

Determinación de la eficacia de los desinfectantes empleados en las áreas asépticas de un centro productor de biofarmacéuticos

Eidelys Díaz-Enriquez,^{1*} Orestes Mayo-Abad², Ichell Miró-Frutos¹, Yanel Pérez-Gutiérrez¹, Anna Tsoraeva¹

¹ Centro Nacional de Biopreparados, Mayabeque, Cuba.

² Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, Habana, Cuba.

email: omayo@infomed.sld.cu

En la industria biofarmacéutica, la desinfección se ha hecho parte fundamental de las actividades para controlar el nivel de microorganismos contaminantes que puedan llegar a comprometer la calidad del producto final. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de los desinfectantes AniosSpecial DJP SF, Aniosurf Premium, Bacteranios SF, Aniospray 29, Aseptanios AD y Surfianios utilizados en la limpieza y desinfección del área aséptica de la Planta de Productos Parenterales 2 del Centro Nacional de Biopreparados (Mayabeque, Cuba). Se comprobó la eficacia con pruebas de desafío en superficies y en condiciones prácticas de uso. Se comparó estadísticamente el número de microorganismos aislados y la microbiota presente en el área antes y después del uso de los desinfectantes. Todos los desinfectantes cumplieron con los requisitos establecidos. Por lo tanto, se demostró su eficacia para realizar la limpieza de las áreas asépticas.

Palabras clave: desinfectantes, contaminación, áreas asépticas, industria biofarmacéutica.

Introducción

El Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) de Mayabeque, Cuba, se dedica a la producción de biofarmacéuticos en sus plantas, contando con áreas asépticas destinadas a la formulación y llenado de parenterales de bajo volumen bajo procesamiento aséptico.

Uno de los principales problemas a los cuales la industria farmacéutica se enfrenta en la actualidad, es demostrar el cumplimiento de los estándares ambientales en sus áreas de trabajo, principalmente en las consideradas como áreas asépticas.

La existencia de éstas, permite trabajar en condiciones higiénicas óptimas en las que el número de agentes microbianos se vean reducidos al mínimo. Por este motivo, es crítico que cualquier empresa farmacéutica siga las normas de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) regidos fundamentalmente por las Normas ISO (1), y por diferentes guías regulatorias establecidas por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), la Farmacopea de los Estados Unidos (en inglés United States Pharmacopeia,

(USP)) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2-4).

Para mantener los niveles higiénicos de las áreas de producción es importante la elección de los agentes desinfectantes, así como los métodos de aplicación de los mismos. Las agencias regulatorias exigen frente al control de la contaminación implementar métodos válidos para evaluar la eficacia de los desinfectantes usados en las áreas (5, 6).

La eficacia de un desinfectante depende de su concentración, el tiempo de contacto, la naturaleza de la superficie desinfectada, la cantidad de material orgánico presente en la superficie, y el tipo y la cantidad de microorganismos presentes (7).

El tiempo de contacto es un factor fundamental para asegurar la desinfección. Usualmente el tiempo elegido son cinco minutos, ya que representa el tiempo en el que muchos desinfectantes permanecen en las superficies que no están en posición horizontal (8). Esto significa que los desinfectantes deben ser capaces de asegurar un efecto biocida en cinco minutos o menos, de acuerdo al tipo de aplicación. Sin embargo, algunos biocidas pueden adherirse a la superficie aumentando el tiempo de contacto (9).

* Máster, Centro Nacional de Biopreparados, Departamento de Control de Procesos.

