

BIOCIDAS. EFICACIA. CRITERIOS PARA SU EVALUACIÓN Y AUTORIZACIÓN

BIOCIDES. EFFICACY. CRITERIA FOR ITS ASSESSMENT AND AUTHORIZATION

Covadonga Caballo Diéguez

Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral

RESUMEN

En el artículo 13 del Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis se contempla que en las operaciones de mantenimiento higiénico-sanitario se podrán utilizar aquellos desinfectantes que para tal fin haya autorizado la Dirección General de Salud Pública.

De acuerdo con la legislación nacional existente, entre los requisitos exigibles para llevar a cabo esta autorización figura el ensayo de eficacia correspondiente, además de las propiedades físico-químicas del producto, datos sobre seguridad (toxicidad, ecotoxicidad) e información sobre incompatibilidad con otros productos químicos empleados en las instalaciones así como con los materiales de las mismas.

La Dirección General de Salud Pública, Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, estudia y evalúa la información suministrada por el titular del producto. Si procede se incluye en el Registro Oficial de la Dirección General de Salud Pública.

La Dirección General de Salud Pública tiene inscritos, a fecha 1 de junio de 2006, 183 productos desinfectantes contra *Legionella*. Estos desinfectantes, en función de las materias activas, pueden dividirse por su forma de actuación en oxidantes y no oxidantes interaccionando de distinta manera con los factores ligados a la proliferación de *Legionella*. No obstante, la eficacia de los biocidas oxidantes y no oxidantes dependerá de condiciones tales como: las características propias de la instalación (dimensiones, material, tecnología, antigüedad), nivel de uso y mantenimiento, ubicación, uso de otros productos que puedan interferir con el biocida utilizado (anticorrosivos, antiincrustantes, etc).

Si bien es cierto que los ensayos de eficacia para registrar estos biocidas se basan en pruebas de laboratorio, no se puede poner en duda la eficacia en campo sin tener en cuenta factores tales como los arriba referenciados.

PALABRAS CLAVE: *Legionella*, biocidas, oxidante, no oxidante, eficacia

SUMMARY

Article 13 of Royal Decree 865/2003, 4 July, establishes hygienic-sanitary criteria for prevention and control of Legionellosis, provides for the use of disinfectants duly authorized by Public Health General Directorate, in the course of hygienic-sanitary maintenance operations.

In accordance with existing national laws among requirements necessary to effect said authorization are the due efficacy assay product, physic-chemical properties, data on toxicity and ecotoxicity and information on incompatibility with other chemicals used in installations, as well as materials constitutive of the latter.

Public Health General Directorate, General Subdirectorato of Environmental Health and Labour Health, studies and assesses the information provided by the applicant if appropriate the product is included in the Public Health General Directorate Official Register.

Up until 1st June 2006, 183 disinfectants products against *Legionella* are registered in the Public Health General Directorate. The said disinfectant products may be classified according to their action substances, and the way in which they act, into oxidants and non-oxidants all of them interacting the different with factors linked to *Legionella* proliferation. Nonetheless, efficacy of oxidant and non-oxidant biocides will depend on conditions such as: specific characteristics of the installation itself (dimensions, material, technology), usage and maintenance frequency, location, use of products that might interfere with the used biocide.

Although efficacy assays conducted to register these biocides rest mostly on laboratory studies, their "in vivo" efficacy should not be questioned without considering the above listed factors.

KEY WORDS: *Legionella*, Biocides, oxidant, non-oxidant, efficacy

En el artículo 13 del Real Decreto 865/2003¹, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis se contempla que en las operaciones de mantenimiento higiénico-sanitario se podrán utilizar aquellos desinfectantes que para tal fin haya autorizado la Dirección General de Salud Pública.

De acuerdo con la legislación nacional existente, entre los requisitos exigibles para llevar a cabo esta autorización figura el ensayo de eficacia correspondiente, además de las propiedades físico-químicas del producto, datos sobre seguridad (toxicidad, ecotoxicidad) e información sobre incompatibilidad con otros productos químicos empleados en las instalaciones así como con los materiales de las mismas.

