

## El ozono no consigue la desinfección de los vehículos de emergencias de virus similares al SARS-CoV-2

### Ozone fails to disinfect emergency vehicles contaminated with viruses similar to SARS-CoV-2

Jorge Biurrun Cía<sup>1</sup>, Begoña García Martínez<sup>2</sup>, Andrea Pérez Montero<sup>2</sup>, Grazyna Kochan<sup>2</sup>, David Escors Murugarren<sup>2</sup>, José Crespo Martínez<sup>1</sup>, Iñigo Lasa Uzcudun<sup>2</sup>, Alfredo Echarri Sucunza<sup>1</sup>

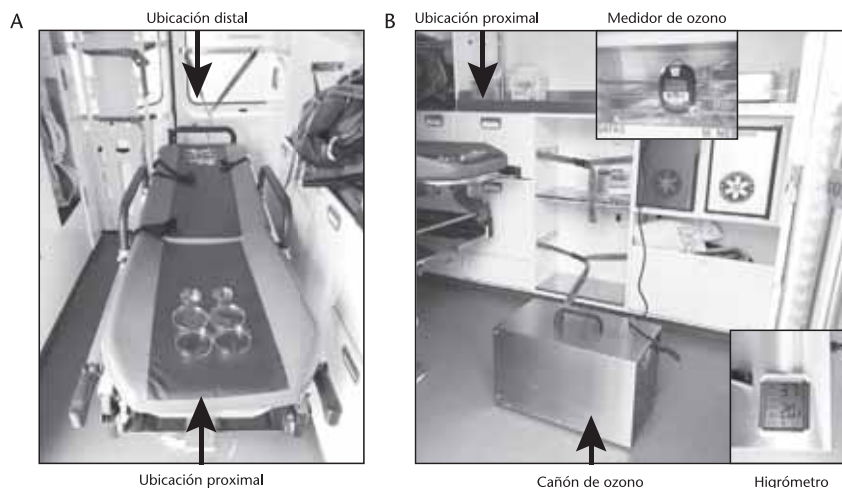
Ante la pandemia generada por el coronavirus SARS-CoV-2, la desinfección de los vehículos de emergencias supone una cuestión crucial. No en vano, son medio de transporte de pacientes contagiados y podrían ser vector de contagio para otros pacientes. Administraciones, servicios de emergencias y empresas privadas de transporte sanitario están aplicando diversas medidas para la desinfección de los vehículos. Actualmente, el uso de cañones productores de ozono es uno de los métodos más utilizados. El ozono es un gas oxidante con demostrada actividad desinfectante en medio acuoso que se utiliza para la desinfección de aguas y alimentos<sup>1-3</sup>. Sin embargo, su eficacia como desinfectante de superficies por nebulización no ha sido suficientemente probada y el Ministerio de Sanidad no lo registra como viricida para la desinfección de superficies<sup>4</sup>.

En este trabajo hemos analizado la eficiencia del procedimiento que utiliza cañones de ozono para la desinfección de ambulancias analizando su eficacia para reducir la viabilidad de tres microorganismos modelo: un lentivector y dos patógenos bacterianos. Los lentivectores son estructuralmente similares al coronavirus SARS-CoV-2, de tamaño semejante (100 nm), con un genoma RNA de cadena simple empaquetado por la proteína de la nucleocápsida envuelta a su vez por una membrana lipídica en la que se insertan proteínas que interactúan con los receptores de la célula huésped<sup>5,6</sup>. Los lentivectores pueden actuar como vehículos de genes reporteros, como el de la proteína fluorescente GFP, que permite cuantificar el número de partículas virales infectivas cuantificando el número de células hospedadoras que adquieren fluorescencia. Gracias a su capacidad de infectar pero no de multiplicarse, pueden utilizarse como agentes bioseguros sustitutos de los coronavirus tipo SARS para evaluar procedimientos de desinfección sobre agentes infecciosos virales. Aunque actualmente la preocupación por una adecuada desinfección se debe a la necesidad de evitar la transmisión del coronavirus SARS-CoV-2, también se están utilizando tratamientos con ozono como desinfectantes de amplio espectro, suponiendo su efectividad frente a otros microorganismos. Por esta razón también se ha analizado la capacidad desinfectante