Los microorganismos en función de su estructura celular, composición y fisiología, varían en su respuesta a los desinfectantes. La mayor resistencia la presentan las esporas bacterianas, seguidas de las micobacterias, quistes de parásitos, pequeños virus no encapsulados, bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y, por último, los virus con cápsula lipídica. Los mohos generalmente son más resistentes que las levaduras y mucho más resistentes que las bacterias no esporuladas, pero más sensibles que las bacterias esporuladas. Las partículas biológicamente activas pueden ser virus, bacterias, levaduras, mohos o esporas que interactúan con el ambiente circundante para propósitos específicos. Tales partículas biológicas sedimentan, crecen y ocasionalmente forman una masa de células llamada biopelícula, que define toda la microbiota contaminante y patógena que se forma en grupos celulares, espacialmente organizados y encerrados en una matriz de polímeros orgánicos, sobre la superficie de los alimentos o las superficies en contacto con ellos. La presencia de estas biopelículas en las superficies afecta a la eficacia de los agentes antimicrobianos, bien sea por interacción con la matriz (células y polímeros), o por la escasa difusión de los antimicrobianos a través de ella (10).

El número de microorganismos afecta la acción del desinfectante, debido a que una mayor carga microbiana requiere mayores concentraciones de desinfectante o tiempos de contacto más prolongados y puesto que no siempre se consigue una adecuada desinfección de la superficie con estos incrementos, se hace necesaria una combinación de factores (10).

El diseño de los equipos, la selección de los materiales y el tratamiento que se realice sobre ellos para limitar la adherencia de los microorganismos después de la limpieza y desinfección, son factores determinantes en la higiene de las superficies. Materiales extremadamente porosos o rugosos ofrecen una superficie más apropiada para la adherencia, la presencia de estas irregularidades favorece el refugio de residuos orgánicos y microorganismos. De igual manera, las grietas, ranuras y manchas de corrosión dificultan los procesos de limpieza y desinfección. Las paredes, los techos y los suelos deben ser lisos, impermeables a los líquidos y resistentes a los productos químicos y desinfectantes. El material más práctico y por consiguiente el más utilizado en los equipos y superficies de trabajo es el acero inoxidable, ya que puede tratarse previamente de diversas maneras con el fin de obtener superficies fáciles de limpiar, además de ser un material estable (11).

Es objetivo de este trabajo evaluar la eficacia de los desinfectantes AniosSpecial DJP SF, Aniosurf Premium, Bacteranios SF, Aniospray 29, Aseptanios AD y Surfianios, para la limpieza del área aséptica de la Planta de Productos Parenterales 2 (PPP2) de BioCen.

Materiales y Métodos

Valoración de la eficacia de los desinfectantes *in situ*

Desinfectantes de superficies: Para los ensayos de eficacia se emplearon los productos de desinfección de superficies (Aniosurf Premium, Bacteranios SF y Surfianios) que cumplen con las características de ser detergentes desinfectantes para suelos y superficies; se utilizaron a una concentración de 0,25%.

Desinfectantes de superficies por vía aérea: Los productos de desinfección de superficies por vía aérea (Anios Special DJP SF, Aniospray 29 y Aseptanios AD) cumplen con las características de ser detergentes desinfectantes para suelos y superficies que se utilizan de forma pura.

La eficacia de los desinfectantes se cuantificó, mediante prueba de reto en superficie, frente a las cepas que exigen las regulaciones y las seleccionadas como flora autóctona del área aséptica de la PPP2 de BioCen. Para ello se utilizaron segmentos de superficies como acero, panel, piso y cristal de acuerdo a lo recomendado por la Asociación Española de Normalización y Certificación (12-14).

Las cepas de referencia, así como cepas aisladas de la microbiota autóctona del área aséptica de PPP2 fueron suministradas por el Cepario de BioCen y se muestran a continuación:

- Cepas de referencia

Escherichia coli ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

- Cepas autóctonas

Micrococcus sedentarius y *Staphylococcus hominis*.

Diseño del ensayo

Según lo regulado en la USP 37(5) las superficies a ensayar se marcaron con cuadrantes de 25 cm², dos de los cuales correspondían al control positivo y los otros al desinfectante, tal como se muestra en la Figura 1.