La Dirección General de Salud Pública, Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, estudia y evalúa la información suministrada por el titular del producto. Si procede se incluye en el Registro Oficial de la Dirección General de Salud Pública adjudicándoles un número de registro XX-YYY-XXXXX, donde los dígitos YYY corresponden al nº 100, lo que significa que los productos registrados con este dígito podrán ser utilizados como desinfectantes para el tratamiento contra *Legionella*.

La Dirección General de Salud Pública tiene inscritos, a fecha 1 de junio de 2006, 183 productos desinfectantes contra *Legionella*. Estos 183 productos abarcan diferentes materias activas, la mayoría de las cuales han sido notificadas en el ámbito de la legislación comunitaria de Biocidas (Real Decreto 1054/2002, Directiva 98/8/CE y Reglamentos que la desarrollan 1896/2000, 2032/2003, 1048/2005)^{2,3,4,5,6}, para Tipo de Producto 11 (protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales) y Tipo de Producto 2 (desinfectantes utilizados en salud pública), lo que implica que a partir de 2008 estas materias activas se empezarán a estudiar a nivel de la UE para su inclusión en el Anexo I de la Directiva de Biocidas, mientras tanto los Estados miembros seguirán aplicando su legislación nacional. Así mismo, los productos biocidas registrados que contienen materias activas que no han sido notificadas para estos tipos de productos (11 y 2), la Dirección General de Salud Pública procederá a la cancelación de estos registros a fecha 1 de septiembre de 2006⁵.

Estos desinfectantes, en función de las materias activas, pueden dividirse por su forma de actuación en oxidantes y no oxidantes.

Los **biocidas oxidantes** destruyen los microorganismos por oxidación química penetrando la pared celular y alterando su metabolismo, llegando a destruir la membrana citoplásmica, desnaturalizar las proteínas estructurales o enzimáticas, así como los ácidos nucleicos. Su actividad no es selectiva y depende del pH del agua. Su espectro es de acción larga y actúa de dos formas:

- Oxidante: destruye la materia orgánica
- Biocida: desinfecta el agua del circuito

Los biocidas oxidantes reaccionan con los elementos contenidos en el agua del circuito: las materias minerales, orgánicas, ciertos inhibidores de la corrosión, algunos

biocidas no oxidantes (como el glutaraldehído, o el 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA).

La destrucción de los microorganismos es posible si:

- la cantidad de oxidante disponible es superior a la cantidad consumida por las materias orgánicas y otros compuestos oxidables aportados por el agua
- el pH del agua esta adaptado al tipo de oxidante. Ejemplo, el cloro se disocia en el agua en función del pH. La acción biocida del cloro se debe al ácido hipocloroso que solo se formará con un pH del agua entre 5-8

Ejemplos de biocidas oxidantes son el cloro, bromo, bromoclorodimetilhidantoina, etc

Los **biocidas no oxidantes**, no existe una relación simple entre la estructura química de un biocida y su mecanismo de acción, varían de un compuesto a otro, identificándose diferentes tipos de acción que incluyen la destrucción celular y la interferencia sobre el material genético. Su actividad es selectiva y su espectro de acción es reducido. Son moléculas de síntesis y su eficacia desinfectante esta condicionada a la calidad físico-química del agua, que puede afectar la vida media de la molécula. Ejemplos de biocidas no oxidantes son: DBNPA, Isotiazolonas, Glutaraldehído, Amonios cuaternarios, sulfato de tetrakishidroximetil fosfonio (THPS), etc.

Por tanto, dependiendo del mecanismo de acción de los biocidas estos interaccionarán de distinta manera con los factores ligados a la proliferación de *Legionella* y que son:

- Temperatura: 25°C-45°C
- Calidad del agua: presencia de nutrientes, depósitos, etc.
- Estancamiento del agua: zonas muertas
- Calidad de las superficies en contacto con el agua: rugosidades, asperezas debidas a los depósitos, corrosión
- Presencia de depósitos biológicos (biofilm) y ciertos microorganismos (protozoos, algas, bacterias)

A su vez, es posible la contaminación de la instalación a partir del medio exterior, vía el aire o vía el agua de aporte.

