

<b>Nº expediente SDGSISTTER:</b>		<b>Nº Expediente Departamento:</b>	
<b>Código del documento:</b>	Informe de ensayo nº NBQM2020_01		
<b>Título del documento:</b>	ENSAYOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD GERMICIDA DE LA IONIZACIÓN BIPOLAR POR PLASMA FRÍO		

**Emisor del documento:**

Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial


Subdirección General de Sistemas Terrestres

Departamento de Sistemas de Defensa NBQ

Área de Defensa Biológica

POC de la SDGSISTTER Tcol Juan Carlos Cabria Ramos



	<b>Nombre / Responsabilidad</b>	<b>Firma</b>	<b>Fecha</b>
<b>Realizado por:</b>	<b>Dra Matilde Gil García Dra Marcia Oliveira Sousa</b>		
<b>Director Técnico:</b>	<b>Dra Paloma Lorenzo Lozano</b>	<b>P.A.</b>	
<b>Aprobado por:</b>	<b>Tcol Juan Carlos Cabria Ramos</b>		
<b>Revisado por Calidad:</b>	<b>Responsable Calidad Departamento</b>	<b>P.A.</b>	

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



## ÍNDICE

1. Objeto.....	3
2. Antecedentes .....	3
3. Muestras, Objetos e ítems recibidos.....	4
4. Procedimientos de ensayo / Normativa .....	11
4.1. Selección del material biológico .....	11
4.2. Medios de cultivo y reactivos .....	12
4.3. Equipos utilizados.....	15
4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo.....	15
4.5. Desarrollo de los ensayos .....	17
5. Fechas de ejecución de los ensayos .....	18
6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable).....	18
7. Resultado obtenidos.....	18
7.1. Ensayo 1.....	18
7.2. Ensayo 2.....	18
7.3. Ensayo 3.....	19
7.4. Ensayo 4.....	20
8. Declaración de conformidad (cuando proceda) .....	20
9. Resumen, opiniones, interpretaciones.....	20
10. Anexos .....	21
10.1. Anexo 1. Bibliografía.....	21



## 1. Objeto

El objeto del presente informe es la evaluación de la actividad germicida de la tecnología de ionización bipolar por plasma frío sobre el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli*, aplicada en ambientes interiores (habitación de un hotel).

## 2. Antecedentes

Con fecha 30 de abril de 2020, por parte de las empresas Ingeniería Energética y Obras, y Tayra se solicitó, al Dpto NBQ de la SDGSISTTER, el apoyo para la realización de diferentes ensayos al objeto de evaluar la actividad germicida de la tecnología de ionización bipolar por plasma frío para su aplicación en la descontaminación de ambientes interiores.

El desarrollo de los ensayos en su fase de aerosolización del virus MS2 y recogida posterior de las muestras se realizó en una habitación del Hotel B and B T-4 Aeropuerto. El resto de los ensayos se hicieron en el laboratorio de Defensa Biológica del INTA-Campus La Marañosa-

El laboratorio del Área de Defensa Biológica del Dpto NBQ dispone de elementos de contención, equipos y procedimientos requeridos para el trabajo con agentes biológicos pertenecientes al grupo de riesgo 2 o inferior, de acuerdo con las recomendaciones de la O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.

