

## ENSAYO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DE DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS BASADO EN DETECCIÓN DE ATP (*Screening*)

### Objetivo del ensayo

El objetivo del ensayo, descrito esquemáticamente a continuación, es determinar la **mínima concentración biocida** para desinfectantes y antisépticos mediante la elaboración de una curva de inactivación para cada microorganismo de ensayo.

### Interesados

Fabricantes de desinfectantes y antisépticos de cualquier área.

### Procedimiento experimental

El ensayo ha sido desarrollado de manera que el procedimiento experimental y los resultados sean comparables con las normas EN de eficacia bactericida en suspensión (UNE-EN 1276, UNE-EN 13727 y UNE-EN 13623 para *Legionella*), bactericida y levuricida en superficie (UNE-EN 13697) y con las normas UNE-EN 1650, UNE-EN 13624 limitadamente a la eficacia levuricida.

Se trata de un ensayo 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.

El método consiste en medir el ATP de las células vivas que sobreviven después de haber puesto en contacto una suspensión de un microorganismo con un producto desinfectante a una determinada concentración y en presencia de sustancias interferentes (albúmina bovina y/o eritrocitos de oveja), pudiendo así estimar la reducción de bacterias inducida por el producto después de haber sido neutralizado. La detección del ATP se realiza mediante un equipo que trabaja con una micro-placa de 96 pozos y las lecturas, automatizadas, se realizan pocos minutos después de la realización del ensayo.

Este procedimiento permite estudiar en paralelo, para un mismo microorganismo, temperatura y tiempo de contacto, un gran número de condiciones. Por ejemplo con una multi-placa es posible estudiar **hasta 14 concentraciones diferentes del producto**, realizando 3 réplicas en paralelo, lo que permite elaborar una curva completa de inactivación del microorganismo de ensayo y estimar la mínima concentración biocida del producto.

La misma multi-placa se utiliza para realizar los controles internos de validez del ensayo previstos por las normas EN de eficacia: verificación de las condiciones experimentales, verificación de la no toxicidad del neutralizante, verificación de la eficacia de la neutralización. Además se lleva a cabo un control adicional para verificar que el producto desinfectante no interfiere con el sistema de detección.

### Microorganismos:

El ensayo ha sido verificado con los siguientes microorganismos de las normas EN:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

También puede realizarse con bacterias adicionales (por ejemplo *Salmonella typhimurium*) u otras levaduras. El ensayo no es aplicable para las esporas de mohos y en concreto para el *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

### Validación del método

Para validar el método se ha verificado la linealidad del sistema de detección de ATP para la cuantificación de células viables en el rango de interés y se ha comprobado la sensibilidad, especificidad, exactitud del nuevo método realizando un estudio de comparabilidad con las normas EN correspondientes, que se han considerado los métodos de referencia. Finalmente se ha verificado la reproducibilidad del ensayo que es muy elevada al tratarse de un método semi-automatizado.

### Expresión de los resultados

La medida del ATP de las células supervivientes se expresa como RLU (Relative Luminescence Units). Por diferencia con las RLU de la suspensión de microorganismos tratada con agua se calcula la reducción de RLU, del producto desinfectante.

Para cada microorganismo, temperatura, sustancia interferente y tiempo de contacto se puede representar la curva de inactivación: reducción de Log RLU frente a concentración de producto biocida.

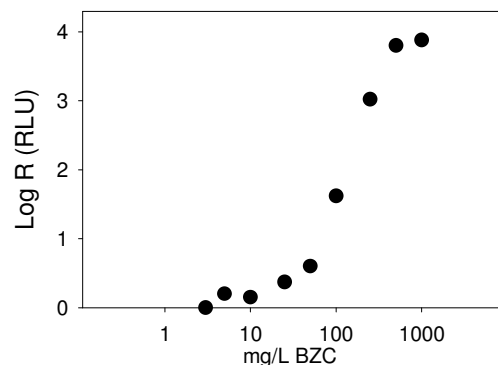


Figura 1. Curva de inactivación *S. aureus* con concentraciones crecientes de una solución de cloruro de benzalkonio a un tiempo de contacto de 5 minutos

Contacto: Pilar Visa

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

1/2



Existe una correlación directa entre la reducción logarítmica de RLUs y la reducción logarítmica de CFUs, lo que permite determinar los valores de viabilidad celular y estimar los resultados del ensayo en términos de reducción logarítmica de CFUs.

El límite de detección del método basado en la detección de ATP depende del tipo de ensayo (suspensión o superficie) y del microorganismo. Cuando el límite de detección es inferior a la reducción exigida por la norma EN correspondiente, la estimación de la mínima concentración biocida se realiza mediante una extrapolación lineal de los datos disponibles.

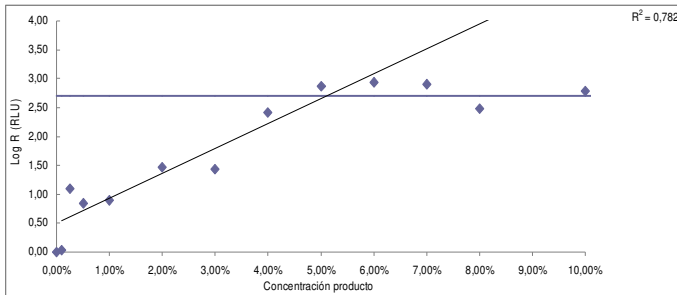


Figura 2. Curva de reducción de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 con el método screening ATP de EN 13697, para el producto de ensayo X.

### Aplicaciones

El método de *screening* basado en la detección ATP tiene muchas aplicaciones y ventajas ya que permite por ejemplo:

- Determinar las concentraciones para realizar los ensayos EN con éxito y en particular ajustar la formulación y/o los *claims* a la mínima concentración biocida deseada; (Fig.2 )
- Detectar sinergismos en fase de formulación, comparando en paralelo la eficacia de muchas fórmulas alternativas en diferentes condiciones de ensayo;
- Comparar la eficacia de fórmulas / productos parecidos;
- Evaluar cómo varía la actividad de un producto en función de un parámetro de uso (por ej. el tiempo de contacto o la temperatura);
- Estudiar la actividad del producto frente a microorganismos específicos, adicionales a los de las normas;
- Poder cumplir sin riesgos con el requisito de las normas EN de tener una concentración no activa.

En todos los casos la posibilidad de generar un gran número de datos para cada microorganismo permite conocer con mayor precisión el espectro de actividad del desinfectante e identificar los microorganismos limitantes para cada condición experimental.

Esta información permite finalmente 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.

### 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.

También se pueden realizar *screenings* a medida para comparar diferentes formulaciones, productos o condiciones de uso.

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).

### Plazo de entrega de resultados

10 días laborales

### 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.

