

EFICACIA MICROBIOLÓGICA EN BIODESCONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES CON VIRKON® POR INDUCCIÓN ELECTROSTÁTICA.

Pascual, G.

Jefe del Servicio de Seguridad Biológica del Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA.
Director del Centro de Referencia FAO en Gestión del Riesgo Biológico.

RESUMEN.

Para cualquier Instalación de investigación, diagnóstico, experimentación o producción, la contaminación superficial de espacios y equipos resulta crítica. Los niveles de desinfección a alcanzar en consecuencia, resultan ser uno de los principales problemas de bioseguridad.

Seleccionar un equipo de fácil manejo y aplicación, que permita el uso de cualquier biodescontaminante o biocida, que reduzca notablemente el tiempo de aplicación, que sea lo menos agresivo posible para el técnico aplicador, que garantice una alta eficacia microbiológica probada, que el proceso sea validable, que genere un ahorro de producto y que permita en consecuencia mantener la integridad física de las instalaciones, es un objetivo para cualquier especialista en bioseguridad.

La combinación de un sistema de rociado o micropulverización usando la acción que genera el proceso físico de la inducción electrostática, junto a la garantía que ofrece un biocida de amplio espectro microbiológico, constituye una herramienta de bioseguridad de alto valor para su aplicación en cualquier Instalación que necesite el mantenimiento de un estatus microbiológico por encima de lo aceptable

PALABRAS CLAVE.

Inducción electrostática, biodescontaminación, VIRKON®.

ABSTRACT.

For any research, diagnostic, experimental or production facility, the superficial contamination of spaces and equipment is critical. The levels of disinfection to be reached consequently turn out to be one of the main biosafety problems.

Select a device that is easy to use and apply, that allows the use of any biodecontaminant or biocide, that significantly reduces the application time, that is as less aggressive as possible for the technical applicator, that guarantees a high proven microbiological efficiency, that the process be valuable, that generates a saving of product and that consequently allows to maintain the physical integrity of the facilities, is a goal for any specialist in biosafety.

The combination of a sprayed system or micro sprayed, using the action that generates the physical process of electrostatic induction, together with the guarantee offered by a biocide with a broad microbiological spectrum, constitutes a biosafety high value tool for its application in any facility that needs the maintenance of a microbiological status above the acceptable.

INTRODUCCIÓN.

La inducción electrostática permite atomizar un producto químico biocida o desinfectante en un tamaño medio de gota de 33 micras y cargarlas eléctricamente gracias al paso del aerosol generado a través de una boquilla que presenta un electrodo activado.

El aerosol generado y cargado, induce a una reordenación eléctrica de la superficie de un material, pasándolo de un estado de equilibrio eléctrico (neutro) a cargado, permitiendo una atracción entre ambos de 70 a 80 veces la fuerza de la gravedad y asegurando gracias a la reordenación eléctrica, la usencia de superposición.

El uso de este principio físico en la aplicación de desinfectantes de superficie sobre espacios biocontaminados o que presentan una carga microbiológica no desada, supone un salto cualitativo en la eficacia del proceso,

Se impide, en comparación con los métodos de rociado tradicionales, la generación de espacios vacíos entre gotas que impiden una dispersión del producto de forma continua y homogénea, en una cantidad adecuada y con un tiempo de permanencia mínimo, es decir se favorece la creación de quimio-film activo sobre el bio-film existente

De entre los biocidas/descontaminantes existentes en el mercado, que presenta la mayor eficacia espectral antimicrobiana, menor tiempo de residencia frente a la mayor eficacia, VIRKON® es el más completo.

La combinación de ambos, resulta a priori la posibilidad de aplicación de un método altamente eficaz

OBJETIVO.

El objetivo principal del presente estudio es demostrar la eficacia descontaminante combinada entre el uso de un sistema de inducción electrostática de última generación y el biocida de amplio espectro VIRKON® con el fin de concluir sobre su idoneidad de uso en procesos de biodescontaminación en Instalaciones científicas de diagnóstico, investigación y experimentación animal.

