminada, facilitando la penetración del gas, alcanzándose mejores condiciones en determi-

nados puntos del box pero peores en otros, al permitirse una fijación del formaldehído a zonas de condensación de agua. Esta fijación, conlleva una bajada de los niveles del gas en la estancia, no alcanzándose en algún punto (vestíbulo del box) la concentración mínima necesaria en relación al tiempo de actuación como para resultar eficaz, permitiendo el crecimiento de *Bacillus stearothermophilus*.

Por otro lado, a pesar del aumento del tiempo se sigue produciendo for-

maldehído gas por encima de 0,3 ppm de forma natural que no ha podido ser neutralizado hasta 48 después de finalizado el proceso, es decir por encima de su Valor Límite Ambiental (VLA) para exposiciones de corta duración (<15'), resultando el ambiente nocivo para la salud del operario.

El resultado final se traduce en un tiempo de restablecimiento del box a condiciones de trabajo de experimentación con animales, de entre 48 y 72 horas.

CRC Vestilab®
Clean Room Control

El Control total de la Sala Blanca
Total Clean Room Contamination Control



4. Conclusiones

Aunque los dos sistemas de biodescontaminación valorados demuestran una eficacia adecuada y por lo tanto resultan correctos en su uso para espacios (boxes) de alta contaminación biológica (nivel 3), se detectan variaciones suficientemente significativas en los resultados microbiológicos alcanzados entre ambos.

1. Aunque la actuación del formaldehído gas en las primeras etapas, es más rápida con el formaldehído (el viraje de color de los quimioindicadores se produce en los primeros 30'), que con el peróxido de hidrógeno (49'), no se traduce en una actuación más efectiva en la finalización de los procesos.
2. El tiempo invertido en el desarrollo del proceso con peróxido de hidrógeno gas resulta menor (120' frente a 240') obteniéndose mejores resultados de ausencia de crecimiento y por lo tanto de efectividad.
3. La diferencia en los resultados obtenidos entre ambos métodos y entre los ciclos desarrollados en cada método, está basada principalmente en el procedimiento de inyección del producto químico biodescontaminante. Esta diferencia se traduce en una variación de la humedad relativa alcanzada en puntos específicos, de forma que a medida que va transcurriendo el proceso de biodescontaminación y aumenta la humedad relativa, se empiezan a producir condensaciones de agua.
4. La temperatura alcanzada dentro del área del box incluido su vestíbulo de acceso y salida, influye en la actividad biodescontaminante de ambos gases.
5. Una velocidad del aire baja y una mayor temperatura, dificulta por un lado la difusión del gas y por otro facilita el mantenimiento de una humedad relativa ambiental en la zona que permite la generación de condensaciones de agua que fijan el gas.
6. La fijación de los gases impide su difusión y por lo tanto su acción biodescontaminante.
7. El formaldehído gas se fija con mayor intensidad que el peróxido de hidrógeno gas al agua condensada, dando como consecuencia una bajada más significativa del biodescontaminante en el medio, limitando más su acción.
8. En condiciones de biodescontaminación con peróxido de hidrógeno gas, a mayor tiempo de actuación aunque permita la generación de un mayor tanto por ciento de humedad relativa se traduce en un menor crecimiento del bioindicador.

9. En condiciones de biodescontaminación con formaldehído gas, a mayor tiempo de actuación mayor generación de humedad relativa, lo que se traduce en presencia de quimioindicadores no virados y mayor crecimiento de bioindicadores.
10. Entre los gases biodescontaminantes utilizados, comparando los mejores resultados obtenidos, se puede concluir que con el empleo de peróxido de hidrógeno gas se obtienen mejores resultados en la mitad de tiempo de proceso.
11. El peróxido de hidrógeno no requiere neutralización posterior a la biodescontaminación, lo que por un lado optimiza el tiempo y por otro elimina la posibilidad de generación de gas residual proveniente del agente químico neutralizante.
12. *Per se*, el formaldehído presenta mayor nocividad en su uso que el peróxido de hidrógeno tanto para el operario como para el medioambiente.