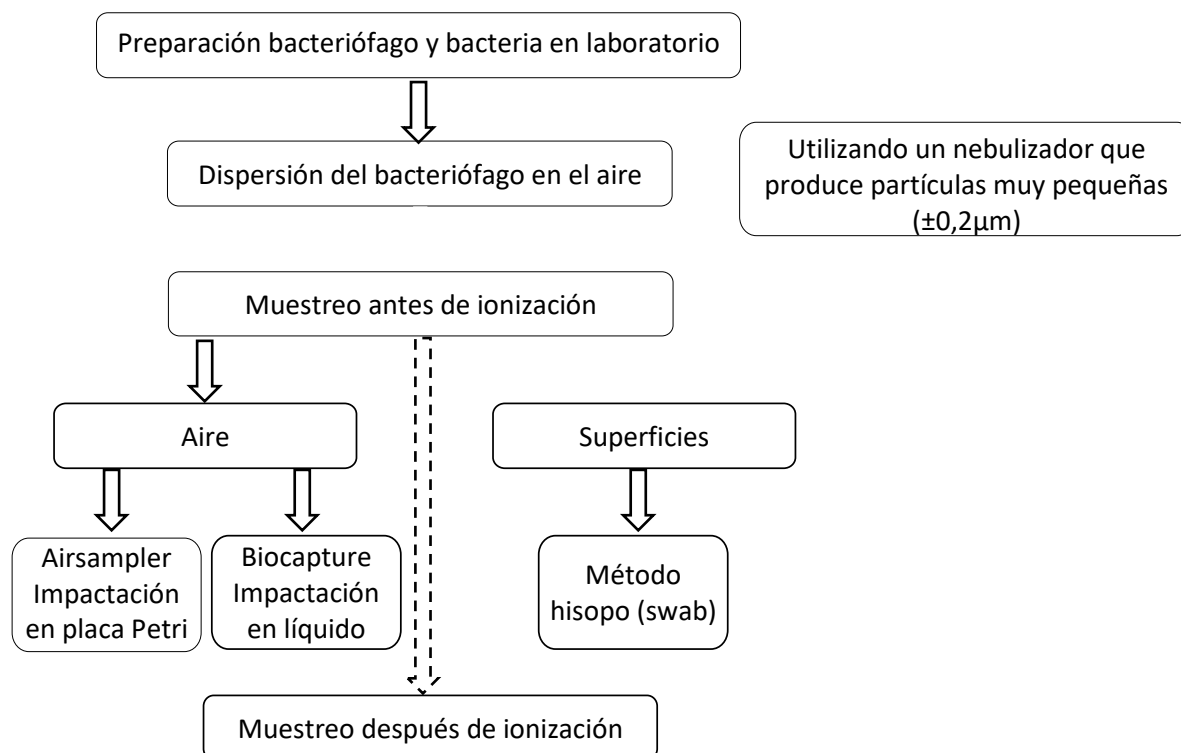
El personal del Área de Defensa Biológica del INTA cuenta con un plan de formación y cualificación que los capacita para manipular agentes biológicos de forma segura a través de la realización de diferentes cursos relacionados con la prevención de riesgos en el laboratorio químico-biológico y han desarrollado su actividad en el campo de la detección y diagnóstico de agresivos biológicos.

El laboratorio dispone asimismo de un sistema de gestión de residuos químicos y biológicos, que incluye formación del personal a través de cursos de Gestión de residuos tóxicos y peligrosos, lo que permite una correcta segregación y almacenamiento de los mismos. La eliminación de éstos es llevada a cabo por empresas autorizadas que ofrecen toda la garantía de no contaminar el medio ambiente, según la Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial, y el Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.

La técnica de la ionización bipolar consiste en aplicar un campo eléctrico al aire de modo que se generen iones positivos y negativos. Los iones atacan la membrana del virus dejando expuesto su ARN a la oxidación, inactivándolo. En diferentes estudios se han probado que el virus es transmisible por el aire y que los sistemas de aire acondicionado pueden favorecer su dispersión.

Se realizaron un total de 4 ensayos, de los cuales dos aportaron inicialmente ninguna conclusión, siendo necesario la repetición de uno de ellos. A continuación, se explicará con detalle el diseño experimental para cada ensayo y sus resultados.

De una manera general, el diseño experimental elaborado inicialmente se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Esquema general del proyecto de ionización.

### 3. Muestras, Objetos e ítems recibidos

En todos los ensayos realizados se tomaron muestras líquidas mediante un biolector o impactador en medio líquido (Biocapture); muestras sólidas mediante biolector o impactador en medio sólido (AirSampler), y muestras de superficies mediante hisopo humectado en tampón SM, en diferentes posiciones de la habitación a ensayar y en diferentes tiempos.

En las siguientes tablas (tabla I – tabla IV) se exponen las muestras recogidas en cada uno de los ensayos realizados.

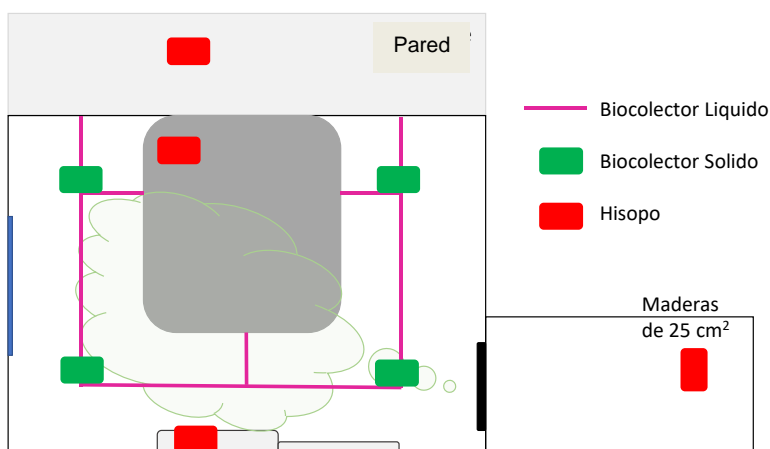
**Tabla I.** Muestras recogidas en el ensayo 1 (control positivo, ensayo con bacteriófago MS2)

