(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 554 102**

(51) Int. CI.:

A01N 33/08 (2006.01)
A01N 33/08 (2006.01)
A01N 39/00 (2006.01)
A01N 33/12 (2006.01)
A01N 33/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2003 E 03701520 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1469729**

(54) Título: **Agente desinfectante viricida**

(30) Prioridad:

18.01.2002 EP 02001329
23.01.2002 US 349994 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2015

(73) Titular/es:

LONZA AG (100.0%)
MÜNCHENSTEINERSTRASSE 38
4052 BASEL, CH

(72) Inventor/es:

LICHTENBERG, FLORIAN;
LÜTZELER, MICHAEL y
RANFT, VOLKER

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agente desinfectante viricida

La invención se refiere al uso de composiciones de agente desinfectante sinérgicas a base de sales de amonio cuaternario como agentes viricidas, en particular contra poliovirus.

Se conocen numerosas composiciones de agente desinfectante y conservante a base de aminas y/o sales de amonio cuaternario. Éstas presentan sin embargo, en general, en particular en grandes diluciones, una eficacia nada satisfactoria contra hongos, tal como, por ejemplo, *Aspergillus niger* y virus (en particular contra virus altamente resistentes tal como por ejemplo los poliovirus).

Era por lo tanto objetivo de la presente invención la provisión de composiciones de agente desinfectante a base de sales de amonio cuaternario que presentan, también a alta dilución, una buena eficacia.

De acuerdo con la invención, este objetivo se consigue mediante el uso de acuerdo con la reivindicación de patente 1.

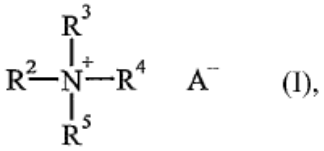
La antigua solicitud PCT/EP 01/10754 (publicada como documento WO 02/23990 A1) describe composiciones de agente desinfectante a base de aminas y/o sales de amonio cuaternario y alcanolaminas y sus propiedades fungicidas.

Se descubrió ahora sorprendentemente que tales composiciones de agente desinfectante también presentan marcadas propiedades viricidas y en particular también una buena eficacia contra virus altamente resistentes tal como poliovirus. Así mismo, son eficaces contra otros picornavirus tal como por ejemplo ECHO-virus o virus patógenos de animales correspondientes tal como ECBO-virus así como contra parvovirus tal como por ejemplo parvovirus canino

El documento WO9915012 describe un agente desinfectante viricida, que contiene un aldehído, una alcanolamina así como un aditivo de cloruro de benzalconio complementario.

El documento WO9422305 describe un agente desinfectante viricida con pH 10-12, que contiene sales de amonio cuaternario y aditivos básicos tal como hidróxidos/carbonatos alcalinos. El documento WO9820732 describe desinfectantes micobactericidas con pH 6-12, que contienen sales de amonio cuaternario y como agentes básicos o bien hidróxidos alcalinos o bien alcanolaminas.

Las composiciones comprenden sales de amonio cuaternario de fórmula general

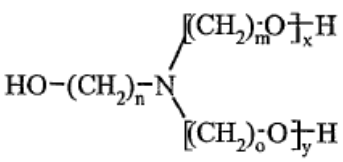


(I),

en la que

R^2 significa alquilo C_{6-18}
R^3 significa alquilo C_{1-18} o $-[(CR_2)_2-O]_nR^6$ con n = 1-20
R^4 y R^5 significan independientemente entre sí alquilo C_{1-4}
R^6 significa hidrógeno o fenilo dado el caso sustituido
y A^- significa un anión monovalente o un equivalente de un anión polivalente de un ácido inorgánico u orgánico;

y al menos una alcanolamina de fórmula general



(II),

en la que n y, siempre que estén presentes, m y o independientemente entre sí tienen el valor 2 o 3 y x e y tienen independientemente entre sí el valor 0 o 1, en la relación en masa I:II de 20:1 a 1:20.

Por alquilo se entienden en este caso y a continuación en cada caso grupos alquilo lineales o ramificados de los números de carbono indicados, preferentemente sin embargo grupos alquilo lineales y de manera especialmente

preferente aquellos con número par de átomos de carbono. En particular se entienden por ello también las mezclas de homólogos derivadas de materias primas naturales tal como por ejemplo “cocoalquilo”.

Por fenilo sustituido se entienden en particular grupos fenilo sustituidos con uno o varios grupos alquilo C_{1-8} y/o átomos de cloro.

Como anión A^- son adecuados en principio todos los aniones inorgánicos u orgánicos, en particular halogenuro, tal como por ejemplo cloruro o bromuro o aniones de ácidos carboxílicos inferiores tal como acetato, propionato o lactato.

La sal de amonio cuaternario (I) es preferentemente una sal de didecil-dimetilamonio, sal de dioctil-dimetilamonio, sal de octil-decil-dimetilamonio, sal de dicocoalquil-dimetilamonio, sal de cocoalquil-dimetil-poli(oxietil) amonio, sal de dicocoalquil-metil-poli(oxietil)amonio, sal de decil-dimetil-poli(oxietil)amonio, sal de didecil-metil-poli(oxietil)amonio, sal de octil-dimetil-poli(oxietil)amonio, sal de dioctil-metil-poli(oxietil)amonio, o una mezcla de dos o varios de estos compuestos. Se consiguieron resultados especialmente buenos con sales de didecil-dimetilamonio.