Legionella prolifera sobre el conjunto de las superficies de las instalaciones que están en contacto con el agua. Se han identificado 2 modos de proliferación:

- Proliferación en asociación con el biofilm
- Proliferación intracelular en otros microorganismos asociados al biofilm (algas, protozoos, amebas)

Legionella se multiplica en un medio ambiente caliente muy favorable para otras especies medioambientales, pero también presenta la particularidad de ampliar

su capacidad de multiplicación invadiendo células huésped como los protozoos.

Se ha demostrado que ciertas bacterias medioambientales tienen un efecto sinérgico sobre el crecimiento de *Legionella* mientras que otras tienen un efecto antagonista. En el primer caso, las bacterias producen L-cisteína permitiendo a las legionelas presentes multiplicarse. Numerosos autores han puesto en evidencia el efecto positivo de la microflora hídrica (flavobacterias, cianobacterias, algas verdes, amebas y protozoos filiaos) sobre el crecimiento de *Legionella*. Sin embargo, no ha sido posible establecer una correlación entre la abundancia de esta flora y la concentración de *Legionella* en las instalaciones.

El papel de las amebas ha sido particularmente estudiado, ciertos autores estiman que la multiplicación de *Legionellas* en agua sería imposible sin la presencia de amebas. La flora bacteriana a la cual están a menudo asociadas las legionellas serviría de nutrientes a las amebas. En lugar de ser digeridas, las legionellas que penetran en las amebas se multiplican en las vacuolas o vesículas y son eliminadas en gran número (hasta 10.000 por vacuola) hacia el exterior. Otros estudios demuestran que la proliferación de legionellas sin amebas necesitaría la presencia de una flora bacteriana compleja, en ausencia de la cual la *Legionella* no podría sobrevivir⁷.

Formación del biofilm: las bacterias se depositan sobre el soporte disponible y se fijan por secreción rápida de mucopolisacáridos. Este depósito constituye una fuente de contaminación permanente del agua: la presencia de biofilm en el agua circulante puede explicar ciertos resultados de aerobios muy variables. Determinados materiales utilizados son fácilmente y rápidamente colonizados por biofilm bacteriano encerrando legionellas.

Calidad del agua también influye en la formación del biofilm. El agua cargada de nutrientes favorece la formación de microorganismos. Las variaciones de la calidad del agua de aporte puede afectar considerablemente la eficacia de los tratamientos químicos. La calidad del agua vendría dada por:

- La calidad microbiológica: presencia de protozoos, algas, bacterias, etc.
- La calidad físico-química
- Materiales en suspensión
- Materia orgánica
- Sales minerales

Por todo ello, factores tales como corrosión, precipitación de sales inorgánicas, biofilm producido por factores de corrosión, depósitos de precipitación, contaminación, material biológico y la actividad microbiológica se deberán tener en cuenta en el programa de tratamiento del agua.

Limpieza y Desinfección: Existe a menudo una confusión entre los términos limpieza y desinfección. La limpieza puede ser mecánica y química. La limpieza mecá-

nica supone una acción energética. Se trata de eliminar los depósitos presentes en la superficie de los materiales. La limpieza mecánica concierne generalmente a las superficies accesibles, se utilizan chorros de media o alta presión. Es indispensable proteger al personal por el riesgo de dispersión de aerosoles contaminados.

La limpieza química concierne a todas las superficies en contacto con el agua. Su eficacia dependerá de las condiciones de puesta en práctica. Solo los detergentes alcalinos son eficaces para eliminar el biofilm. El biofilm asegura una protección de los tratamientos biocidas a los microorganismos que lo componen. La introducción de un producto biodispersante o biodetergente permite eliminar progresivamente el biofilm y luchar contra su formación.

