

## Desinfectantes, biocidas... ¿cuál es el más adecuado?

**Francisco Javier García Palomo**

Presidente de la Asociación Española de Bioseguridad (AEBioS)

### INTRODUCCIÓN

Hace algún tiempo, me decía un colega experto en alta contención, que si un procedimiento no estaba validado “en campo” no era adecuado utilizarlo en tu laboratorio. Muchos de los desinfectantes y biocidas actualmente aprobados para desinfección por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) están testados contra varios microorganismos representativos de todo tipo de bacterias, virus, etc. Aunque estos ensayos son una buena indicación de su espectro y actividad, no deberíamos fiarnos; siendo la validación de cada proceso, con las cepas, procedimientos y en las condiciones en las que los vamos a utilizar, la que debería convertirse en rutina previa a su elección y uso.

La evaluación antimicrobiana de los biocidas ha de incluir cuatro fases de testado. La primera fase consiste en determinar la actividad antimicrobiana básica del producto (mediante ensayos *in vitro*), enfrentando suspensiones de distintos microorganismos al desinfectante. Posteriormente, en la segunda fase, se ha de determinar si el desinfectante posee actividad antimicrobiana en las condiciones prácticas para un determinado uso, a una concentración específica y tiempo de contacto necesario, compatibles con el material a desinfectar y la operatividad de este. Estos ensayos de “fase 2” han de dividirse en dos etapas; en una primera (fase 2, etapa 1) se determina la actividad antimicrobiana específica para una determinada aplicación (ensayos de suspensión amplificados); mientras que en la segunda (fase 2, etapa 2), se evalúan las prácticas específicas del biocida (lavado de manos, instrumental, desinfección de superficies...).

En la tercera fase de evaluación, se testa la actividad del desinfectante mediante un método experimental con el equipo implicado en su manipulación. Éste se contamina artificialmente y se estudia la reducción o tasa de supervivencia del número de microorganismos por la acción del desinfectante. Finalmente (cuarta fase), el desinfectante se evalúa en la práctica, mediante el

seguimiento y registro del resultado de la desinfección en su aplicación diaria.

Actualmente, se dispone de varios métodos oficiales para las dos primeras fases; sin embargo, aún no ha sido posible la estandarización para las dos siguientes. Legalmente, para poder reivindicar actividad específica de un producto frente a un determinado microorganismo, se deben realizar ensayos de fase 1 y 2 mediante diferentes estándares en un laboratorio acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), y presentarlo a la AEMPS para su revisión y aprobación. Por ejemplo, se utiliza EN 14476 para virus, EN 14563 para bacterias o EN 1276 y EN 13727 si buscamos actividad esporicida.

Para todos estos ensayos, hay cepas de microorganismos específicas con las que realizarlos. Para la prueba de la Norma UNE-EN 14476 –actividad virucida general– se requiere realizar, obligatoriamente, el ensayo con las siguientes tres cepas virales: Poliovirus tipo 1, Adenovirus tipo 5 y Norovirus murino. Esto se debe a que estos virus son más resistentes a la acción de los desinfectantes, y cuando uno es activo frente a ellos, puede considerarse efectivo frente a otros virus no probados. Si la prueba se realiza con otras especies o cepas, se podría certificar que el desinfectante muestra actividad frente a esa especie/cepa viral, pero no cumpliría con el requisito de la norma para ser considerado virucida general. Por eso, cuando introducimos un nuevo agente en nuestro laboratorio, máxime si se trata de uno de los grupos de riesgo 3 o 4, resulta obligado buscar un biocida que muestre actividad contra ese patógeno. En cambio, si el fabricante no lo ha testado específicamente, no resultaría “bio-seguro” utilizar ese producto, si no ha realizado al menos los ensayos de fase 1 y 2 específicamente contra nuestro agente.

En cualquier caso, los ensayos generales de fase 1 y 2 se realizan en condiciones de laboratorio muy específicas y controladas; y casi siempre la superficie, el modo de aplicación, la carga orgánica asociada o el propio título del microorganismo están muy lejos de

lo que se probó *in vitro*, por lo que deberían tomarse como test indicativos generales de actividad.

