

**EFICACIA BIODESCONTAMINANTE OBTENIDA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE VIRKON<sup>®</sup>, PERASAFE<sup>®</sup> E HIDRÓXIDO SÓDICO SOBRE SUPERFICIES DE ALTO RIESGO MICROBIOLÓGICO**

**BIODECONTAMINANT EFFECTIVENESS OBTAINED BY MEAN THE USE OF VIRKON<sup>®</sup>, PERASAFE<sup>®</sup> AND SODIUM HYDROXIDE IN SURFACES OF MICROBIOLOGICAL HIGH RISK**

G. Pascual Álvarez<sup>1</sup>, P. De Miguel Casas<sup>2</sup>, J.M. Ramírez<sup>3</sup> y M.C. Bartolomé<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Jefe de Bioseguridad y Biocontención. Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, España. <sup>2</sup>Técnico de Bioseguridad. DALKIA Energía y Servicios, S.A., España

<sup>3</sup>Dpto. Toxicología y Farmacología, Fac. de Veterinaria, UCM, España

<sup>4</sup>Fac. de Químico-Farmacobiología, UMSNH, Michoacán, México

\*correspondencia con el autor: carbarcam@hotmail.com

**RESUMEN**

La eficacia de la actividad biodescontaminante de los productos Virkon<sup>®</sup>, Perasafe<sup>®</sup> e hidróxido sódico, ha sido evaluada. Los compuestos fueron ensayados en boxes de laboratorios de contención con bioseguridad nivel 3 (NCB3), destinados a alojar animales de experimentación para el estudio de peste porcina africana (PPA), fiebre aftosa (FA) y virus del Nilo Occidental (VNO). Las muestras procedentes de diferentes puntos fueron obtenidas mediante placas RODAC, antes y después de la aplicación del tratamiento desinfectante sobre la superficie ensayada, y los resultados obtenidos fueron expresados como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml). Los resultados obtenidos indican que todos los compuestos ensayados demostraron un alto nivel de eficacia biodescontaminante, pero sin embargo el efecto inducido el compuesto Perasafe<sup>®</sup> aportó un nivel de eficacia superior al obtenido con los otros compuestos. Así, estos resultados permiten afirmar la idoneidad de Perasafe<sup>®</sup> para la desinfección de espacios con nivel 3 de bioseguridad.

**Palabras clave:** Biodescontaminación, NCB3, Superficies, RODAC, Vikon<sup>®</sup>, Perasafe<sup>®</sup>, hidróxido sódico.

## ABSTRACT

Biodecontaminant effectiveness obtained in surfaces treated with Virkon<sup>®</sup>, Perasafe<sup>®</sup>, and sodium hydroxide has been evaluated. The selected compounds were used in boxes from Biosafety Level 3 containment laboratories (NCB3) for animals exposed to classical swine fever (CSF), foot and mouth disease (FMD), and west Nile virus (WNV). The samples from selected points were obtained by mean RODAC plates, before and after to the use of selected compounds on surfaces, and the results obtained were expressed as colony-forming units per milliliter (cfu/ml). Results shown that all compounds assayed demonstrated high biodecontaminant efficacy levels; but however Perasafe<sup>®</sup> was more effective than others compounds assayed. Thus, these results allow affirming that Perasafe<sup>®</sup> is suitable for the disinfection of surfaces from NCB3 spaces.

**Keywords:** Biodecontamination, NCB3, surfaces, RODAC, Vikon<sup>®</sup>, Perasafe<sup>®</sup>, sodium hydroxide.

## INTRODUCCIÓN

Trabajar con agentes biológicos patógenos que entrañan un alto riesgo para la seguridad sanitaria, personal y colectiva, requiere de una instalación que presente unas medidas de contención biológica excepcionales (R. D. 664/1997), de unos sistemas de biodescontaminación/esterilización eficaces (CDCP, 1993). y de la implantación de una metodología de validación microbiológica de superficies y espacios que garantice la eliminación de cualquier microorganismo que represente la más mínima posibilidad de dar lugar a una contaminación cruzada o a un escape al exterior.