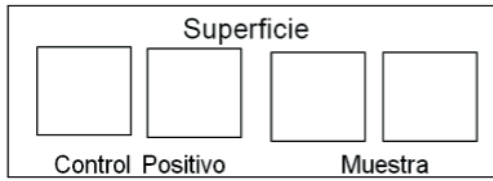


Fig. 1. Disposición de las muestras y controles en la superficie.

Se realizaron dos diluciones seriadas a partir del medio de conservación de cada cepa en tubos de 9 mL de solución salina fisiológica (SSF) hasta la dilución donde se esperaba obtener una concentración de 10^4 UFC/0,1 mL. Se sembró por duplicado en placas de Agar Triptona Soya (ATS), 0,1 mL de la dilución correspondiente. Posteriormente se inoculó en cada cuadrante de la superficie 0,1 mL del microorganismo a ensayar, y se dejó secar el inóculo en la superficie a temperatura ambiente.

La biocarga de los cuadrantes correspondientes al control positivo fue recolectada mediante hisopado de superficie. El hisopo se utilizó inclinándolo en un ángulo de 30°.

El hisopo con la biomasa recogida se colocó en un tubo con 10 mL de SSF. De este, se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo con 9 mL de SSF (dilución 1/10). A partir de ambos tubos, se sembraron por duplicado placas de ATS, a razón de 0,1 mL de suspensión por placa.

Se aplicó el desinfectante a ensayar en los cuadrantes correspondientes a la muestra y se dejó en contacto con el microorganismo durante 10 min.

Pasado el tiempo de contacto se simuló el proceso de limpieza. Luego, empleando un equipo de filtración por membrana, se filtró a través de una membrana de nitrato de celulosa de 0,45 μ m el contenido de los tubos de 10 mL correspondientes a la recogida de biocarga de los cuadrantes de muestra.

Por último, se colocaron las membranas en placas de ATS con neutralizantes (lecitina al 0,07%, polisorbato 80 al 0,5%; histidina al 0,05% y tiosulfato de sodio al 0,05%) y se incubaron las placas inoculadas con

bacterias vegetativas a $37 \pm 2,5$ °C durante 20 a 24 h y las inoculadas con bacterias esporuladas y hongos de $31 \pm 2,5$ °C durante 24 a 72 h.

Con los datos obtenidos se empleó la fórmula siguiente:

$$\text{Eficacia del desinfectante} = \text{Log UFC}/10\text{mL}_{(\text{Control positivo})} - \text{Log UFC}/10\text{mL}_{(\text{muestra})}$$

El desinfectante es eficaz si el mismo logra reducir la carga microbiana al menos en dos órdenes logarítmicos, para los que tienen acción contra las esporas bacterianas y hongos y al menos tres órdenes logarítmicos para los que tienen acción contra bacterias vegetativas.

Comparación del número de microorganismos antes y después del uso de los desinfectantes

El estudio fue realizado en el área de preparación de materiales de la PPP 2, clasificada como grado D, el límite de aceptación en Grado D para el muestreo de superficies por placas de contacto RODAC es de 50 ufc/ 25 cm². Se comprobó la efectividad del esquema de rotación de los desinfectantes propuestos en la Tabla 1 para un mes de trabajo (enero 2016).

Los muestreos fueron realizados a las 7:00 a.m. (área limpia) y posteriormente a las 3:00 p.m. (área sucia) de todos los días del mes para un total de 27 muestras antes de limpiar y 27 muestras después de la limpieza por cada superficie, para un total de 162 muestras.

Las muestras fueron tomadas durante los muestreos rutinarios a las áreas, siguiendo los procedimientos establecidos en el centro para el muestreo de superficies. Las placas utilizadas en los muestreos fueron incubadas de 30-35 °C durante 48 h para bacterias y a 20-25 °C por 72 h para hongos.

Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en los muestreos de las superficies antes y después de la limpieza del local fueron procesados mediante pruebas de hipótesis para la comparación de medianas con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. También se utilizó la prueba de Mood

Tabla 1. Ciclos de rotación de los desinfectantes.