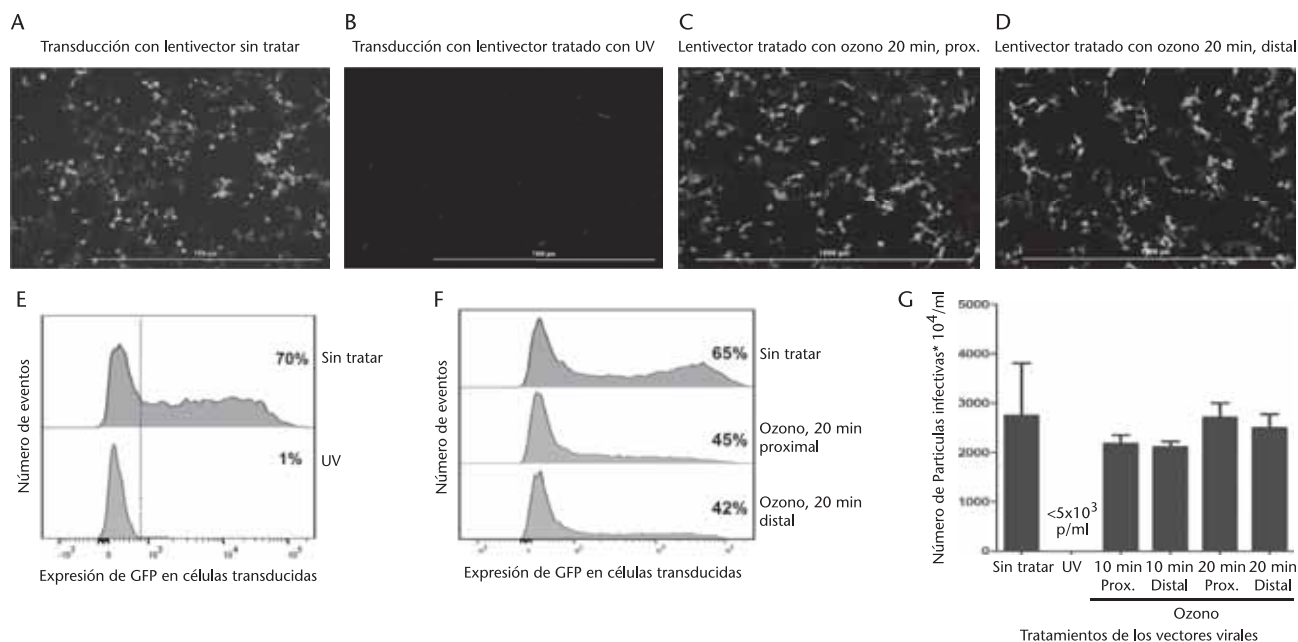
de estos tratamientos frente a dos patógenos bacterianos, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*, bacterias modelo recomendadas por la normativa americana (EPA) y europea (EN)<sup>7,8</sup> para probar la efectividad de tratamientos desinfectantes en superficies.

El lentivector utilizado fue pSIN-GFP<sup>9</sup>, que fue preparado y titulado siguiendo los procedimientos descritos anteriormente<sup>10,11</sup>. 1 ml de cultivo de las cepas *Staphylococcus aureus* cepa MW2 (*S. aureus* MW2)<sup>12</sup> y *Salmonella enterica ser. Enteritidis* cepa 3934 (*S. Enteritidis* 3934)<sup>13</sup> crecidas durante la noche en medio TSB y LB respectivamente a 37°C en agitación, fueron recogidos por centrifugación, lavados tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y resuspendidos en 1 ml de PBS. Se colocaron 25 µl de cada suspensión en placas de Petri vacías y estériles y fueron desecadas. Como vehículo de emergencias se utilizó una ambulancia medicalizada de 10,79 m<sup>3</sup>, y como fuente de ozono un cañón con capacidad de producción de 16.000 mg/h (*Industrial Global Supply S.L.*). El cañón fue colocado en el suelo