Contra el éxito de la acción de un sistema biodescontaminante, pueden manifestarse una serie de factores que es necesario tener en cuenta, tales como la incorrecta elección del producto descontaminante, el exceso en la dilución de la solución preparada y/o tiempo de contacto insuficiente, las condiciones termohigrométricas inadecuadas, la presencia de materia orgánica en el área debida a la ausencia del proceso de limpieza previo o realización del mismo de forma incompleta y que den lugar a la inactivación del producto, la aplicación incorrecta del biodescontaminante en puntos de difícil acceso, la ausencia de hermeticidad total del área a tratar o del equipo específico de descontaminación biológica y la aplicación continuada de sustancias desinfectantes que actúan como fijadores, tales como alcoholes y aldehídos (MAFF, 1994).

Salvados los anteriores condicionantes, un buen agente biodescontaminante deberá reunir todas o la mayor cantidad posible de las siguientes consideraciones (García-Saavedra y Vicente, 1997; Richmond y Nesby-O'Dell, 2003), tales como la de presentar una acción rápida, eficaz y de amplio espectro, ser efectivo frente a la presencia de materia orgánica, jabones o detergentes, no ser tóxico para el operario ni corrosivo, impidiéndose el daño a instalaciones (conductos, rejillas, etc.), disponer de buena capacidad de penetración y estabilidad en concentrada y diluida, no ser colorante, ser biodegradable, sin olor o con olor agradable y resultar económico, de fácil uso y fácilmente accesible en el mercado. Existen diferentes sistemas químicos de descontaminación biológica para espacios y todos ellos presentan ventajas y desventajas en su aplicación (Rutala, 1990; Mc Donnell y Rusell, 1999). En el estudio se han utilizado biodescontaminantes de amplio espectro y fácil uso.

El hidróxido sódico (NaOH) posee propiedades microbicidas aunque su actividad es lenta (Renz *et al.*, 2005). La actividad se incrementa cuando se aumenta la temperatura. Actúa a través de los iones H<sup>+</sup> que destruyen los puentes de aminoácidos en los ácidos nucleicos, modificando también el pH del citoplasma y precipitando las proteínas. Por su parte los iones OH<sup>-</sup> saponifican los lípidos en la envoltura externa (tanto en el caso de las bacterias como en el de los virus envueltos), conduciendo después a la destrucción de las estructuras de superficie. A pH superior a 10 tiene lugar la hidrólisis de los nucleótidos en el genoma vírico.

Virkon<sup>®</sup> presenta una actuación de amplio espectro frente a bacterias, hongos y virus. Las soluciones son estables aproximadamente 7 días y se presenta una mezcla equilibrada y estabilizada de compuestos peroxidados, tensoactivos y ácidos orgánicos. Funciona mediante la destrucción física de microorganismos Actúa por oxidación de las diferentes estructuras bacterianas produciendo disrupción de la pared celular y la consiguiente muerte. Los compuestos peroxigenados pueden causar también degradación e inactivación de los ácidos nucleicos por su fuerte potencial oxidante. Distintos estudios clínicos han mostrado la actividad microbicida del Virkon<sup>®</sup>. Sin embargo las controversias sobre su efectividad han creado incertidumbre sobre el uso. (Hernández *et al.*, 2000; Suárez *et al.*, 2003; McCormick y Maheshwari, 2004; Chan y Abu Bakar, 2005).

Perasafe<sup>®</sup> presenta un sistema peróxido que genera un equilibrio de iones peracetato a pH 8.0 equivalentes a una concentración del 0,26% de ácido peracético. La solución también contiene peróxido de hidrógeno y ácido acético, descomponiéndose finalmente en dióxido de carbono y agua. Su mecanismo de acción es debido a la oxidación de proteínas. Se parte de la hipótesis de destruye las membranas celulares mediante la ruptura de los enlaces sulfuro y sulfhidrilo. Es activo frente a bacterias, hongos, levaduras, endosporas y virus. Ya en 1902,

Freer y Novy (1902) dieron a conocer las excelentes propiedades del ácido peracético como agente germicida, afirmando la excelente acción desinfectante y esterilizante en frío del ácido peracético. En 2002 quedó demostrado cómo el ácido peracético era el germicida más activo de entre otros 23 elementos testados frente a esporas de *Bacillus thermoacidurans* (Steris Co., 2002). Estudios posteriores catalogaron al ácido peracético como bactericida al 0,001%, fungicida al 0,003% y esporicida al 0,3%.