Asimismo se tratará de demostrar que *Geobacillus stearothermophilus* en sus diferentes presentaciones resulta adecuado en la validación microbiológica del proceso con el biocida seleccionado.

MATERIAL Y MÉTODO.

Ámbito de estudio.

El estudio se ha llevado a cabo sobre espacios de contención biológica en los que se trabaja con muestras infecciosas y/o susceptibles de crear cualquier tipo de contaminación.

Material empleado.

Geobacillus Stearothermophilus es una bacteria Gram-positiva aerobia y con forma de bacilo.

El bioindicador ha sido utilizado en dos presentaciones: no encapsulado (en siembra) y autocontenido.

- Indicadores biológicos autocontenidos: MATACHANA 85022 1.0X10⁶. ATCC 7953. Lote: 4052 1812
Contienen una tira de papel impregnado con esporas (*G. Stearothermophilus*) y el medio de cultivo con indicador de pH separado en una cápsula todo dentro de un vial flexible de propileno.
Se han utilizado de dos modos:
 - Apertura la cápsula y extracción del medio de cultivo interior antes de proceder a la descontaminación, dejando el tapón abierto,
 - Apertura la cápsula y mantenimiento del medio de cultivo interior (sin extracción) antes de proceder a la descontaminación.
- Indicadores no encapsulados: SPORDEX NA300P *Geobacillus Stearothermophilus* 12980 2.1X10⁵ envueltos en Tyvek/clear (cara porosa) Mylar. los discos inoculados con la espора son de poliestireno Lote: AH-006. Caducidad: 2019-05-31.
- Indicadores no encapsulados: SPORDEX NA333 *Geobacillus Stearothermophilus* 2.2X10⁶ envueltos en Tyvek/Tyvek. Los discos inoculados con la espора son de fibra de vidrio.
- Bioindicador SPORDEX NA300P 2.1X10⁵ (*Geobacillus stearothermophilus* STCC7953). Lote: K18002 1388 Caducidad: 2019-04-18
- Medio de cultivo Spordex® NA117. Lote: PM199 Caducidad: 2018-12-06
- Placas de contacto RODAC: Agar Mac Conkey
Medio de diferenciación selectivo para el aislamiento de enterobacterias así como otros bacilos Gram-negativos y entéricos, de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos, fermentadores o no de la lactosa. Posee en su composición cristal violeta y sales que inhiben el crecimiento de bacilos Gram-positivo. Las bacterias entéricas fermentan la lactosa y pueden ser detectadas utilizando el indicador de pH rojo neutro originando colonias de rosadas a rojas, mientras que los no fermentadores aparecen como colonias transparentes Es un medio de cultivo de color rojizo púrpura con un pH final 7,1 ± 0,2 y se debe incubar durante de 24 a 48 horas a 35-37°C.
- Placas de contacto RODAC: Agar Sabouraud Cloranfenicol.
Medio selectivo para hongos (levaduras, mohos y dermatofitos).

El medio inhibe el crecimiento bacteriano gracias al uso del cloranfenicol (antibiótico) y favorece el crecimiento de los hongos debido a la presencia de azúcares y peptonas en su composición. Es utilizado para el cultivo de hongos, sobre todo dermatofitos.

De color pardo, presenta un pH final: 5.6 ± 0.2 .

Se deben incubar durante 48 horas a 30 - 35 °C si se buscan levaduras y a 25°C – 30°C si se buscan hongos filamentosos.

En el caso de buscar dermatofitos el periodo de incubación se amplía hasta las dos semanas.