de la ambulancia orientando su producción de gas hacia la camilla (Figura 1). Se colocaron placas abiertas con 1 ml del preparado lentiviral en medio DMEM completo y placas con los cultivos bacterianos desecados, sobre la camilla en dos ubicaciones: una sobre la cabecera, cercana a la fuente de ozono (ubicación proximal), y otra sobre los pies, alejada de la fuente de ozono (ubicación distal) (Figura 1). Los niveles de ozono fueron determinados utilizando un medidor (*Dräger Pac 8.000*) y se alcanzaron > 10 ppm durante los tratamientos (Figura 1). Se utilizó un higrómetro (*ThermoPro*) para registrar la humedad ambiental que osciló entre 37-48% durante los ensayos (Figura 1). Según las especificaciones del fabricante, 3,23 minutos de tratamiento son suficientes para la desinfección de la ambulancia utilizada en este estudio (0,3 min/m<sup>3</sup> para vehículos de emergencias). Se realizaron dos tratamientos de 10 y 20 minutos (3 y 6 veces el tiempo recomendado respectivamente). Tras los tratamientos se cuantificaron las unidades lentivirales infectivas mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flu-



**Figura 1.** Contextualización de los elementos utilizados en el ensayo. (A) Localización de los preparados lentivirales y cultivos desecados colocados sobre la camilla de la ambulancia en las dos ubicaciones analizadas, ubicación proximal y distal (flechas), en referencia a la localización del cañón de ozono. (B) Localización del cañón de ozono en el interior de la ambulancia (flecha inferior). El medidor de ozono fue colocado en los estantes superiores de la ambulancia a la altura del ozonizador. La fotografía registra un momento del ensayo en el que el medidor muestra la presencia de niveles de ozono superiores a 10 ppm en el interior del habitáculo, con aparición en la pantalla de los símbolos que indican que se ha superado el rango máximo de medición, con las correspondientes alarmas luminosas activadas. El higrómetro fue introducido en la ambulancia antes y después de los ensayos y registró el rango de humedad en el que se llevaron a cabo los ensayos.



**Figura 2.** Efectos de los tratamientos con ozono y de la radiación ultravioleta sobre la viabilidad de vectores lentivirales. (A) Fotografía de microscopía de fluorescencia de células transducidas con una preparación de lentivector pSIN-GFP sin tratamiento previo. La fluorescencia es indicativa de una infección viable con partículas virales. (B) Como en A, pero tratando la preparación de lentivector con luz UV-C, 20 min. La viabilidad de las partículas de vector viral se pierde de manera significativa. (C) Como en B, pero tratado con ozono (> 10 ppm) durante 20 min en la ubicación proximal a la fuente de ozono. (D) Como en C, pero en la ubicación distal a la fuente de ozono. (E) Histogramas que representan la expresión de fluorescencia en células transducidas con vector viral sin tratar, o tratado previamente con luz ultravioleta. La barra vertical indica la separación entre positividad y negatividad en la expresión de fluorescencia. Los porcentajes de células que expresan fluorescencia, y por lo tanto infectadas con el vector viral, se muestran en las gráficas. (F) Como en E, pero utilizando lentivectores tratados con ozono durante 20 min, en las ubicaciones proximal y distal a la fuente de ozono. (G) Gráfico de barras representando los títulos de las preparaciones de lentivector tras los tratamientos indicados. Únicamente el tratamiento con luz ultravioleta disminuyó de forma significativa la viabilidad de las preparaciones de lentivector. Se señala el límite de detección de la técnica de titulación utilizada ( $5 \times 10^3$  partículas infectivas/ml).

jo<sup>10,11</sup> y se registró el promedio y la desviación estándar de cuatro recuentos independientes. Los cultivos bacterianos fueron rehidratados en 100  $\mu$ l de PBS. Se realizó el recuento de células viables de los cultivos tratados y de los mismos cultivos sin tratar mediante el recuento en placa de diluciones seriadas, y se registró el promedio y la desviación estándar de tres cultivos independientes. Los tratamientos con ozono se compararon con un tratamiento con lámpara de luz UV-C, método de desinfección de superficies de eficacia probada<sup>14,15</sup>. Se colocaron placas abiertas con 1 ml del preparado lentiviral en medio DMEM completo y con cultivos bacterianos desecados en una cabina de flujo laminar y fueron irradiados con luz UV-C (lámpara TUV 30W, 100  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> a 1 m) durante 20 minutos. Se llevó a cabo títulos y recuentos como se ha descrito anteriormente.