Asumiendo que los descontaminantes utilizados son útiles y de probada eficacia para la descontaminación de superficies convencionales, el presente estudio tiene por objeto determinar si esta capacidad se mantiene con los desinfectantes ensayados, en función de los resultados de validación obtenidos, cuando son utilizados en instalaciones NCB3 (Nivel de Contención Biológica 3) y en concreto en locales con animales de experimentación donde la acumulación y dispersión de residuos orgánicos producto del metabolismo es muy alta, generándose una carga microbiológica muy significativa sobre las superficies.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### *Reactivos químicos y Formulados*

El hidróxido sódico fue obtenido de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los formulados Virkon<sup>®</sup> y Perasafe<sup>®</sup> fueron obtenidos de DuPont Co. (DuPont Company, Suffolk, UK). La composición de ambos formulados, de acuerdo con la ficha de seguridad aportada por la Compañía, se incluye en la Tabla 1.

	n° CAS	[(%)]
<b>Virkon®</b>		
Pentapotásico-bis(peroximonosulfato)-bis(sulfato)	70693-62-8	40-50
Ácido bencensulfónico	90194-45-9	10-12
Ácido sulfamídico	5329-14-6	4-6
Ácido málico	6915-15-7	7-10
Polifosfato de Sodio	68915-31-1	20-25
Peroxodisulfato de dipotasio	7727-21-1	<1,49
<b>Perasafe®</b>		
Acido cítrico	77-92-9	20-25
Alkiarilsulfonato sódico	25155-30-0	1-2
Perborato sódico	11138-47-9	40-60

**Tabla 1.** Composición e información de los componentes que integran el formulado Virkon®-S y Perasafe®, según las fichas de datos de seguridad editadas por Dupont, de acuerdo con la Directiva 2001/58/CE (D.O. L212, 2001)

### Metodología de Trabajo

Los ensayos cuantitativos de suspensión para la valoración de los compuestos ensayados fueron realizados bajo Norma UNE (UNE-EN 1276, 2010), la cual requiere la formalización de un escenario bajo condiciones reales en ambiente “sucio” (presencia de materia orgánica) y practicando las diluciones de los distintos desinfectantes en agua dura. Bajo estas condiciones, se requiere del desinfectante una reducción mínima de 5 unidades logarítmicas, en 5 minutos de contacto y a una temperatura de 20 °C, para considerarlo dentro de norma.

El estudio fue practicado en espacios destinados a animalario, dentro de una instalación NCB3 de un Centro de Investigación Animal (CISA, Valdeolmos, España), lugar donde se desarrollan los trabajos *in vivo* con agentes patógenos de alto riesgo, y por tanto representa el punto más crítico dentro de este tipo de instalaciones. Bajo estas condiciones, 4 boxes de la instalación fueron utilizados para los experimentos. Dos de ellos de Nivel 3, uno con animales de experimentación inoculados con el virus de la Peste Porcina Africana (cerdos Large White de 20 a 25 kg de peso) y el otro con animales inoculados con el virus de la

Influenza Porcina (ratones Balb/c jóvenes y adultos); mientras que los otros dos de Nivel 3+, uno de ellos con animales de experimentación inoculados con el virus de la Fiebre Aftosa (cerdos minipig de 25-30 kg de peso) y el otro con animales de experimentación inoculados con el virus del Nilo Occidental (ratones Swiss genotipo Hsd ICR (CD-1), y B6CBAx129/ola Genotipos TgHuMet, TgHuVal y TgHuMet/Val).