Ciclo	Desinfectante	Desinfectante vía aérea	Nivel de acción
1	Surfanios	AniosSpecial DJP SF	Bactericida-Fungicida
2	Bacteranios SF	Aseptanios AD	Bactericida-Fungicida- Esporicida
3	Aniosurf Premium	Aniospray 29	Bactericida-Fungicida

para evaluar la hipótesis de medianas iguales. Todas las pruebas se realizaron para un 95% de confianza ($\alpha=0,05$).

Comparación de la microbiota del área antes y después del empleo de los desinfectantes

Se caracterizó la microbiota endógena del área según los procedimientos establecidos en BioCen, antes y después de la limpieza con los nuevos desinfectantes. Se compararon los microorganismos obtenidos, para determinar si hay variación de dicha microbiota.

Resultados y Discusión

Análisis *in situ* de la actividad bactericida de los desinfectantes

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con los desinfectantes Surfanios, Bacteranios SF y Aniosurf Premium respecto a la actividad bactericida.

Como se puede observar los desinfectantes se declaran eficaces contra bacterias vegetativas, pues logran reducir la carga microbiana en 3 o más logaritmos, de acuerdo a los requerimientos establecidos por Guerra (15). Con todos los desinfectantes se obtuvieron resultados similares a los reportados por Díaz-Enriquez en 2016 (16).

Hernández (17) obtuvo resultados similares al retar los desinfectantes Solprogel, Perasafe y Cidex con las mismas cepas evaluadas en este trabajo. También Gallardo (18) realiza la evaluación de la acción antimicrobiana de un desinfectante de uso industrial

y doméstico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo resultados satisfactorios. En los trabajos mencionados anteriormente el criterio de reducción usado fue de más de 3 órdenes logarítmicos para bacterias vegetativas.

Análisis *in situ* de la actividad fungicida de los desinfectantes

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos respecto a la actividad fungicida.

Como se puede observar los desinfectantes se declaran eficaces contra hongos, pues disminuyen la carga microbiana en más de dos órdenes logarítmicos de acuerdo a los requerimientos establecidos por Guerra (15). Los resultados de eficacia fungicida son similares a los logrados por Díaz-Enriquez (16).

Resultados de la comparación del número de microorganismos antes y después del uso de los desinfectantes

La Prueba de Wilcoxon para la comparación de las medianas del número de microorganismos detectados antes y después del uso de los desinfectantes, monitoreados durante un mes de trabajo, indicaron diferencias estadísticamente significativas, con valores p de 0,004; 0,008 y 0,007 para el techo, pared y piso respectivamente.

Las pruebas de Mood también indicaron diferencias estadísticamente significativas con valores p de 0,035; 0,007 y 0,003. En todos los casos se rechaza la

Tabla 2. Actividad bactericida de los desinfectantes Surfanios, Bacteranios SF y Aniosurf Premium.