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_001	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_002	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_003	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_004	S2	Muestra de aire recogida en posición 2, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1



NBQM2020_005	S3	Muestra de aire recogida en posición 3, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_006	S4	Muestra de aire recogida en posición 4, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_007	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_008	S6	Muestra de aire recogida en posición 2, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_009	S7	Muestra de aire recogida en posición 3, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_010	S8	Muestra de aire recogida en posición 4, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_011	H1A	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_012	H1B	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_013	H2A	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_014	H2B	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_015	H3A	Muestra de la superficie de la pared sobre el cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_016	H3B	Muestra de la superficie de la pared sobre el cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_017	H4A	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_018	H4B	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1

En la figura siguiente (figura 2) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 1.



**Figura 2.** Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 1.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



**Tabla II.** Muestras recogidas en el ensayo 2 (**control positivo**, variando posición y tiempo de recogida de muestras respecto al ensayo 1, ensayo con bacteriófago MS2)

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_019	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo durante la nebulización.	1
NBQM2020_020	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo después de la nebulización.	1
NBQM2020_021	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 0 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_022	S2	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 1,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_023	S3	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 2,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_024	S4	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 4.2 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_025	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5,6 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_026	S6	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 7 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_027	S7	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 8,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_028	S8	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 9,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_029	H1	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_030	H2	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_031	H3	Muestra de una superficie situada cerca del cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_032	H4	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_033	H5	Muestra de la superficie del interior de una primera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_034	H6	Muestra de la superficie del interior de una segunda columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_035	H7	Muestra de la superficie del interior de una tercera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



NBQM2020_036	H8	Muestra de la superficie del interior de una cuarta columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
--------------	----	--	---

En la figura siguiente (figura 3) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 2.

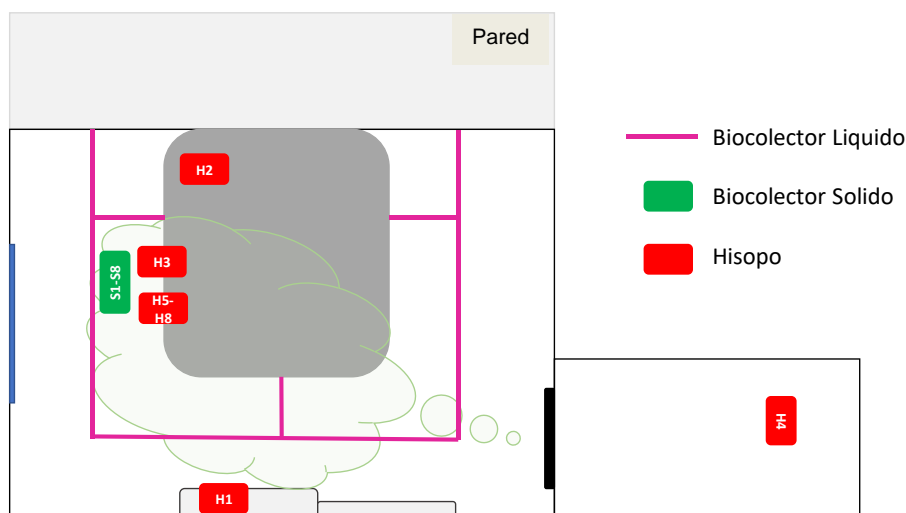


Figura 3. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 2.

Tabla III. Muestras recogidas en el ensayo 3 (Ensayo de descontaminación aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío, misma posición y tiempo de recogida de muestras respecto al ensayo 2, ensayo con bacteriófago MS2).

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_037	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo durante la nebulización.	1
NBQM2020_038	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo después de la nebulización.	1
NBQM2020_039	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 0 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_040	S2	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 1,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_041	S3	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 2,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_042	S4	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 4.2 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_043	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5,6 minutos después de la nebulización.	1



NBQM2020_044	S6	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 7 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_045	S7	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 8,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_046	S8	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 9,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_047	H1	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_048	H2	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_049	H3	Muestra de una superficie situada cerca del cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_050	H4	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_051	H5	Muestra de la superficie del interior de una primera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_052	H6	Muestra de la superficie del interior de una segunda columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_053	H7	Muestra de la superficie del interior de una tercera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_054	H8	Muestra de la superficie del interior de una cuarta columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1