Una limpieza puntual eliminará solo la parte superior del biofilm. Si el tiempo entre dos limpiezas es demasiado largo el depósito formado por la suciedad y los sedimentos no será jamás eliminado. La fase de eliminación del biofilm es delicada puesto que las bacterias van a pasar a la fase del agua. Es indispensable mantener el agua circulante en permanente desinfección, a su vez, el biodispersante o biodetergente utilizado en permanencia permitirá luchar contra la formación del biofilm. Si el sistema opera correctamente, la estrategia de lucha contra la proliferación de *Legionella* permite mantener la calidad microbiológica del agua, reservando las desinfecciones de choque solo para los periodos en que se constate una determinada concentración de *legionella*.

Desinfección Mediante la utilización de biocidas se lleva a cabo la desinfección destruyendo los microorganismos que se encuentran tanto en el agua como en la superficie del biofilm (algunos biocidas tienen un poder de penetración en el biofilm más o menos importante). Los microorganismos incluidos en el biofilm son mucho más resistentes a los desinfectantes que los que se encuentran dispersos en el medio líquido. No obstante, la resistencia a los desinfectantes desaparece después de la liberación de las células de su soporte y aumenta con la edad del biofilm.

La eficacia de los biocidas depende, por tanto, de las condiciones de puesta en práctica.

El manejo del riesgo en la proliferación de *Legionella*, como en todos los análisis de riesgo exige una gestión organizada a fin de comprender el problema y racionalizar las acciones. En este sentido, la identificación de los factores para el manejo de riesgo de proliferación de *Legionella* será:

- Identificación de objetivo: limpieza, desinfección, lucha anticorrosión
- Identificación de los medios:
 - Tratamiento químico: escoger la molécula adaptada al objetivo, a la calidad del agua, a los materiales, identificación del lugar de inyección, del lugar de la toma de muestra para el análisis de control, determinación de las condiciones de la puesta en obra (frecuencia de utilización)

- Tratamiento físico: identificación del modo de funcionamiento, identificación del emplazamiento adaptado a la instalación, evaluación del % de agua concerniente al tratamiento
- Redacción de los procedimientos específicos para la evaluación del riesgo (preventivo, curativo)

Además, se llevara un control del análisis del agua (conductividad del agua, pH, turbidez, residuos oxidantes, etc.).

Los tratamientos químicos abundantes y sistemáticos no son eficaces:

- El riesgo de proliferación de *Legionella* siempre esta presente: la aplicación sola de productos en el agua no es suficiente para restituir eficacia ni para gestionar el riesgo. Si la limpieza esta ausente o es insuficiente, el biofilm presente en la instalación sobre toda la superficie en contacto con el agua, puede estar fragilizado y más sensible a las fuerzas hidráulicas
- Riesgo para el medio ambiente: los residuos al medio ambiente de las purgas pueden contener compuestos químicos tóxicos, a concentraciones más o menos importantes en función del biocida utilizado.
- Riesgo de selección de cepas de *Legionella* resistentes: varias especies cohabitan en una instalación pero ciertas especies de *Legionella* o amebas (organismo huésped de la *Legionella*) resisten a la acción de los tratamientos defectuosos o abundantes y proliferan en detrimento de otros
- Coste de la explotación elevada: los productos químicos no son eficaces si las condiciones de la puesta en práctica no están adaptados. La *Legionella* frecuentemente detectada conduce generalmente a aumentar la dosis o la frecuencia de tratamiento para intentar controlar la proliferación
- Riesgo para las instalaciones: la mayor parte de los biocidas utilizados (biocidas oxidantes y biocidas no oxidantes) son muy corrosivos para ciertos materiales, en particular el cobre. La localización correctamente de los focos de corrosión son indispensables para el mantenimiento de la instalación.