Como conclusión final se puede afirmar, que en base a los resultados microbiológicos obtenidos y en función de los parámetros físicos establecidos para el desarrollo de los distintos ensayos de validación, el peróxido de hidrógeno gas muestra mayores garantías de seguridad, fiabilidad y ausencia de efectos secundarios que el formaldehído gas para recintos o espacios de nivel 3 de Contención Biológica destinados a grandes animales que están sometidos a experiencias de investigación con agentes patógenos de alto riesgo.

Bibliografía

[1] Centers for Disease Control and Prevention. National Institutes of Health (CDC-NIH) / U.S. Department of Health and Human Services; Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories; 4th Edition, May 1999; Washington.
 [2] Kennedy, M.E. Laboratory Biosafety Guidelines, segunda edición; Laboratory Centre for Disease Control, Health. Canada, Ottawa, 1996.
 [3] Peichl, P. Health, safety and environmental protection in a biological research laboratory. Int. Arch Occup Environ Health. 2000 Jun; 73 Suppl.
 [4] Hill D.; Safe handling and disposal of laboratory animal waste. Occup Med. 1999 Apr Jun; 14(2): 449-468.
 [5] Russell, A.D. W.B. Hugo y C.A.J. Ayliffe (eds). Desinfection, Preservation and Sterilization, Blackwell Science Ltd., Oxford, 1999.

[6] Alfa M J., PhD; P De Cagne, RT;N. Olson, BSc; T. Puchalski, BA. Comparison of Ion Plasma, Vaporized Hydrogen Peroxide, and 100% Ethilene Oxide Sterilizers to the Ethilene oxide gas Sterilizer. Infrer. Control & Hospital Epidemiol. 1996; 17:92-100.
 [7] Mc Donnell, G y A.D. Rusell. Antiseptics and desinfectants: Activity, Action and Resistance. Clin. Microbiol. Rev., 1999.
 [8] Rutala W A APIC guideline for selection and use of desinfectants. Am. J. Infect Control, 1990.
 [9] Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reino Unido. Diseases of Animals (Approved Disinfectants) Order. HMSO, Norwich, 1994.
 [10] European Standard EN 866 Biological Systems for testing sterilizers and sterilization processes. European Committe for Standardization, 1997.
 [11] Norma ISO 11140-1 Indicadores Químicos.
 [12] CEN documento 867-1 define gama de Indicadores.
 [13] Norma Din 58948 (1998) Esterilización por formaldehído. EN 866-5 (1998) Norma europea de indicadores para probar eficacia de esterilizadores de Formaldehído.
 [14] García-Saavedra, M.J. y Vicente, J.C. Técnicas de descontaminación. Editorial Paraninfo, Madrid, 1997.
 [15] Klapes, N.A. and D. Vesley. 1990. Vapour-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterilant. Appl. Environ. Microbiol. 56: 503-506.
 [16] Low Temperature Sterilization alternatives in the 1990s. Philip M. Schneider. Tappi Journal, Vol. 77, N°1, January 1994.
 [17] Nordgren C. Investigations of the sterilizations efficiency of gaseous formaldehyde. Acta Patol Microbiol. Escand 1939.
 [18] Malmborg, A., M. Wingren, P. Bonfield, And G. Macdonnell. 2001. Room decontamination with vapourized hydrogen peroxide. Cleanrooms, Nv., 2001.
 [19] Kokubo, M., T. Inoue, and J. Akers. 1998. Resistance of common environmental spores of genes Bacillus to hydrogen peroxide vapour. PDA J. Pharm Sci. Technol. 52: 228-231.
 [20] ANSI/AAMI ST46:2002). Steam Sterilization and Sterility Assurance in Healthcare Facilities.
 [21] Rutala W A Gergen M F Weber D J Sporicidal activity of chemical sterilants used in hospitals. Infect Control Hosp. Epidemiol. 1993.
 [22] CDC/NIH. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Primary Containment for Biohazards. Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets; Washington, 1995. ■