*"Bioseguridad –como dice el manual de la WHO (del inglés World Health Organization)– es el conjunto de principios de contención, tecnologías y prácticas usadas para minimizar el riesgo derivado de la manipulación de patógenos, por lo que cualquier tecnología (en este caso la actividad biocida) debería ser evaluada en el contexto de su uso";* es decir, realizando lo que hemos denominado ensayos de "fase 3". Contestando a la pregunta que hacía al principio, y explicándolo de la manera más sencilla, sería el

que con el microorganismo con el que trabajaremos, en su medio de almacenamiento o cultivo, con los materiales involucrados en su uso, y con la técnica de aplicación diseñada para la sustancia a evaluar logra el objetivo de reducción logarítmica buscado.

El artículo que transcribo a continuación es un buen ejemplo de un estudio en fase 3. Fue realizado en el Centro de Referencia FAO (del inglés *Food and Agriculture Organization*) Gestión del Riesgo Biológico (FAO-INIA, situado en Valdeolmos-Madrid), con un organismo del grupo de riesgo 3, en la localización y condiciones reales de uso y para el microorganismo con el que se iba a trabajar.

## Eficacia de Rely+On™ Perasafe™ ante contaminaciones accidentales de Sars-CoV en superficies de cabinas de seguridad biológica

**Mengíbar M.P.<sup>2</sup>, Garrido D.<sup>2</sup>, Fernández R.<sup>3</sup>, Castaño C.<sup>3</sup>, y Pascual G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Director del Centro de Referencia FAO Gestión del Riesgo Biológico (FAO-INIA). Jefe de Servicio de Seguridad Biológica. CISA-INIA

<sup>2</sup>Técnico de Seguridad Biológica. VEOLIA

<sup>3</sup>Personal científico. Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIF)

### INTRODUCCIÓN

Las Cabinas de Seguridad Biológica (en adelante CSB) son una de las principales barreras primarias de contención biológica, cuya correcta desinfección resulta ser un punto crítico desde el punto de vista de la bioseguridad.

Cualquier manipulación de organismos patógenos de los grupos de riesgo 2 o superior obliga a utilizar las CSB como método principal de confinamiento para seguridad del operador, la muestra y el entorno. En consecuencia, para actuar de forma biosegura en una CSB, es necesario disponer de tratamientos de biodescontaminación de superficies eficaces y microbiológicamente validados, para aplicarlos de forma rutinaria después de cualquier manipulación de patógenos, en caso de vertido accidental o con carácter previo a una operación de mantenimiento del equipo<sup>1,2</sup>.

En la actualidad, además de las pruebas normalizadas de fase 1 y 2 necesarias para poder comercializar en España un biocida<sup>3</sup>, las nuevas aproximaciones en materia de bioseguridad nos instan a realizar estudios específicos de resistencia o inactivación de patógenos a los diferentes productos biocidas a utilizar, teniendo en cuenta los diferentes aspectos que los convierten en ideales<sup>4</sup> para la actividad a la que se destina.

El objetivo de este trabajo es demostrar la idoneidad, eficacia y concentración mínima necesaria como esterilizante en frío del producto químico Rely+On™ PeraSafe™ frente a las salpicaduras y pequeños vertidos que se puedan producir en la superficie de una CSB durante los trabajos asociados a experimentación con roedores infectados con el virus SARS-CoV (acrónimo en inglés del coronavirus causante del síndrome respiratorio grave y agudo<sup>5,6</sup>).

## MATERIAL

### Virus y línea celular

rSARS-CoV strain MA15-WT-M2. Cepa recombinante generada específicamente para adaptación a ratón y procedente de una variante *wild type* del virus SARS-CoV, cedida por el Dr. Luis Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid), cuyo origen corresponde al Dr. Eric Snijder (Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda).