En un análisis de la información relativa al uso de productos biocidas en el tratamiento de *Legionella* en instalaciones de torres de refrigeración, resultó que tanto biocidas oxidantes como no oxidantes estaban asociados a recuentos positivos de *Legionella* en cantidades superiores a 1000 UFC/l, aún cuando algunos de estos biocidas, especialmente no oxidantes, contaban con resultados bibliográficos positivos en ensayos de eficacia en campo⁸

Por todo ello,

Escoger los productos de tratamiento esta en función de:

- la calidad del agua
- el tamaño de la instalación
- material de la instalación
- el modo de gestión

la eficacia de los tratamientos esta afectada por:

- las modificaciones importantes de la calidad del agua de aporte
- las modificaciones de la calidad del aire en el medio ambiente de las torres
- del malfuncionamiento de los sistemas de filtración
- de las incompatibilidades entre los productos
- la ausencia de control y la falta de seguimiento

Si bien es cierto que los ensayos de eficacia se basan en pruebas de laboratorio, no se puede poner en duda la eficacia en campo sin tener en cuenta los factores analizados anteriormente. Por tanto, cuando se producen casos de legionelosis o un brote no bastaría con evaluar si la instalación tiene o no un tratamiento de mantenimiento o de choque, sino la idoneidad de este.

CONCLUSIONES

- Los desinfectantes mantienen bajo control la proliferación de microorganismos en las instalaciones. Sin embargo, otros productos químicos como biodispersantes, antiincrustantes, anticorrosivos, modificadores del pH, etc. deben acompañar al desinfectante para optimizar su eficacia.
- Además del uso de productos químicos, métodos físicos se emplean para mantener el sistema limpio. Esto incluye filtración, y limpieza manual. Todos los factores juegan una parte importante en el control del crecimiento de organismos y especialmente en el crecimiento de *Legionella*.
- La falta de limpieza en las instalaciones influirá en la eficacia de los biocidas. En un sistema limpio, los biocidas comercializados para este uso son efectivo contra *Legionella*. No obstante, aunque la actividad bactericida puede ser determinada por procedimientos de laboratorio, existe una ausencia importante de estudios de campo en el uso de los biocidas. Métodos estandarizados para tests biocidas contra *Legionella* en cultivos, suspensión y biofilm son necesarios, así como, ensayos para la valoración de eficacia en campo, eficacia de los procedimientos de limpieza y el posible papel del uso del biocida en continuo o intermitente en el control de crecimiento de *Legionella*.

La concentración del biocida a utilizar en función del volumen de agua de la torre.

El incremento o descenso de la temperatura ambiente incrementará o disminuirá la eficacia del biocida.

Cambios en el pH del agua puede afectar la estabilidad química y la actividad del biocida. Los fabricantes indicaran el rango de pH en el cual su producto es eficaz contra *Legionella*

Alternar distintas materias activas biocidas es aconsejable ante la posibilidad de aparición de cepas resistentes.

Es básica una formación adecuada y suficiente para el manejo de todos los factores que contribuyen al desarrollo de *Legionella*. Esta formación debe basarse tanto en el conocimiento de la bacteria, como de la calidad del agua, instalaciones y los productos químicos que se manejan.

Por todo ello, el control de la proliferación y la dispersión de *Legionella* en las instalaciones es un problema complejo en el que hay que tener en cuenta múltiples factores y que debe ser abordado desde una visión multidisciplinar, en la que es indispensable realizar una evaluación del riesgo continua que nos dará las pautas para el manejo adecuado de la instalación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis (BOE núm. 171, 18 de julio de 2003)
2. Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas (BOE núm. 247, 15 octubre 2002)
3. Directiva 98/8/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero, relativa a la comercialización de Biocidas (DO L 123 de 24.4.1998)
4. Reglamento (CE) nº 1896/2000 de la Comisión de 7 de septiembre de 2000 relativo a la primera fase del programa contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE (DO L 228 de 8.9.2000)
5. Reglamento 2032/2003 de la Comisión, de 4 de noviembre de 2003, relativo a la segunda fase del programa contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE (DO L 307 de 24.11.2003)
6. Reglamento (CE) nº 1048/2005 de la Comisión de 13 de junio de 2005, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2032/2003 de la Comisión, de 4 de noviembre de 2003, relativo a la segunda fase del programa contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE (DO L 178 de 9. 7. 2005)
7. Guide de formation à la gestion du risqué de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. Francia (Febrero, 2005)
8. Report of the Expert Advisory Committee on Biocides. Department of Health. UK