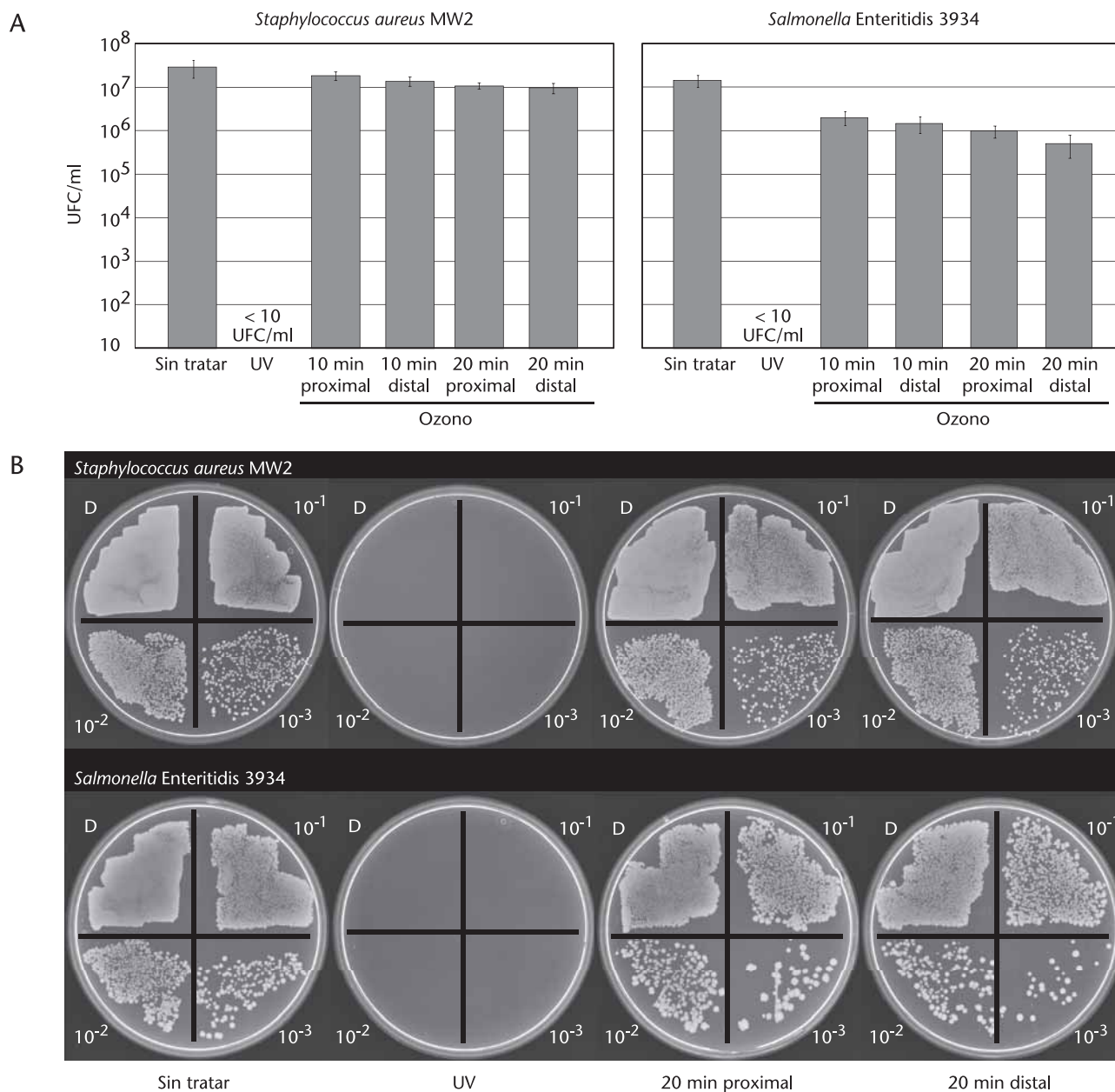
El tratamiento con ozono apenas produjo una disminución en el título del lentivector (Figura 2) observándose diferencias inferiores a un logaritmo, independientemente del tiempo y la cercanía a la fuente de ozono. Los tratamientos con ozono

