

DETERMINACIÓN DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN BIOCIDA (ensayos de screening + normas EN)

Introducción

Las Normas Europeas desarrolladas por el CEN TC 216 para evaluar la eficacia de desinfectantes químicos y antisépticos son los ensayos más comunes requeridos para el registro de estos productos de acuerdo a la Directiva de Biocidas 98/8/CE.

A menudo los fabricantes desconocen la concentración activa de sus productos a la hora de realizar los ensayos según las normas EN. Por otra parte, uno de los requisitos de la Directiva de Biocidas es que **la concentración de sustancias activas** utilizadas en la formulación de los productos **se limite a la mínima necesaria**.

El diseño de los ensayos de eficacia según las normas EN no permite ensayar un alto número de concentraciones o condiciones experimentales (tiempo de contacto, cepa o sustancia interferente) en la misma réplica. Como consecuencia, el uso de las normas EN para determinar la concentración activa más baja a un tiempo de contacto específico, para cada cepa, es una tarea que requiere bastante tiempo y resulta cara. Por esta razón, Eurofins ha desarrollado **un método de screening rápido y económico** que permite estudiar varias condiciones en paralelo, pudiendo así optimizar el diseño de la formulación del producto biocida.

Se trata de un método semi-automatizado que reproduce a escala reducida los procedimientos de las normas EN, sustituyendo la cuantificación de microorganismos mediante técnicas tradicionales de cultivo por la cuantificación mediante detección de ATP. Esta técnica automatizada permite estudiar **hasta 14 concentraciones del producto en el mismo ensayo** con un coste mucho menor que el de las normas EN y una **elevada reproducibilidad**. Se obtienen así **curvas de inactivación para cada microorganismo** que permiten estimar las concentraciones mínimas bactericidas en las condiciones de las normas EN. Otra ventaja de esta técnica es que **los tiempos de respuesta son muy rápidos**, obteniéndose los resultados en el mismo día del ensayo puesto que no hace falta esperar la incubación de los microorganismos tras el ensayo.

El método basado en la detección de ATP es de gran utilidad en la **búsqueda de sinergismos** al combinar sustancias activas entre sí o con otros ingredientes capaces de potenciar su actividad biocida.

Objetivo

El objetivo de llevar a cabo los ensayos de screening previos al ensayo según las normas UNE-EN es identificar el rango de concentraciones del producto activas frente a cada microorganismo de ensayo para poder así **determinar las 3 concentraciones a las que realizar los ensayos de normas UNE-EN** intentando ajustar al máximo la determinación de la **mínima concentración biocida del producto** y cumpliendo con los requisitos de las normas de obtener al menos una concentración activa y una no activa en cuanto a la actividad bactericida, levuricida y fungicida.

Ventajas de realizar el screening

Gracias al screening se puede **ajustar el rango de concentraciones de un ensayo EN** y **se evita el riesgo de tener que repetirlo** porque ninguna de las concentraciones elegida resulte activa.

Eurofins propondrá al fabricante las tres concentraciones para el ensayo UNE-EN sobre la base de los resultados del screening. Si ninguna de las tres concentraciones propuestas resultase activa la repetición del ensayo en otras condiciones acordadas con el promotor correrían a cargo del laboratorio.

Además se evita el riesgo de realizar el ensayo según normas UNE-EN con 3 concentraciones y que ninguna de ellas resulte no activa con lo cual el ensayo no cumpliría con uno de los requisitos de conformidad a las normas.

La información del screening no es suficiente para registrar el producto (se necesitarán los resultados de las normas UNE-EN) pero favorece un **conocimiento más profundo del formulado**, identificando más claramente su **espectro de eficacia** y los **microorganismos más limitantes**. Permite además justificar la elección de la concentración de uso de cara a la evaluación del riesgo en el registro del producto de acuerdo con la Directiva de Biocidas.