El virus fue inoculado en la línea Vero 76 clonE6 (ATCC CRL-1586). Esta línea celular adherente se incubó a 37 °C en atmósfera saturada de humedad con medio DMEM (Gibco, USA) suplementado con 25 mM HEPES, 50 µg/ml de gentamicina, 2 mM de L-glutamina y aminoácidos no esenciales al 1% (Merk, Alemania), además de 10% de suero bovino fetal (FBS) en placa de 24 pocillos.

### Biocida Rely+On™ PeraSafe™ (FHP, Sp)

Compuesto binario de ácido cítrico y peróxido de hidrógeno junto con otros agentes tensioactivos y estabilizantes y un colorante indicador de actividad.

Su presentación es en polvo micronizado altamente soluble en agua (30 g/l), de pH 8.0 al uso y con requerimiento de unas mínimas precauciones durante su uso (H318, H242) por contacto, por lo que requiere del uso de guantes y pantalla protectora durante su preparación y aplicación (para evitar salpicaduras a los ojos). No provoca olor ni irritación por evaporación.

El indicador colorimétrico (azul) determina el correcto estado de los principios activos con capacidad biocida<sup>7</sup>. No constituye un determinante de pH.

### Hisopos ViCUM® mod. virus B3 (Deltalab®, España)

Especialmente indicados para el transporte de material biológico que contenga virus al incluir elementos antibacterianos y antifúngicos que aseguran la idoneidad en la recuperación de las muestras que posteriormente fueron inoculadas en las células Vero E6.

## Cabina de Seguridad Biológica (Telstar® CytoULTRA, España)

Tipo IIA/B3. La superficie de trabajo (bancada) fabricada en acero inoxidable de calidad AISI 316L

## MÉTODO

Los ensayos en campo se realizaron en el Box 5 de la zona de experimentación animal ANCB3 del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA).

Partiendo de que la concentración recomendada por el fabricante de uso es de 1,62% (de peso en agua; v/w), se prepararon otras diluciones de concentración superior e inferior con el fin de determinar si esa era una concentración efectiva para el uso al que se iba a destinar: 0,5%, 1,0%, 1,62%, 2,0% y 2,5% (v/w).

Para su aplicación, se dividió la zona de trabajo de la CSB en 5 cuadrantes de aproximadamente 10 x 10 cm marcándolos con rotulador, de manera que quedasen bien señalizados y equidistantes entre sí (ver Figura 1). Se eligió este tamaño y disposición porque permitía mantener toda la equipación necesaria para el experimento dentro de la cabina y así mantener las condiciones necesarias de bioseguridad.

En cada cuadrante se dispensaron cinco gotas de una suspensión viral que se cubrieron con tapas amarillas procedentes de contenedores de residuos punzo-cortantes (que luego serían fácilmente gestionables como residuo peligroso de clase 5) mientras se realizaban las rutinas en los otros cuadrantes.



Imagen suministrada por la autora

**Figura 1.-** División y delimitación en la bandeja de la CSB de los distintos cuadrantes donde se va a trabajar.

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CON VIRUS

La concentración de partida del virus fue de  $2,77 \times 10^7$  PFU/ml, una titulación viral superior a la que podremos encontrar en experimentos con virus *in vivo*.

Mediante pipeta, se fueron depositando cinco gotas de 100  $\mu$ l de esa suspensión en cada cuadrante (a semejanza de un cinco en la cara de un dado) e inmediatamente protegiendo con las tapas amarillas (ver Figura 2).



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 2.-** Preparación del virus sobre la superficie de la CSB en cinco cuadrantes con cinco gotas en cada uno de ellos.

Para cada cuadrante se realizó la siembra de cinco puntos y de cada una de ellas se toma con hisopo como control positivo (muestras 1 a 5), mientras el resto de los cuadrantes permanecían tapados.

Después de la toma previa de muestras, se procedió a realizar el rociado hasta saturación con una de las diluciones preparadas mediante el uso de un bote difusor de baja presión. Inmediatamente después, ese cuadrante fue cubierto con una tapa para, transcurridos los diez minutos de exposición recomendada por el fabricante, retirar la tapa y proceder a una nueva toma de muestras punto por punto, con otros cinco hisopos (muestras 1 a 5) (ver Figura 3).