**Tabla IV. Muestras recogidas en el ensayo 4 (ensayo de descontaminación aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío, ensayo con bacteria *Escherichia coli*).**

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_055	SA1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_056	SA2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_057	SA3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo





NBQM2020_058	SA4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_059	SB1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_060	SB2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_061	SB3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_062	SB4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_063	SC1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_064	SC2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_065	SC3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_066	SC4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_067	SD1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_068	SD2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_069	SD3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_070	SD4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_071	A1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_072	A2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_073	A3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo

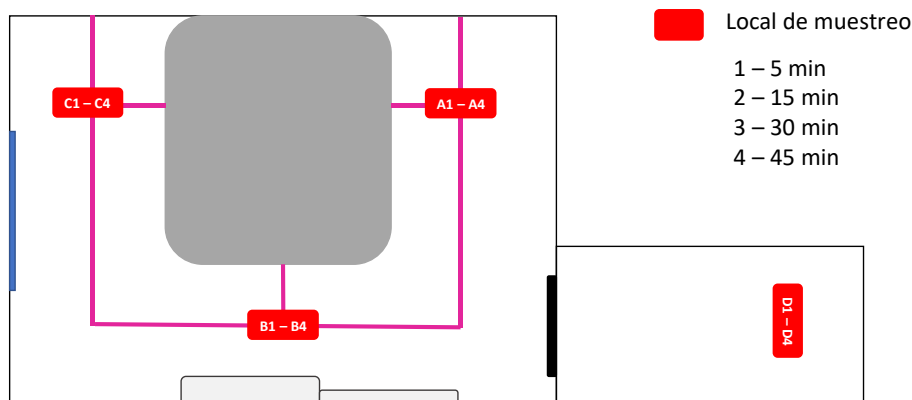


NBQM2020_074	A4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_075	B1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_076	B2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_077	B3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	11
NBQM2020_078	B4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_079	C1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_080	C2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_081	C3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_082	C4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_083	D1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_084	D2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_085	D3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	11
NBQM2020_086	D4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial ( $10^8$ ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



En la figura siguiente (figura 4) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 4.



**Figura 4.** Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 4.

## 4. Procedimientos de ensayo / Normativa

Para evaluar la actividad virocida del sistema se calculó la reducción de la infectividad del bacteriófago a partir de las diferencias de los logaritmos de los títulos virales (unidades formadoras de placas de lisis (ufp)), antes y después del proceso de descontaminación. Esto se llevó a cabo mediante cultivo por el método de la doble capa de agar, teniendo en cuenta que cuando el bacteriófago infecta a una célula huésped, de una cepa adecuada, se producen placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa, permitiendo la detección y recuento de las mismas (norma UNE-EN ISO 10705-1).

La actividad bactericida del sistema se evaluó calculando la reducción de la viabilidad bacteriana a partir de las diferencias de los logaritmos de la concentración bacteriana (unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL), antes y después del proceso de descontaminación, mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de LBA y contaje directo del número de ufc en cada una de ellas. Además, dicha actividad también se evaluó de manera cualitativa, en función de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, en las placas sometidas al sistema de descontaminación respecto a un control positivo (sin someter a descontaminación).

### 4.1. Selección del material biológico

Para dar cumplimiento al trabajo solicitado se ha seleccionado el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597, ambos pertenecientes al grupo de riesgo biológico 1 (sin riesgo o riesgo muy bajo para el individuo y la comunidad) (Real Decreto 664/1997). Para asegurar un sistema cerrado de conservación, todos los microorganismos que se van a utilizar en los ensayos proceden de una colección de cultivos tipo, minimizando su actividad genética y fisiológica, y evitando así su potencial mutación.

El bacteriófago MS2 es un virus icosaédrico, que tiene como material genético ARN de cadena sencilla, de sentido positivo que infecta a la bacteria *Escherichia coli* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. MS2 es miembro de una familia de virus bacterianos estrechamente relacionados entre los que se encuentran los bacteriófagos f2 y R17. MS2 infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F), que codifica para un “pili” el cual sirve de receptor viral. MS2 se une al “pili” a través de su proteína de maduración sencilla. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual el fago ARN se introduce en la bacteria. Las células hospedadoras del fago son lisadas (destruidas) tras la replicación y encapsulación de



las partículas virales, de forma que los nuevos virus quedan libres para llevar a cabo una nueva infección, produciendo placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa.

El bacteriófago MS2 es muy resistente a la desecación, por lo que ha sido utilizado en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: “Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad virocida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria” (UNE\_EN 13610:2003). “Actividad virocida para superficies inertes” (ASTM-1053:97).

*Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, como por ejemplo el ser humano. Es hospedador del bacteriófago MS2 que infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F). Ha sido utilizada en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: “Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad virocida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria” (UNE\_EN 13610:2003). “Actividad virocida para superficies inertes” (ASTM-1053:97).

La actividad germicida se va a evaluar utilizando como microorganismos de ensayo el bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1 en cloroformo al 0,3% conservado a 4°C y la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 conservada en glicerol al 15% a -80°C en el cepario del Área de Defensa Biológica (figura 5).

#### *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 15597™)

ATCC® Number: 15597™  
 Strain Designations: C-3000  
 Type Strain: no  
 Biosafety Level: 1  
 Product Format: freeze-dried

#### *Escherichia coli* bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™)

ATCC® Number: 15597-B1™  
 Deposited As MS2  
 Strain Designations: MS2  
 Type Strain: no  
 Biosafety Level: 1  
 Product Format: freeze-dried

**Figura 5.** Especificaciones del bacteriófago y cepa bacteriana utilizada como cepa huésped.

## 4.2. Medios de cultivo y reactivos

Para la preparación de los medios y la uniformidad de los resultados se utilizaron componentes de calidad homologada y productos químicos de calidad analítica reconocida, o un medio completo deshidratado. Se utilizó únicamente agua destilada o agua de pureza equivalente.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
 El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



## Luria Bertani Agar (LBA)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0
Agar	-----15,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

## Luria Bertani Agar Semisólido (LBAss)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0
Agar	-----6,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

## Caldo de Luria Bertani (LB)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

## Solución SM

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico	-----5,8
Sulfato magnésico	-----2,0

Se añade 5 mL de Tris-Cl 1M (pH 7,3 ± 0,2). Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

## Buffer Tris-Mg-Ca

10mM Tris-HCl
10mM MgSO <sub>4</sub>
5mM CaCl <sub>2</sub>

pH final aproximado: 7,5 ± 0,3. Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Cloruro Cálcico 0,5M

Fórmula (en g/100mL):

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ----- 5,5

Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Sulfato Magnésico 1M

Fórmula (en g/100mL):

MgSO<sub>4</sub>-----24,6

Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Tris-ClH 0,5M

Fórmula (en g/500mL):

Tris -----60,57 g

Preparar 400 mL de agua destilada en una botella.

Añadir 60,57 g de Tris base

Ajustar el pH a 7,5 usando HCl

Añadir agua destilada hasta un volumen de 500 mL

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 ± 3°C durante 15 minutos.

Tampón fosfato salino 1X (PBS)

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico ..... 10,0 g

Cloruro potásico ..... 0,25 g

Fosfato disódico monohidrato ..... 1,12 g

Fosfato potásico ..... 0,25 g

pH final aproximado: 7,2 ± 0,2. Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Cultivos bacterianos

Se utilizará una suspensión del bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1 en SM y un cultivo de la bacteria *Escherichia coli*, ATCC 15597, crecido hasta fase exponencial para los ensayos de infectividad y bactericida.



### 4.3. Equipos utilizados

Estufa de cultivo a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$   
Incubador termostático a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  con agitación  
Microondas  
pH-metro  
McFarlómetro  
Tubos, para medir en McFarlómetro  
Vortex  
Baño termostático  
Cabina de seguridad biológica nivel II  
Placas de Petri, ventiladas de 9 cm de diámetro  
Pipetas graduadas de 0,1 mL, 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL de capacidad  
Pipetas Pasteur  
Frascos de vidrio, de volúmenes adecuados  
Tubos de cultivo, con tapa  
Probetas graduadas  
Refrigerador, ajustado a una temperatura de  $5 \pm 3^\circ\text{C}$   
Congelador, con control termostático a  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$   
Micropipetas de diferente volumen  
Puntas para micropipetas de volumen adecuado  
Hisopos de algodón estériles en tubo  
Agitador orbital de placas  
Generador de aerosol biológico o nebulizador  
Sistema de impactación de partículas, suministrado por Victor Archilla (INTA)  
Biocolector de aerosoles sobre medio líquido (Biocapture)  
Biocolector de aerosoles sobre medio sólido (suministrado por el cliente)  
Sistema de ionización bipolar por plasma frío (suministrado por el cliente)

### 4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo

Se partió de una suspensión del bacteriófago, conservado a  $4^\circ\text{C}$  en cloroformo al 0,3%, preparado según las instrucciones que se describen en la norma UNE-EN ISO 10705-1 y de una suspensión de *Escherichia coli*, ATCC 15597 conservado a  $-80^\circ\text{C}$  en glicerol al 15%. Antes de iniciar los ensayos se calculó el título viral del bacteriófago a utilizar. Para determinar el título viral se añadieron  $20 \pm 2$  mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a  $37^\circ\text{C}$ , y se inoculó con 200  $\mu\text{L}$  de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $3 \pm 1$  horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente  $10^8$  ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



y se midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla V).