Cada box fue muestreado en diferentes puntos seleccionados atendiendo a las peores condiciones de contaminación biológica previsible en cada caso. En cada uno de ellos se practicó un total de 30 muestras seriadas, separadas en el tiempo por periodos de 48 horas, para cada uno de los compuestos ensayados. Cada muestreo fue acompañado tanto de un ensayo control de superficie como de un control ambiental mediante un contador de partículas HIAC/Royco 8000A (Pacific Scientific, Rockford, IL, USA). Los espacios fueron sometidos tratamientos de desinfección con NaOH al 2% durante un periodo de tiempo de exposición de 20 minutos, Virkon<sup>®</sup> al 2% y exposición de 20 minutos, y Perasafe<sup>®</sup> al 1.62% y exposición a 10 minutos.

Las muestras de superficie se obtuvieron mediante el uso de placas de contacto RODAC (Scharlab S.L., Barcelona, ES), con agar triptona de soja (TSA) como medio de cultivo, y suplementado con histidina y lecitina como neutralizantes de desinfectantes y detergentes con actividad antimicrobiana. Las placas, una vez expuestas, fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas, para el posterior conteo de las colonias aparecidas después del periodo de incubación.

La recuperación de los microorganismos supervivientes se ha realizado mediante cultivo directo en medio sólido (Scharlab S.L., Barcelona, ES) de al menos un equivalente a 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml), después de llevar a cabo la neutralización selectiva de cada uno de los compuesto ensayados (Tabla 2).

<b>Hidróxido sódico</b>	<b>Virkon<sup>®</sup></b>	<b>Perasafe<sup>®</sup></b>
Ac. clorhídrico, 0.1 %	Tiosulfato sódico, 1%	Tween 80, 3 ml
Suero bovino fetal, 10%	Suero bovino fetal, 10%	L-histidina, 0.1 g
		Tiosulfato sódico, 0.5 g
		Lecitina, 0.3 g
		Tampón fosfato, 2.5 mM

**Tabla 2.** Elementos que constituyen los neutralizantes específicos para cada compuesto ensayado.

### Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se presentan como reducción de unidades logarítmicas, obtenidas mediante la expresión:

$$\log \frac{N}{N_0}$$

donde  $N_0$  es el valor de unidades formadoras de colonias (ufc) inicial, y N el valor de ufc después de cada tratamiento. Los valores son expresados como la media $\pm$ d.s. de un total de 30 ensayos microbiológicos (n=30).

### RESULTADOS

El seguimiento de las condiciones en las que se practicaron los diferentes ensayos determinó que éstas cumplieran con la norma AFNOR que había sido propuesta como protocolo normalizado de actuación. Así, se pudo constatar que los valores de temperatura y humedad no variaron en más de 1 °C y 45 %, respectivamente, en todo el periodo de experimentación. Igualmente, la velocidad del aire en el interior del box resultó ser la misma durante los ensayos de validación (0,5 m/s).

Los valores obtenidos en los ensayos de neutralización con los distintos biocidas se presentan en la Tabla 3. En todos los casos, los resultados indican valores superiores al 50 % respecto al recuento control por lo que, según la norma AFNOR, el neutralizante utilizado en cada caso resulta adecuado para inactivar el producto a las concentraciones utilizadas.

Compuesto	Recuento inicial	$N_0$	Recuento final	N
Perasafe <sup>®</sup>	172 $\pm$ 1.65	1.72x10 <sup>6</sup>	125 $\pm$ 1.72	1.25x10 <sup>6</sup>
Virkon <sup>®</sup>	315 $\pm$ 1.58	3.15x10 <sup>6</sup>	253 $\pm$ 1.67	2.53x10 <sup>6</sup>
NaOH	145 $\pm$ 1.70	1.45x10 <sup>6</sup>	120 $\pm$ 1.71	1.20x10 <sup>6</sup>

$N_0$ : ufc/ml al inicio del ensayo; N: ufc/ml al final del ensayo; NaOH: hidróxido sódico

**Tabla 3.** Valoración del efecto de los neutralizantes para cada uno de los biocidas ensayados. Los valores se presentan como la media de ufc/ml  $\pm$  d.s., obtenidos mediante cinco réplicas de cada uno de los cuatro boxes estudiados.