Imagen suministrada por la autoría

**Figura 3.-** Dispersión del virus y toma de muestras en cada cuadrante de la bancada de la CSB.

El procedimiento fue repetido para el resto de los cuadrantes (ordenados correlativamente según su exposición a concentraciones crecientes del biocida), utilizando en cada uno de ellos una de las concentraciones de biocida previamente preparadas, numerando las muestras resultantes desde la 6 a la 25 y desde la 6' a la 25'.

### ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Finalizada la toma de muestras, fueron introducidas en contenedores específicos de transporte seguro para material biológico infeccioso (material infeccioso Categoría A, UN2814). Se mantuvieron en un ultracongelador a  $-70$  °C hasta su procesamiento y análisis en el laboratorio NCB3 del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Allí, se inocularon en células Vero E6 con el fin de observar el posible efecto citopático derivado de la presencia de partículas virales viables.

Se utilizaron 200  $\mu$ l de sobrenadante de cada hisopo que se inocularon sobre placas de 24 pocillos con células en confluencia y se mantuvieron en incubador durante 72 horas. Pasado este tiempo, se observaron todas las muestras al microscopio en busca de efectos citopático en las células expuestas que se manifiestan como círculos de células muertas o "calvas" derivadas de ciclos líticos por exposición a virus<sup>8</sup>.

### RESULTADOS

Todas las muestras no expuestas al biocida (muestras 1 a 25) mostraron calvas específicas de ciclos líticos por exposición a virus. Sólo mostraron calvas, las muestras expuestas 3', 4', 6' y 9' (ver Tabla 1).

Para asegurar la idoneidad de la prueba y que las muestras que no presentaron efectos citolíticos no constituiran falsos negativos debido a la baja titulación del virus, se repitió tres veces el subcultivo del sobrenadante del cultivo anterior en placas con células nuevas, obteniendo siempre los mismos resultados. Para las muestras 1 a 25, sólo se realizaron dos subcultivos con idénticos resultados.

**Tabla 1.-** Resultado de la incubación en células Vero E6. Ø Sin efecto citopático y ● con efecto citopático.

0,50%					1,00%					1,62%					2,00%					2,50%				
1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'	17'	18'	19'	20'	21'	22'	23'	24'	25'
Ø	Ø	●	●	Ø	●	Ø	Ø	●	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

**CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que PERASAFE™, a la dilución de uso y tiempo de residencia que propone el fabricante, resulta ser un biodescontaminante de superficie de alta eficacia frente al agente biológico SARS-CoV.

**AGRADECIMIENTOS**

A la empresa española distribidora del producto, FHP (Francisco Hurtado Portela), y ANTEC por su colaboración y asesoramiento técnico.

A D.F. Javier García Palomo, responsable de la Unidad NCB3 del Banco de ADN de la Universidad de Salamanca, por su aporte y revisión científica.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Mengíbar M.P. and Pascual G. *Descontaminación de cabinas de seguridad biológica mediante la aplicación de Virkon, Perasafe y Ceber MPW.* Farmespaña Industrial. 2015;34-40.
2. *Laboratory Biosafety Manual.* Third Edition. 2004. World Health Organization.
3. EN14476:2014\*A1:2015 *Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad viricida. Método de ensayo y requisitos (Fase 2/Etapa 1).*
4. Hernández Rodríguez, A. *Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes.* Tesis doctoral, UAB, Dpto. de Genética Microbiana. 2006.
5. Severe acute respiratory syndrome (SARS). *Weekly Epidemiol Rec.* 2003;78:81-3.
6. Centers for Disease Control and Prevention. *Outbreak of severe acute respiratory syndrome-worldwide.* MMWR Morbidity and Mortal weakly rep.2003;52:226-8. (Medline).
7. <http://relyondisinfection.com/>: Rely+On™ Persafe™, *safety data sheet according CE regulation.* Consultada el 9/3/2019.
8. Dulbecco R. and Vogt M. *Some problems of animal virology as studied by the plaque technique.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1953;18:273-9.