- Placas de contacto RODAC: Agar VRG.
Medio de cultivo para enterobacterias, bacterias coliformes fermentadoras de lactosa, cepas de *E. coli* no fermentadoras de lactosa, y diferente no fermentadoras de lactosa.
Contiene glucosa para la fermentación, rojo neutro como indicador y cristal violeta y sales biliares que inhiben el crecimiento de bacilos Gram-positivos y permiten el crecimiento de organismos Gram-negativo.
- Placas de cultivo (ref. 25011). Corning® 60mm. 60x15 mm
- Incubador MATACHANA®. Art. Nº 85208
- VIRKON®. Amplio espectro microbiológico, produciendo disrupción de la pared celular y degradación e inactivación de los ácidos nucleicos. Se trata de una mezcla equilibrada y estabilizada de compuestos peroxidados, tenso-activos y ácidos orgánicos.
Formulado con presentación sólida en polvo proporcionado por la empresa FHP (Francisco Hurtado Portela, España).
- Equipo pulverizador de inducción electrostática; CS-900 de Bioplanet International LLC® nº serie: 120G00956 de la casa MicroClean.
- Pulverizador ES Sprayer. ES-120 de Bioplanet International LLC®. P/N: 200026. S/N: 115CS0114 de la casa MicroClean (foto 1).



Foto 1: Equipo Bioplanet CS-900. MicroClean

Método de trabajo.

Los ensayos se realizaron entre enero y marzo de 2019 en condiciones reales de ambiente “sucio” (contaminado) sobre el que se realizó una limpieza previa convencional para el arrastre de materia orgánica grosera. Se localizaron en la superficie basal de un box de experimentación para grandes animales situado en la zona de experimentación animal bajo entorno de Alta Contención Biológica (ANCB3) del Centro de Investigación en Sanidad Animal.

Se seleccionaron dos superficies de 2 m² libre de objetos situada en el suelo del box.

Las condiciones físicas paramétricas del espacio fueron controladas:

- Humedad relativa del 40% -50%,
- Temperatura entre los 20°C y 21° C.
- Velocidad del aire > a 0,5m/s.
- Presión negativa (sub-atmosférica) de -90Pa \pm 5

Toma de muestras inicial

a/ Hidratación de placas añadiendo 1 mL de agua estéril una hora antes de su uso.

b/ Siembra. Levantamiento de la película y toma de muestra en superficie presionando la placa sobre la misma.

c/ Estrategia de muestreo: Las posiciones de los bioindicadores y la toma de muestras con placas siguieron una estrategia de muestreo simétrica dentro de la superficie señalada (figura 1).

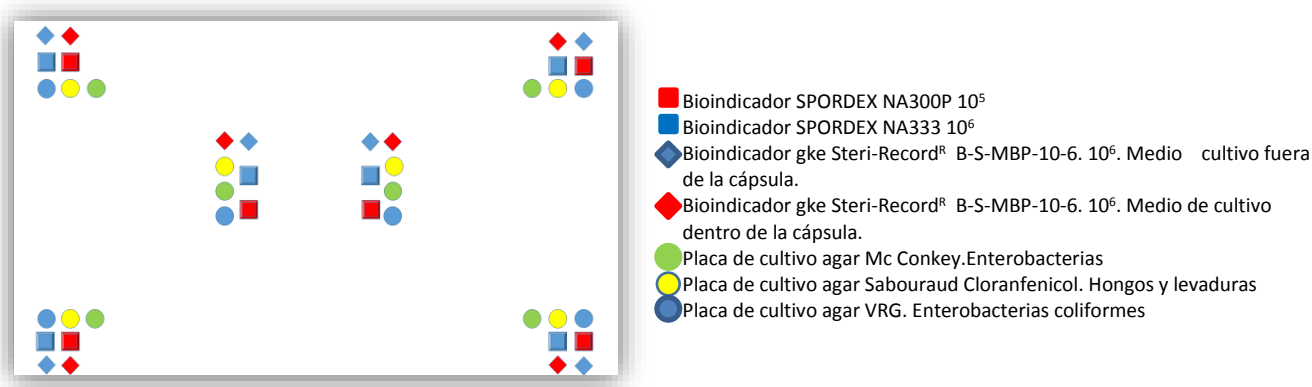


Figura 1. Disposición de los bioindicadores y placas en el box

d/ Incubación en la estufa.