**Tabla V.** Correspondencia entre Concentración Bacteriana y Unidades de McFarland teóricas

Concentración Bacteriana x10 <sup>8</sup> /ml	Unidades de McFarland
1,5	0,5
3	1
6	2
9	3
12	4
15	5
18	6
21	7

Cuando el cultivo bacteriano llegó a la fase de crecimiento exponencial se enfrió rápidamente transfiriendo la botella a un recipiente con hielo. Se hicieron diluciones seriadas, añadiendo 50 µL de una suspensión de fago conservado a 4°C en presencia de cloroformo al 0,3%, a 450 µL del tampón Tris-Mg-Ca. Se mezclaron 120 µL de cada dilución con 120 µL de la cepa hospedadora crecida hasta fase exponencial, mantenida en hielo hasta el momento de la infección, por duplicado. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para que los virus se unieran a las células hospedadoras. A continuación, se cogieron 200 µL de la mezcla, virus/célula hospedadora, y se añadieron a un tubo que contenía 3 mL de medio LBAss precalentado (45°C). Se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió el contenido sobre la superficie de una placa de Petri que contenía LBA. Se dejó solidificar y se incubó en una estufa de cultivo a 36 ± 2°C durante 18 ± 2 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = (N/d) \times 10 \text{ ufp/mL} \quad (\text{ecuación 1})$$

Siendo  $N = (n_1 + 0,1n_2)/2$

$n_1$ : Número de placas de lisis en la dilución más alta que se puede contar

$n_2$ : Número de placas de lisis en la dilución anterior a la más alta que se puede contar

$d$ : dilución más alta que se puede contar

Los títulos virales de la suspensión inicial del bacteriófago utilizado para la nebulización del mismo en los ensayos fueron:

**Ensayo 2 (control positivo):** 2,25x10<sup>5</sup> ufp/mL.

**Ensayo 3:** 2,47x10<sup>5</sup> ufp/mL.

Para la realización de los ensayos con células bacterianas se revitalizó la cepa *Escherichia coli*, ATCC 15597 conservada a -80 °C en glicerol al 15%, en caldo de Luria Bertani (LB), a 36 ± 2°C, 150 rpm, durante 20 ± 4 horas. Transcurrido este período de incubación se añadieron 20 ± 2 mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C, y se inoculó con 200 µL de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a 37 ± 2°C durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo y se

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*





midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla V).

Para la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias (ufc)/mL viables en los cultivos bacterianos se prepararon diluciones seriadas del cultivo añadiendo 100 µL del cultivo a 900 µL del tampón PBS y se inocularon 100 µL de cada una de las diluciones en una placa con medio LBA, por duplicado. Se incubaron a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $20 \pm 4$  h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por contaje directo de las colonias crecidas sobre la placa de LBA. Para el cálculo del número de ufc/ml viables se aplicó la siguiente ecuación:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)d} \times 10 \quad (\text{ecuación 2})$$

Siendo:

c: la suma de las colonias contadas en todas las placas que se pueden contar.

$n_1$ : el número de placas contadas en la dilución más baja.

$n_2$ : el número de placas contadas en la dilución más alta.

d: el factor de dilución correspondiente a la dilución más baja.

#### 4.5. Desarrollo de los ensayos

Para cada uno de los ensayos con el bacteriófago MS2 se prepararon 500 mL de una suspensión de dicho bacteriófago en tampón SM, para generar el aerosol de dicho bacteriófago y dispersarlo en la habitación de ensayo y, posteriormente, recoger tanto muestras de aire, por impactación en medio sólido y en medio líquido, como de superficies mediante hisopo.

Para recuperar el bacteriófago de las muestras tomadas con hisopo de los controles positivos así como de las muestras sometidas al proceso de descontaminación, se añadieron al tubo estéril que contenía cada uno de los hisopos, 2 mL de solución SM y se sometieron a agitación (en un agitador orbital) durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . El líquido de lavado se recogió en un tubo estéril, que se guardó a  $4^\circ\text{C}$  hasta que se llevó a cabo el proceso de infección.