Los resultados obtenidos, tras exposiciones de 10 minutos a cada uno de los biocidas ensayados y sobre los respectivos boxes correlacionados con cada una de las cargas víricas seleccionadas, son expuestos en la Tabla 4. El análisis de estos resultados indica que los tres biodescontaminantes ensayados presentaron un alto grado de eficacia frente a superficies con alta carga virucida, con titulaciones finales entre  $5.05 \pm 1.42$  y  $6.39 \pm 1.35$  en todos los casos, con independencia del tipo de virus.

Virus	Título inicial	Título final		
		Perasafe®	Virkon®	NaOH
PPA	$2.41 \pm 1.46$	$6.25 \pm 1.31$	$5.89 \pm 1.29$	$4.99 \pm 1.40$
WNV	$1.72 \pm 1.51$	$6.39 \pm 1.35$	$6.01 \pm 1.42$	$5.25 \pm 1.32$
FA	$2.31 \pm 1.48$	$6.21 \pm 1.34$	$5.80 \pm 1.33$	$5.05 \pm 1.42$
IP	$2.37 \pm 1.41$	$6.31 \pm 1.29$	$5.92 \pm 1.38$	$5.12 \pm 1.48$

PPA: peste porcina africana; WN: virus del Nilo Occidental; FA: fiebre aftosa; IP: influenza porcina

**Tabla 4.** Valores de reducción logarítmica obtenidos mediante la aplicación de los biodescontaminantes estudiados en los diferentes escenarios previstos en el protocolo de estudio. Los datos se presentan como la media de reducción  $\text{Log} \pm \text{d.s.}$ , obtenidos mediante 30 réplicas de cada uno de los cuatro boxes estudiados.

## DISCUSIÓN

Los niveles de desinfección resultan ser uno de los principales problemas para la mayoría de los laboratorios que desarrollan líneas de investigación experimentales, y que trabajan en un entorno de nivel 3 de seguridad y contención biológica. Las superficies tratadas, al estar en contacto con los animales de experimentación, alimentos, aguas de bebida y limpieza, camas de paja y serrín, excrementos y otros fluidos, que no son profundamente eliminados durante las experiencias por imposibilidad técnica y operativa, mantienen una alta concentración de residuos orgánicos, que unida a unas condiciones ambientales microclimáticas (humedad, temperatura, ...) permiten un mayor crecimiento microbiológico (Chosewood y Wilson, 2009).

Esta circunstancia, a la que se añade el uso reiterado de los espacios para experiencias seriadas con agentes biológicos de distinta naturaleza y forma de transmisión, constituyen el principal problema a la hora de concluir un proceso de biodescontaminación con la máxima garantía, ya que proporciona al técnico de seguridad biológica encargado de las



biodescontaminaciones, un grado de incertidumbre en la garantía sanitizadora suficientemente significativa como para que en algunos casos, sea necesario asegurar un resultado óptimo repitiendo los procesos de descontaminación con el mismo bioescontaminante o con otros alternados en varios ciclos. Por lo tanto, la garantía de estos procesos simples o redundantes no se basa en la comprobación de la evidencia descontaminante por la implantación de un método cuantitativo reproducible, sino por la ausencia en el tiempo de contaminaciones cruzadas (Richmond y Nesby-O'Dell, 2002).

En base a todo ello, el presente estudio comparativo trata de aportar una visión cuantitativa del comportamiento de los descontaminantes biológicos seleccionados entre sí, en un mismo entorno biocontenido de nivel 3, y tratando de ofrecer al técnico de Seguridad Biológica una herramienta de uso rutinario para la validación de las biodescontaminaciones a afrontar. Los resultados obtenidos han demostrado que tanto los formulados Virkon<sup>®</sup> y Perasafe<sup>®</sup> como el NaOH se comportan como excelentes biodescontaminantes sobre superficies que soportan una alta carga orgánica contaminada, siendo equiparables a los resultados obtenidos por otros autores con diferentes tipos de biocidas (Van Klingeren *et al.*, 1998; Eleraky *et al.*, 2002; Müller y Kramer, 2008).