El tiempo de incubación varió en función del microorganismo a testar (tabla 1).

TIPOS DE MICROORGANISMOS	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Aerobios	36-37°C	48 horas
Enterobacterias		22 horas
Mohos y levaduras		3-5 días

Tabla 1. Temperatura y periodo de incubación de los distintos microorganismos cultivados.

d/ Contaje. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) aparecidas.

Biotratamiento

Se llevaron a cabo dos procesos simultáneos repetidos 5 veces:

- Aplicación de pulverización simple,
- Aplicación de pulverización doble.

Se prepara el producto químico biocida a dosis de uso del 2 % (20g/L) según indica el fabricante. El tiempo de contacto (residencia) requerido fue de 10 minutos.

Se limpia la superficie de ensayo con agua eliminando posibles restos groseros de materia orgánica.

Finalizada la primera toma de muestras inicial sobre la superficie no tratada con el fin de determinar la población microbiana inicial, se procedió a la realización de los ensayos con el biocida VIRKON[®].

Prueba 1.

Se colocan los bioindicadores y las placas de cultivo siguiendo el mapeo (Figura 1).

La disolución de uso fue realizada en agua a temperatura ambiental.

Preparada la solución, se procedió a su vertido en el depósito del equipo CS-900 y se iniciaron los ensayos.

Se lleva a cabo una pulverización.

Transcurridos 10 minutos de residencia del producto:

- Se recogen con pinzas estériles los controles SPORDEX (H₂O₂) y se introducen en el medio de cultivo y se cierra la tapa.
- Se introducen los medios de cultivo de los bioindicadores Matachana en su cápsula,
- Se repite una toma de muestras completa con el fin de identificar la reducción de unidades formadoras de colina alcanzada.
- Se cierran las placas de cultivo.

Se transportan a incubación durante 48 horas.

Prueba 2.

Se llevan a cabo dos pulverizaciones seguidas en las mismas condiciones que las establecidas para la prueba 1aciones.

RESULTADOS.

Se considera una superficie como biocontaminada siempre que el resultado del muestreo sea mayor o igual a 10 ufc/25cm².

Monitorización microbiológica general (tabla2)

TOMA DE MUESTRAS	UFC		
	AEROBIOS	ENTEROBACTERIAS	MOHOS Y LEVADURAS
1	92	21	2
2	99	41	3
3	85	37	1
4	84	37	0
5	89	33	1
6	93	42	1

Tabla 2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), obtenidas tras la primera toma de muestras.

Monitorización microbiológica post tratamiento (tablas 3 y 4)

TOMA DE MUESTRAS	UFC														
	n° de ensayos														
	AEROBIOS					ENTEROBACTERIAS					MOHOS Y LEVADURAS				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	1	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3	3	4	-	1	-	1	-	2	1	-	-	-	-	-
3	-	-	1	1	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
4	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
5	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	3	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-

Tabla 3. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), obtenidas tras una pulverización.

TOMA DE MUESTRAS	UFC														
	n° de ensayos														
	AEROBIOS					ENTEROBACTERIAS					MOHOS Y LEVADURAS				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), obtenidas tras doble pulverización.

Se pudo constatar que los valores de temperatura y humedad no variaron en más de 1°C y se mantuvo una humedad relativa entre el 40% y el 50% durante los ensayos. Igualmente, la velocidad del aire en la zona de ensayo se situó ente los 0,5m/s y los 0,8 m/s como consecuencia del mantenimiento de la presión subatmosférica existente (90 Pa) (“negativa”) en el interior del espacio de ensayo.

DISCUSIÓN.

Muchas Instalaciones sanitarias, optimizan los recursos de infraestructura científica disponibles permitiendo el uso compartido de espacios y equipos. Esta situación permite la reutilización de los mismos para labores de experimentación, el paso de operarios por estas áreas para la realización de diferentes actividades aunque lo realicen de forma protegida, el paso de útiles o elementos móviles, los sistemas de tratamiento y renovación de aire, el uso de herramienta y fungibles

de mantenimiento, en definitiva, cualquier elemento que se desenvuelva en un espacio, puede generar un problema de posible contaminación de mayor o menor consideración.