A partir de la suspensión del bacteriófago, recuperado de las probetas, así como las muestras líquidas recogidas por impactación sobre medio líquido, se hicieron diluciones seriadas, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.4. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales en la dilución más alta que se pudo contar y en la inmediatamente anterior aplicando la ecuación 1.

Las muestras recogidas por impactación sobre medio sólido se incubaron directamente en una estufa de cultivo a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $18 \pm 2$  horas. El medio sólido consistió en un inóculo de 100 µL de la bacteria *Escherichia coli* en fase exponencial sobre medio sólido LBA, para el caso del ensayo 1, y un inóculo de 200 µL de la bacteria *Escherichia coli* en fase exponencial que se añadieron a un tubo que contenía 4 mL de medio LBA as precalentado ( $45^\circ\text{C}$ ), que se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió sobre la superficie de una placa de Petri con medio LBA, para los ensayos 2 y 3.

El ensayo con el cultivo bacteriano se realizó aplicando directamente la ionización bipolar por plasma frío sobre cultivos sólidos y líquidos en fase exponencial, de dicha cepa.

Las muestras sólidas se incubaron directamente en una estufa de cultivo a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $18 \pm 2$  horas.

De las muestras líquidas se prepararon diluciones seriadas del cultivo siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.4. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por contaje directo de las colonias crecidas sobre la placa de LBA. Para el cálculo del número de ufc/ml viables se aplicó la ecuación 2.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



## 5. Fechas de ejecución de los ensayos

Los ensayos se realizaron entre los días 4 y 14 de mayo de 2020.

## 6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable)

No aplica.

## 7. Resultado obtenidos

Los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados fueron los siguientes:

### 7.1. Ensayo 1

Este ensayo se trata de un control positivo puesto que no se ha aplicado la ionización bipolar.

No se ha obtenido valores significativos del bacteriófago en el aire ni en las superficies. Además, la metodología utilizada para el biolector sobre medio sólido no ha funcionado.

Se planteó otra repetición del control positivo con cambios en el diseño experimental para poder comparar con el ensayo de ionización bipolar.

### 7.2. Ensayo 2

Este ensayo es la repetición del control positivo anterior (ensayo 1), puesto que en el primer ensayo se obtuvo una concentración bastante baja del bacteriófago, variando posición y tiempo de toma de muestras así como la técnica de bioselección sobre medio sólido.

La concentración del bacteriófago en la solución utilizada para nebulización fue de  $2,25 \times 10^5$  ufp/mL.

Los resultados obtenidos en el ensayo control se muestran en la tabla VI.

**Tabla VI.** Resultados obtenidos en el ensayo control (ensayo 2).

Muestras biolector liquido	Recuento medio (log ufp/mL)
A – Tiempo 1 (5 min de muestreo durante la nebulización)	4,16
B – Tiempo 2 (5 min de muestreo después de la nebulización)	3,46
Muestras biolector solido	Recuento medio (log ufp/L)
S1 – min 0	(>265 ufp) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 ufp) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 ufp) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 ufp) – >4,21
S5 – min 5,6	(>265 ufp) – >4,21
S6 – min 7	(>265 ufp) – >4,21
S7 – min 8,4	(>265 ufp) – >4,21
S8 – min 9,8	(>265 ufp) – >4,21
Muestras superficies	Recuento medio (log ufp/cm <sup>2</sup> )
H1 – mesa	1,60
H2 – mascarilla	1,48
H3 – superficie equipo ELPI (INTA)	1,18
H4 – retorno aire	0
H5 – columna impactación	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



H6 – columna impactación	0
H7 – columna impactación	0
H8 – columna impactación	0,49

Se puede observar una disminución de la concentración de bacteriófago al tiempo 1 (5 minutos de muestreo durante la nebulización) y 2 (5 minutos de muestreo después de la nebulización) en el muestreo con el biocolector líquido. La posible razón es que las partículas de virus se caen al suelo cuando están asociadas a partículas de agua grandes. Esto sería justificado si en el muestreo de la columna de impactación hubiéramos encontrado valores del bacteriófago. Sería necesario muestrear más superficies de la columna para poder visualizar en qué tamaño de partículas se puede encontrar el bacteriófago.

Respecto a las muestras del impactador sólido, se obtuvo valores incontables lo que corresponde a números superiores a 1000 partículas de bacteriófagos. Debido a que se ha utilizado un equipo que requiere un ajuste del número total de partículas por placa Petri, se ha tenido que fijar el número máximo como 265 ufp/L. La transformación de estos datos nos lleva a un recuento medio de 4,21 log ufp/L.