tampoco tuvieron un efecto significativo sobre la viabilidad de las bacterias, con disminuciones que no superaron el medio logaritmo en el caso de *S. aureus* MW2 y 1,4 logaritmos en el caso de *S. Enteritidis* 3934. En comparación con esta limitada capacidad desinfectante de los tratamientos con ozono, el tratamiento con luz UV-C redujo el título del lentivector y el número de bacterias viables por debajo de los límites de detección de las técnicas, (< 5.000 partículas/ml en la titulación del lentivector y < 10 UFC/ml en el recuento de bacterias), y se alcanzó una reducción de 4 logaritmos en el caso del lentivector (Figura 2) y de 6 logaritmos en el caso de las bacterias (Figura 3). Estos ensayos se repitieron en otra ocasión, obteniéndose resultados similares a los aquí presentados (datos no mostrados).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA)<sup>7</sup> y la normativa europea (EN-14885) recomiendan una disminución superior a 3 logaritmos en el

caso de virus y a 5-6 logaritmos en el caso de bacterias para considerar efectivos tratamientos desinfectantes en superficies hospitalarias. Ninguno de los tratamientos con ozono, independientemente de su duración o de su cercanía a la fuente del gas, redujo de forma suficiente el título del lentivector o el número de bacterias viables (Figuras 2 y 3) para considerar efectiva la desinfección según estas directrices. Se ha descrito actividad viricida del ozono gaseoso en superficies utilizando concentraciones de 20-25 ppm en presencia de una humedad relativa superior al 90%<sup>16</sup>. En este trabajo hemos utilizado concentraciones de ozono de 10 ppm (probablemente superiores, aunque sin determinar ya que el límite de detección del equipo medidor fue de 10 ppm), y una humedad relativa de 37-48%, lo cual pudo haber influido en la eficiencia del tratamiento.

A pesar de haber realizado los ensayos en dos ocasiones obteniéndose resultados similares, no se puede descartar que tratamientos pro-



**Figura 3.** Efecto de los tratamientos con ozono y de la radiación ultravioleta sobre la viabilidad de las bacterias *S. aureus* y *S. Enteritidis*. (A) Representación del recuento de células viables de *S. aureus* MW2 y *S. Enteritidis* 3934 (UFCs/ml) tras los tratamientos indicados en las gráficas. Se representa el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes. Se señala el límite de detección de la técnica de recuento utilizada (10 UFCs/ml). (B) Fotografías de las placas en las que se realizó el recuento de células bacterianas viables realizando diluciones decimales seriadas de cada cepa. Se indica en cada cuadrante la dilución sembrada. D indica la suspensión bacteriana sin diluir. Únicamente el tratamiento con luz ultravioleta disminuyó de forma significativa la viabilidad de ambas cepas bacterianas.

longados, concentraciones superiores o en presencia de otras condiciones de humedad el ozono pudiera ejercer una actividad desinfectante.

Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo indican que los tratamientos con ozono que se están utilizando en la actualidad para la desinfección de vehículos de

emergencias son insuficientes y no son recomendables para esta finalidad.

#### Bibliografía

1 Gray NF. Ozone Disinfection. En: Percival SL, Yates MV, Williams DD, Chalmers R, Gray N. Microbiology of waterborne diseases: microbiological aspects and risks. Amsterdam;

Boston: Elsevier/Academic Press; 2014. pp. 17.