El screening se puede realizar en suspensión o en superficie, en condiciones limpias o sucias. Las normas UNE-EN en suspensión serían la UNE-EN 1276 y UNE-EN 13727 (actividad bactericida), UNE-EN 1650 y EN 13624 (actividad levuricida y fungicida), UNE-EN 13623 (actividad frente a Legionella), UNE-EN 13697 (actividad bactericida, levuricida y fungicida)

Centro de ensayo

El screening con el método basado en la detección de ATP se realiza en nuestro laboratorio de Barcelona y se lleva a cabo como opción adicional a la realización de las normas UNE-EN en el caso de que el cliente lo solicite.

Los ensayos según normas EN se realizan conforme a los requisitos recogidos en la Norma EN ISO/IEC 17025 (certificado de acreditación ENAC Nº 839/LE1792).



Contacto: Pilar Visa

Tel. +34 93 402 0576 · PilarVisa@eurofins.com

1/2



Eurofins BioPharma Product Testing Spain S.L.U.

Parc Científic de Barcelona

C/Baldri Reixac 4-6, 08028 Barcelona

www.eurofins.es

Estrategia

Con el ensayo de screening basado en la detección de ATP para cada microorganismo, temperatura, sustancia interferente y tiempo de contacto se determina una **curva de inactivación**, a partir de la cual se estima la concentración mínima del producto que debería pasar las normas EN.

Si en esta fase se determinara que el producto no es suficientemente activo, no se procederá con los ensayos según normas EN.

El método de screening basado en la detección de ATP es aplicable para bacterias y levaduras, pero no para las esporas de mohos y en concreto en *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (antes denominada en las normas EN como *Aspergillus niger*). Si el producto tuviera que ser **fungicida**, se realizará el screening mediante otra técnica que permite discriminar entre “pasa” y “no pasa” para un determinado rango de concentraciones del producto. Para esta cepa no se dispondría de una curva de inactivación.

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de screening y nuestra experiencia en el estudio de productos desinfectantes, **Eurofins propondrá las concentraciones** a ensayar para las normas EN escogidas.

Si el promotor confirma la propuesta de Eurofins y el producto no se revelara eficaz a las concentraciones recomendadas, se realizará una repetición del ensayo a otras 3 concentraciones acordadas con el promotor. El coste de esta repetición correrá a cargo de Eurofins que asume el riesgo de dicha repetición.

En cuanto al tiempo de contacto, tanto el screening como los ensayos según las normas UNE-EN se realizarán al tiempo de contacto obligatorio indicado en las normas UNE-EN, pudiendo realizarlos también con otros tiempos adicionales.

Los resultados del screening se entregan en un **certificado** aparte del informe del ensayo ENAC según normas UNE-EN.

Las cepas que se utilizarán en el screening son:

- Para actividad bactericida:

| | |
|-------------------------------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 15442 |
| <i>Enterococcus hirae</i> | ATCC 10541 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 10536 |

- Para actividad levuricida y fungicida:

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 (levadura) |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404 (moho) |

- Para actividad frente a *Legionella*:

| | |
|-------------------------------|------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> | ATCC 33152 |
|-------------------------------|------------|

Bibliografía

Aragonès, L., C. Escudé, P. Visa, L. Salvi and L. Mocé-Llivina. New insights for rapid evaluation of bactericidal activity: a semi-automated bioluminescence ATP assay. *Journal of Applied Microbiology*. 2012.

Contacto: Pilar Visa

Tel. +34 93 402 0576 · PilarVisa@eurofins.com

¿POR QUÉ REALIZAR UN ENSAYO DE SCREENING?

- Confirmar la eficacia de una formulación biocida, rápidamente y con bajo coste
- Ajustar la formulación y/o los claims a la mínima concentración biocida deseada
- Evitar repeticiones de un ensayo UNE-EN por resultados inesperados. El laboratorio asume este riesgo.
- Obtener información acerca del espectro de eficacia del formulado. Curvas de inactivación para cada microorganismo.

ESTRATEGIA DE ENSAYOS