Resulta necesario establecer un programa preventivo, predictivo o a veces correctivo de biodescontaminación o biotratamiento que asegure el mantenimiento de la población microbiana residente endémica o incorporada en un nivel aceptable.

La aplicación de métodos o procesos de biodescontaminación simples o redundantes reproducibles, permite obtener en el tiempo una ausencia de contaminaciones cruzadas (Richmond y Nesby-O'Dell, 2002).

El presente estudio aporta la evidencia de que la combinación de un efecto físico, un equipo determinado, un método, un procedimiento y un biocida conocido, pueden constituir una herramienta eficaz y de bajo coste para el control microbiológico de superficies y espacios con uso esporádico, periódico o rutinario.

Los resultados obtenidos han demostrado que esta combinación ofrece excelentes resultados, siendo equiparables a los obtenidos por otros autores con diferentes metodologías y tipos de biocidas (Van Klingeren et al., 1998; Eleraky et al., 2002; Müller y Kramer, 2008).

Los niveles de eficacia obtenidos con el formulado VIRKON®, son similares a los obtenidos por otros autores, tanto en ensayos *in vitro* (Gasparini et al., 1995; Hernández et al., 2000) como *in vivo* (Angelillo et al., 1998).

CONCLUSIONES.

- 1.- La reducción poblacional media de bacterias aerobias una vez aplicado el método de pulverización simple es del 94,65% y por pulverización doble es del 99,64%.
- 2.- La reducción media de enterobacterias en la primera prueba fue del 98,15% y en la segunda del 100%.
- 3.- La reducción media de mohos y levaduras alcanzada en ambas pruebas fue del 100%.
- 4.- La diferencia entre la aplicación de una pulverización simple y una doble es significativa para el caso de bacterias aerobias. Permite concluir que una aplicación simple y 10 minutos de residencia, el producto se evapora y no permanece el tiempo necesario antes de ejercer su acción. Por lo que es recomendable implantar un método de doble rociado permitiendo una presencia mantenida en el tiempo de actuación del producto biocida.
- 5.- La combinación del equipo utilizado que permite el micro-rociado con inducción electrostática y el uso de un biocida validado de amplio espectro como es VIRKON®, permite una reducción de la carga microbiológica preexistente, por lo que resulta ser una alternativa de uso efectiva y eficaz para procesos de bio-tratamiento preventivo o de mejora del estatus higiénico de una superficie y en su caso de bio-descontaminación.
- 6.- El uso del bioindicador *Geobacillus stearothermophilus* en los formatos utilizados, no resulta válido como bioindicador de procesos de biotratamiento por microrociado con VIRKON®
- 7.- El sistema estudiado resulta altamente recomendable para espacios sanitarios de bajo, medio o alto riesgo.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa MicroClean, por su colaboración y asesoramiento técnico.

REFERENCIAS

- Eleraky, NZ, Potgieter, LN y Kennedy, MA (2002) Virucidal efficacy of four new disinfectants. J Am Animal Hosp Assos, 38:231-235.
- Gasparini, R, Pozzi, T, Magnelli, R, Fatighenti, D, Giotti, E, Polisenio, G, Pratelli, M, Severini, R, Bonanni, P y De Feo, L (1995) Evaluation of in vitro efficacy of the disinfectant Virkon. Eur J Epidemiol, 11:192-197.
- Hernández, A, Martro, E, Matas, L, Martín, M y Ausina, V (2000) Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. J Hosp Infect, 46:203-209.
- Mc Donnell, G y Rusell, AD (1999) Antiseptics and disinfectants: Activity, Action and Resistance. Clin. Microbiol. Rev, 12:147-179.
- Carro CS 900. <http://microclean-solutions.com/project/cs-900-series/>
- Pulverizador Direccional ES 120. <http://microclean-solutions.com/project/pulverizador-direccional-es-120/>