2 Ding W, Jin W, Cao S, Zhou X, Wang C, Jiang Q, et al. Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. *Water Res.* 2019;160:339-49.

3 Naito S, Takahara H. Ozone contribution in food industry in japan. *Ozone: Science & Engineering.* 2006;28:425-9.

4 Listado productos virucidas autorizados en España para uso ambiental (TP2), industria alimentaria (TP4) e higiene humana (PT1).

- (Consultado 3 Julio 2020). Disponible en: [https://www.mscbs.gob.es/profesiubakes/saludPublica/ccayes/alertasActual/nConv/documentos/Listado\\_virucidas.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesiubakes/saludPublica/ccayes/alertasActual/nConv/documentos/Listado_virucidas.pdf)
- 5 Escors D, Ortego J, Laude H, Enjuanes L. The membrane m protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *J Virol.* 2001;75:1312-24.
  - 6 Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58:107-19.
  - 7 Product performance test guidelines, OCSPP 810.2200, disinfectants for use on environmental surfaces, guidance for efficacy testing. [EPA 712-C 17-004]. (Consultado 3 Julio 2020). Disponible en: <https://beta.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0150-0036>.
  - 8 Technical guidance document in support of the directive 98/8/ec concerning the placing of biocidal products on the market guidance on data requirements for active substances and biocidal products. (Consultado 3 Julio 2020). Disponible en: [https://echa.europa.eu/documents/10162/16960215/bpd\\_guid\\_tnsg-data-requirements\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/16960215/bpd_guid_tnsg-data-requirements_en.pdf)
  - 9 Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, Arce F, Bennett CL, Collins M, et al. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8 +T cells. *EMBO Mol Med.* 2011;3:581-92.
  - 10 Escors D, Lopes L, Lin R, Hiscott J, Akira S, Davis RJ, et al. Targeting dendritic cell signaling to regulate the response to immunization. *Blood.* 2008;111:3050-61.
  - 11 Selden C, Mellor N, Rees M, Laurson J, Kirwan M, Escors D, et al. Growth factors improve gene expression after lentiviral transduction in human adult and fetal hepatocytes. *J Gene Med.* 2007;9:67-76.
  - 12 Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K-I, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 2002;359:1819-27.
  - 13 Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo J-M, Gamazo C, et al. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol.* 2002;43:793-808.
  - 14 Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Room decontamination with uv radiation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;31:1025-9.
  - 15 Boyce JM, Donskey CJ. Understanding ultraviolet light surface decontamination in hospital rooms: A primer. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019;40:1030-5.
  - 16 Hudson JB, Sharma M, Vimalanathan S. Development of a practical method for using ozone gas as a virus decontaminating agent. *Ozone: Science & Engineering.* 2009;31:216-23.

**Filiación de los autores:** <sup>1</sup>Subdirección de Urgencias de Navarra y Dirección Técnica de la atención a la Urgencia Vital. Pamplona, Navarra, España. <sup>2</sup>Unidades de Oncoinmunología y de Patogénesis Microbiana, Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, España.

**Correo electrónico:** [alfredocharri@gmail.com](mailto:alfredocharri@gmail.com)

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de interés en relación al presente artículo.

**Contribución de los autores, financiación y responsabilidades éticas:** Todos los autores han confirmado su autoría, la no existencia de financiación externa y el mantenimiento de la confidencialidad y respeto de los derechos de los pacientes en el documento de responsabilidades del autor, acuerdo de publicación y cesión de derechos a EMERGENCIAS.

**Agradecimientos:** Los autores desean agradecer la cesión de la ambulancia de prácticas de la Escuela Sanitaria Técnico Profesional de Navarra (ESTNA), y a Protección Civil de Navarra por la cesión del ozonizador para la realización de los estudios presentados en este trabajo.

**Artículo no encargado por el Comité Editorial y con revisión externa por pares.**

**Editor responsable:** Pere Llorens Soriano.

**Correspondencia:** Alfredo Echarri Sucunza. Subdirección de Urgencias de Navarra y Dirección Técnica de la atención a la Urgencia Vital. Avda la Paz s/n. 31002 Pamplona, Navarra, España.