Partiendo de esta similitud en cuanto a eficacia, resulta evidente que parámetros adicionales serán necesarios para la selección del tipo de biodescontaminante que ofrezca, además de resultados óptimos en desinfección, ventajas respecto a los demás.

El NaOH presenta niveles de eficacia altos, comparables a los resultados obtenidos por otros autores (Vasseur *et al.*, 2001). Sin embargo, el tipo de desinfección que se aplica, de un marcado carácter alcalino, parece desaconsejar su utilización, al menos como práctica habitual.

Los niveles de eficacia obtenidos con el formulado Virkon<sup>®</sup>, que demuestran el alto grado de desinfección que es posible alcanzar con su uso, 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). Adicionalmente, el formulado Virkon<sup>®</sup> presenta un mantenimiento de su actividad biodescontaminante mayor en el tiempo (> 72 horas) que los demás estudiados, mostrando la característica del viraje de color cuando deja de ser activo, exhibe una baja ecotoxicidad conjuntamente con un alto grado de biodegradabilidad, y a la concentración del 1% está clasificado como no irritante de piel y ojos (McCormick y Maheshwari, 2004). Sin embargo, presenta como desventajas su pH bajo, lo que puede provocar un ataque a las instalaciones de acero estirado y acero inoxidable en exposiciones a largo plazo, además de necesitar un tiempo de residencia elevado (20 minutos) para ser eficaz.

Los estudios realizados con el formulado Perasafe<sup>®</sup> han demostrado su alta eficacia frente a gran número de microorganismos, siendo los resultados obtenidos por los diferentes autores muy similares a los obtenidos por nosotros (Stanley, 1999; Hernández *et al.*, 2003). Perasafe<sup>®</sup> presenta como ventajas el ser un esterilizante en frío, con un valor de pH alrededor de 8 y por lo tanto inactivo frente a la mayoría de los materiales estructurales, y necesitar un tiempo de residencia para ser efectivo de 10 minutos. Como desventaja presenta un coste muy superior al Virkon<sup>®</sup> y una actividad máxima de 24 horas.

En el presente estudio, los ensayos con Perasafe<sup>®</sup> indican un mayor nivel de eficacia que el resto de compuestos, con independencia de la superficie involucrada, si bien la mayor reducción logarítmica ha sido obtenida en las superficies donde se estabulaban los animales para la experimentación con el virus WNV. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estas superficies corresponden a un box que, manteniendo estabulados a los ratones en cubetas, la liberación de residuos al espacio es limitada, al contrario que ocurría en los boxes donde se mantenían estabulados cerdos, los cuales provocan la dispersión de la carga orgánica sobre la totalidad de la superficie.

## CONCLUSIONES

En resumen, el presente estudio muestra que Perasafe<sup>®</sup> no sólo resulta ser una alternativa efectiva para procesos de biodescontaminación de superficies en nivel 3 de bioseguridad sino que, teniendo en cuenta el conjunto de datos respecto a la eficacia biodescontaminante, características químicas y de aplicación, y la ausencia de producción de daño en superficies, lo convierten *a priori* en un producto ideal para su uso en cualquier tipo de instalación biológica de alto riesgo.

## AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a D. Francisco Hurtado y a D. Daniel Hurtado, de FHP S.L., por su colaboración y asesoramiento técnico.