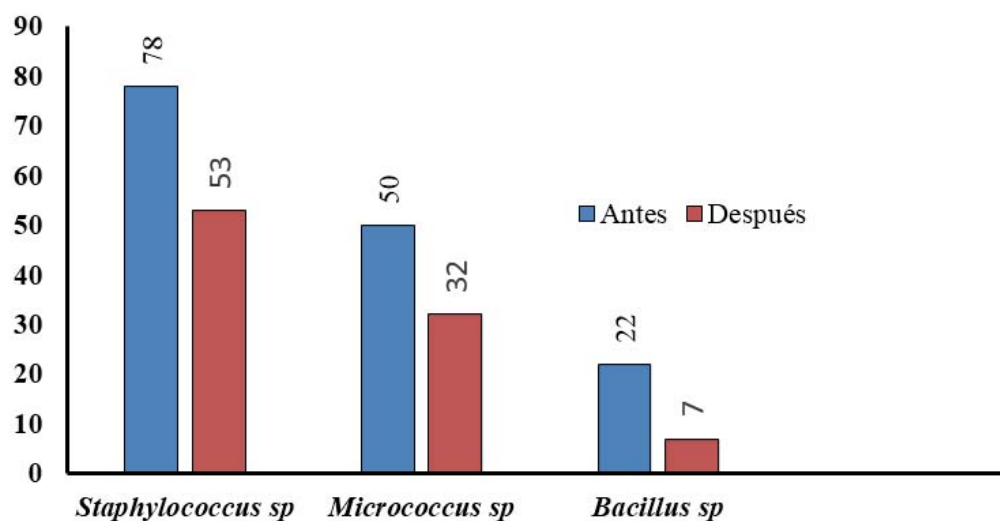
Desinfectante Reducción logarítmica/ microorganismo	Surfanios Superficie				Bacteranios SF Superficie				Aniosurf Premium Superficie			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,4	3,2	3,3	3	4	3,9	4,3	4	4,2	4,3	4,1	3,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,9	4,2	3,8	4	3,5	3	3,4	3,2	5,1	5,1	4,6	4,9
<i>Escherichia coli</i>	3,6	3,6	3,7	3,7	5	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,2
<i>Micrococcus sedentarius</i>	5,2	4,3	5,3	5,3	4	4	4	4,1	4,1	3,8	3,8	3,4
<i>Staphylococcus hominis</i>	4,1	4	4	4	4,7	4,6	4,5	4,5	4,0	4,0	3,9	3,9

Superficies: A: Acero inoxidable, B: Panel, C: Piso D: Cristal

Tabla 3. Actividad fungicida de los desinfectantes Surfanios, Bacteranios SF y Aniosurf Premium.

Desinfectante	Surfanios				Bacteranios SF				Aniosurf Premium			
	Superficie				Superficie				Superficie			
Reducción logarítmica	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Candida albicans</i>	3,5	3,5	3,6	3,5	2,7	2,6	2,7	2,6	3,3	3,5	3,1	3,5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	3,7	2,4	2,9	3,5	2,5	2,1	3,7	2,1	2,9	2,3	2,4	2,2

Superficies: A: Acero inoxidable, B: Panel, C: Piso D: Cristal

**Fig. 2.** Cepas aisladas antes y después del uso de los desinfectantes.

hipótesis de que no existen diferencias estadísticamente significativas para $\alpha = 0,05$ (19).

Resultados de la comparación de la microbiota del área antes y después del empleo de los desinfectantes

Con esta comparación se pudo apreciar que la microbiota endógena del área aséptica de PPP2 no sufrió cambios significativos con el uso en la limpieza de los nuevos desinfectantes (Fig. 2). En ambos casos, antes y después del uso, prevaleció el género *Staphylococcus sp* como el de mayor incidencia en las identificaciones realizadas, seguidas por los géneros *Micrococcus sp* y *Bacillus sp* respectivamente.

La disminución a más de la mitad de la proporción de los aislamientos del género *Bacillus sp* es la más representativa de la actividad del ciclo de desinfectantes empleados, ya que los géneros *Micrococcus sp* y *Staphylococcus sp* son provenientes del hombre y su presencia es inevitable en los ambientes donde laboran los operarios, mientras

que el género *Bacillus sp* proviene, generalmente, de la presencia de alguna suciedad (16).

Conclusiones

1. La eficacia in situ de los desinfectantes Anios Special DJPSF, Aniosurf Premium, Bacteranios SF, Aniospray 29, Aseptanios AD y Surfanios quedó demostrada, ya que logran reducir más de dos órdenes logarítmicos los que tienen acción contra las esporas bacterianas y hongos y más de tres órdenes logarítmicos para los que tienen acción contra bacterias vegetativas.
2. Los nuevos desinfectantes logran reducir la carga microbiana presente en las áreas de trabajo.
3. La microbiota endógena del área antes y después de la implementación de los desinfectantes no varía en cuanto a los tres géneros detectados, solamente existe una disminución en la proporción de los aislamientos del género *Bacillus sp*.