Se ha obtenido resultados en el orden de 1-1,6 log ufp/cm<sup>2</sup> en las superficies muestreadas mediante hisopo. Como se ha comentado anteriormente, no se encontró valores del bacteriófago en la columna de impactación y lo mismo en el área del retorno de aire.

### 7.3. Ensayo 3

Este ensayo se realizó de la misma manera que el ensayo 2 (control positivo), aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío como tratamiento del aire de la habitación.

La concentración del bacteriófago en la solución utilizada para nebulización fue de  $2,47 \times 10^5$  ufp/mL.

Los resultados obtenidos en el ensayo con ionización se muestran en la tabla VII.

**Tabla VII.** Resultados obtenidos en el ensayo 3.

Muestras biocolector liquido	Recuento medio (log ufp/mL)
A – Tiempo 1 (5 min de muestreo durante la nebulización)	4,00
B – Tiempo 2 (5 min de muestreo después de la nebulización)	3,04
Muestras biocolector solido	Recuento medio (log ufp/L)
S1 – min 0	(>265 ufp) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 ufp) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 ufp) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 ufp) – >4,21
S5 – min 5,6	(97 ufp) – 3,08
S6 – min 7	(57 ufp) – 2,81
S7 – min 8,4	(61 ufp) – 2,84
S8 – min 9,8	(38 ufp) – 2,61
Muestras superficies	Recuento medio (log ufp/cm <sup>2</sup> )
H1 – mesa	0,75
H2 – mascarilla	0,80
H3 – superficie equipo ELPI (INTA)	0,52
H4 – retorno aire	0
H5 – columna impactación	0
H6 – columna impactación	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



H7 – columna impactación	0
H8 – columna impactación	0,23

Se puede observar una ligera disminución de la concentración de bacteriófagos al tiempo 1 (5 minutos de muestreo durante la nebulización) y 2 (5 minutos de muestreo después de la nebulización) en el muestreo con el biocolector líquido cuando comparamos con el ensayo control (ensayo 2). No obstante, esta reducción no es significativa.

Se ha observado una reducción bastante significativa en las muestras del impactador sólido recogidas entre los 5 y 10 minutos después de la nebulización (muestras S5-S8). Aunque se obtuvo valores incontables durante los primeros 5 minutos de muestreo, que corresponden al tiempo de nebulización, lo que es justificable ya que la cantidad de bacteriófagos que se está dispersado en el aire es bastante alta. Es de gran importancia destacar que se obtuvo una reducción de más de 2 log del bacteriófago solo con un tiempo de exposición a la ionización bipolar de 10 min.

Respecto a las superficies analizadas muestreadas mediante hisopo, se obtuvo una reducción en el orden de 0,70-0,85 log ufp/cm<sup>2</sup>. Al igual que en el ensayo control, no se encontró valores del bacteriófago en la columna de impactación ni en el área del retorno de aire.

#### 7.4. Ensayo 4

No se ha obtenido resultados concluyentes sobre la eficacia de la ionización frente a la bacteria *Escherichia coli* ya que la metodología utilizada en el laboratorio no ha funcionado. Sería de interés volver a repetir este ensayo.

#### 8. Declaración de conformidad (cuando proceda)

No aplica

#### 9. Resumen, opiniones, interpretaciones

Se han realizado un total de 4 ensayos. Dos de ellos no han aportado ninguna conclusión (ensayos 1 y 4), siendo necesario la repetición de los mismos.

De los resultados obtenidos en los ensayos 2 y 3, se puede concluir que el sistema de ionización bipolar por plasma frío ha sido eficaz, en las condiciones testadas en esta habitación de hotel, para reducir aproximadamente 2 log la concentración del bacteriófago MS2 en el aire.



## 10. Anexos

### 10.1. Anexo 1. Bibliografía

- Adams M.H. Agar overlay methods for routine phage production. Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- American Type Culture Collection (ATCC) PO Box 1549. Manassas, VA 20108 USA. www.atcc.org.
- ASTM-1053:97. Actividad virocida para superficies inertes.
- Cormier J. and Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS". J Virol Methods. 2014, 196:86-92.
- Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular Cloning a Laboratory Manual. (Third Edition). 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-576-5 (cloth) -- ISBN 0-87969-577-3 (pbk).
- Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998), 144: 2579-2587.
- O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.
- Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.
- UNE\_EN 13610:2003. Ensayo cuantitativo para evaluación de la actividad viricida frente a bacteriofagos.
- UNE-EN ISO 10705-1. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 1: recuento de bacteriófagos ARN F específicos.
- UNE-EN 1040:2006 "Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1).