## BIBLIOGRAFIA

- Angelillo IF, Bianco A, Nobile CGA y Pavia M (1998) Evaluation of the efficacy of glutaraldehyde and peroxygen for disinfection of dental instruments. *Lett Appl Microbiol* 27:292-296. doi: 10.1046/j.1472-765X.1998.00430.x
- Centers for Disease Control and Prevention (1993) National Institutes of Health (CDC-NIH)/U.S. Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd Edition (Washington).
- Chan YF y Abu Bakar S (2005) Virucidal activity of Virkon S on human enterovirus. *Med. J. Malaysia*, 60:246-254.
- Chosewood LC y Wilson DE (2009) *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th Edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. U.S. Department of Health and Human Services, USA. p. 411.
- D.O. L212 (2001). Directiva 2001/58/CE de la Comisión, de 27 de julio de 2001, que modifica por segunda vez la Directiva 91/155/CEE de la Comisión, por la que se definen y fijan las modalidades del sistema de información específica respecto a los preparados peligrosos en aplicación del artículo 14 de la Directiva 1999/45/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y respecto a las sustancias peligrosas en aplicación del artículo 27 de la Directiva 67/548/CEE del Consejo. pp. 24-33.
- Eleraky NZ, Potgieter LN y Kennedy MA (2002) Virucidal efficacy of four new disinfectants. *J Am Animal Hosp Assos*, 38:231-235.
- Freer, PC y Novy, FG (1902) On the formation, decomposition, and germicidal action of benzoylacetyl and diacetyl peroxides. *Am Chem J*, 27:161-193.
- García-Saavedra MJ y Vicente, JC (1997) *Técnicas de descontaminación*. Edit. Paraninfo, Madrid. 258 p.
- Gasparini R, Pozzi T, Magnelli R, Fatighenti D, Giotti E, Poliseno 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. doi: 10.1007/BF01719487.
- Hernández A, Martro E, Matas L, Martin 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. doi:10.1053/jhin.2000.0818.
- Hernández A, Martro E, Matas L, Martin M y Ausina V (2003) In-vitro evaluation of Perasafe® compared with 2% alkaline glutaraldehyde against *Mycobacterium* spp. *J Hosp Infect*, 54:52-56. doi:10.1016/S0195-6701(03)00037-9.

- Mc Cormick L y Maheshwari G (2004) Inactivation of adenovirus types 5 and 6 by Virkon S. *Antiviral Res.*, 64:27-33. doi:10.1016/j.antiviral.2004.04.008.
- Mc Donnell G y Rusell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12:147-179.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1994) Diseases of Animals (Approved Disinfectants) Order. HMSO, Norwich, UK.
- Müller G y Kramer A (2008) Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother*, 61:1281-1287. doi: 10.1093/jac/dkn125.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo. Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición de agentes biológicos durante el trabajo. BOE nº 124 de 24 de Mayo. 1997.
- Renz K, Hunsinger B, Mohn U, Böhm R y Marschang RE (2005) A comparison of citric acid, sodium hydroxide and sodium hypochlorite as disinfectants for the equine Rhinovirus a (erav) and phage phix 174. *ISHA-SOC*, 2:310-313.
- Richmond JY y Nesby-O'Dell SL (2002) Laboratory security and emergency response guidance for laboratories working with select agents. *MMWR Recomm Rep*, 51:1-6.
- Richmond JY y Nesby-O'Dell SL (2003) Biosecurity for animal facilities and associated laboratories. *Lab Anim* 32:32-37.
- Rutala WA (1990) APIC guideline for selection and use of disinfectants. *Am. J. Infect Control*, 24:313-342.
- Stanley PM (1999) Efficacy of peroxygen compounds against glutaraldehyde-resistant mycobacteria. *Am J Infect Control*, 27:339-43.
- Steris Co. (2002) The Liquid Chemical Sterilization Story: Continuing Educations Study Guide presented by STERIS Corporation, Study Guide number 3, M1720EN. Mentor, Ohio.
- Suarez DL, Spackman E, Senne DA, Bulaga L, Welsch AC, Froberg K. (2003) The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis.*, 47:1091-1095.
- UNE-EN 1276 (2010) Antisépticos y desinfectantes químicos. 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. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1). 46 p.

- Van Klingereen B, Koller W, Bloomfield SF, Böhm R, Cremieux A, Holah J, Reybrouck G, Rödger, HJ (1998) Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. *Int Biodet Biodegr*, 41:289-296. doi:10.1016/S0964-8305(98)00020-1.
- Vasseur C, Rigaud N, Hébraud M y Labadie J (2001) Combined Effects of NaCl, NaOH, and Biocides (Monolaurin or Lauric Acid) on Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. *J Food Protect*, 64:1442-1445.