Referencias

1. The International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration ISO 14644-1:2015. Geneva: ISO; 2015.
2. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Estériles. Anexo No. 04. de la Regulación No 16-2006. Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana: CECMED; 2006.
3. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice. Silver Spring, US: FDA; 2004.
4. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas de Manufactura Vigentes. Serie de Informes Técnicos No. 823. Ginebra: OMS; 1992.
5. United States Pharmacopeia, USP 37-NF32 Pharmacopeial Forum: 1072 Disinfectants and Antiseptics. Rockville, US: United States Pharmacopeial Convention; 2012.
6. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, Buenas Prácticas de Limpieza en la Fabricación de Productos Farmacéuticos e Ingredientes Activos. Anexo No. 11. de la Regulación No. 16-2012. La Habana: CECMED; 2012.
7. Gava-Mazzola P, Faustino-Jozala A, Moriel P, Vessoni-Penna TC. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and / or sterilizing agent. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009;45(2):241-8.
8. Reyes-Díaz B, Gasmuri C, Baltrell N, Hierrezuelo A, Estenez L, Álvarez D, et al. Strategies for the Assessment of Disinfection and Cleaning on Biopharmaceutical Cleanroom. *Advances in Biomedical Engineering Research* 2014;2:18-27.
9. Medina-Córdoba LC, Valencia-Mosquera LL. Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrógeno, empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios. [Tesis de Grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
10. Galán-Alejo LC. Desarrollo de métodos rápidos para verificar la eficacia fungicida de sustancias desinfectantes [Tesis Doctoral]. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona; 2003.
11. Ríos-Castillo AG. Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo. Nuevos métodos. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2013.
12. Asociación Española de Normalización y Certificación. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Madrid: AENOR; 2009.
13. Asociación Española de Normalización y Certificación. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área alimentaria, industrial. UNE EN 1650. Madrid: AENOR; 2008.
14. Asociación Española de Normalización y Certificación. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad esporicida básica. UNE EN 14347. Madrid: AENOR; 2005.
15. Guerra D. Uso de antisépticos y desinfectantes. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá* 2005;24(4):201-3.
16. Díaz-Enriquez E. Determinación de la eficacia de los desinfectantes utilizados en las áreas asépticas de BioCen. [Tesis de Maestría] La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana; 2016.
17. Hernández-Rodríguez Á. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2006.
18. Gallardo-Troncoso MD. Acción antimicrobiana de un desinfectante de uso industrial y doméstico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. [Tesis de grado]. Santiago: Universidad de Chile; 2006.
19. Espejo-Miranda I, Fernández-Palacín F, López-Sánchez MA, Muñoz-Márquez M, Rodríguez-Chía AM, Sánchez-Navas A, et al. Inferencia Estadística. Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz; 2007.

Determination of the efficacy of the disinfectants employed in the aseptic areas at a biopharmaceuticals production center

Abstract

In the biopharmaceutical industry, disinfection has become a fundamental part of the activities to control the level of contaminants microorganisms that could compromise the quality of the final product. The objective of this work was to evaluate the efficacy of the disinfectants Anios Special DJP SF, Aniosurf Premium, Bacteranios SF, Aniospray 29, Aseptanios AD and Surfianios for the cleaning and disinfection of the aseptic area at the Parenterals Products Plant 2 (PPP2) at the National Center for Bioproducts (Mayabeque, Cuba). The efficacy was checked with challenge tests in surfaces, in practical usage conditions. The number of isolated microorganisms and the microbiota present before and after use was compared statistically. All the disinfectants complied with the established requirements. Therefore, the efficacy of the disinfectants was demonstrated to perform the cleaning and disinfection of the aseptic areas.

Keywords: disinfectants, contamination, clean rooms, biopharmaceutical industry.