Como alcanolaminas (II) son adecuadas en principio todas las etanol- y propanolaminas, en particular monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina y 3-amino-1-propanol. Se encuentra naturalmente también en el contexto de la invención, utilizar mezclas de los compuestos mencionados. Se obtuvieron resultados especialmente buenos con los compuestos con grupo amino primario, en concreto con monoetanolamina y 3-amino-1-propanol. La relación en masa de sal de amonio cuaternario (I) con respecto a alcanolamina (II) se encuentra preferentemente en el intervalo de 1:5 a 5:1.

Las composiciones de agente desinfectante usadas de acuerdo con la invención contienen preferentemente agua como disolvente, dado el caso en combinación con un disolvente orgánico.

Preferentemente, las composiciones de agente desinfectante usadas de acuerdo con la invención contienen también una o varias sustancias auxiliares del grupo que consiste en disolventes orgánicos, tensioactivos, agentes complejantes, sustancias olorosas y colorantes.

Un uso preferido de las composiciones de agente desinfectante es la desinfección de superficies e instrumentos.

Otros campos de uso preferidos son la desinfección de la colada y la desinfección de las manos.

Un uso preferido adicional de las composiciones de agente desinfectante es su utilización en aseos químicos tal como por ejemplo a bordo de aeronaves y vehículos.

Los siguientes ejemplos aclaran la realización de la invención, sin que con ello haya de considerarse una limitación a las formas de realización descritas. Todos los datos de cantidades, siempre que no se indique lo contrario, son en % en masa. Como germen de prueba se utilizó en cada caso *Aspergillus niger* ATCC 16404. La eficacia, siempre que no se indique lo contrario, se determinó de acuerdo con el procedimiento especificado en CEN 1275.

Ejemplo 1

(Ejemplo comparativo, no entra en el alcance de la invención)

Se preparó una formulación de limpiador desinfectante (concentrado) a partir de:

5,0 % de cloruro de didecildimetilamonio (solución al 50 %)
2,0 % de *N,N*-bis(3-aminopropil)dodecilamina
5,0 % de monoetanolamina
5,0 % de Genapol® T250 (poliglicol éter de alcohol graso de sebo, 25 mol de óxido de etileno)
0,5 % de metasilicato de sodio
0,5 % de carbonato de sodio
2,0 % de sal de trisodio de ácido metilglicindiacético (Trilon® M; solución al 40 %) agua hasta el 100 %

La eficacia se determinó con una dilución (1 parte de concentrado, 99 partes de agua) a 20 °C y durante 15 min de tiempo de contacto. El logaritmo decimal de la reducción del número de gérmenes era 4,1.

Ejemplo comparativo 1

Se procedió tal como en el Ejemplo 1, sin embargo con la diferencia de que la monoetanolamina se sustituyó por la misma cantidad de agua. En las mismas condiciones de prueba la formulación era prácticamente ineficaz.

Ejemplo 2

(Ejemplo comparativo, no entra en el alcance de la invención)

Se preparó una formulación de agente desinfectante (concentrado) a partir de:

4,9 % de *N,N*-bis(3-aminopropil)dodecilamina
4,0 % de monoetanolamina
2,0 % de Genapol® T250 (poliglicol éter de alcohol graso de sebo, 25 mol de óxido de etileno)
5,0 % de Hostapur® SAS 30 (ácido *n*-alcanosulfónico C_{13-17} secundario, sal de sodio)
2,0 % de sal de tetrasodio de ácido etilendiaminotetraacético (solución al 40 %)
0,7 % de ácido etilendiaminotetraacético agua hasta el 100 %

La eficacia se determinó con una dilución (1 parte de concentrado, 199 partes de agua) a 20 °C y durante 15 min de tiempo de contacto. El logaritmo decimal de la reducción del número de gérmenes era 4,3.

Ejemplo 3

(Ejemplo comparativo, no entra en el alcance de la invención)

Se preparó una formulación de agente desinfectante (concentrado) a partir de:

4,2 % de *N,N*-bis(3-aminopropil)dodecilamina
2,0 % de propionato de didecil-metil-poli(oxietil)amonio (BARDAP 26)
4,0 % de monoetanolamina
2,0 % de Genapol® T250 (poliglicol éter de alcohol graso de sebo, 25 mol de óxido de etileno)
5,0 % de Hostapur® SAS 30 (ácido *n*-alcanosulfónico C_{13-17} secundario, sal de sodio)
2,0 % de sal de tetrasodio de ácido etilendiaminotetraacético (solución al 40 %)
0,7 % de ácido etilendiaminotetraacético
4,0 % de butildiglicol agua hasta el 100 %

La eficacia se determinó con una dilución (1 parte de concentrado, 199 partes de agua) a 20 °C y durante 15 min de tiempo de contacto. El logaritmo decimal de la reducción del número de gérmenes era >4,4.

Adicionalmente se determinó la eficacia también según el procedimiento especificado en CEN 1650 con un tiempo de contacto de 15 min, una concentración del 1,0 %, una dureza del agua de 30 °fH y una carga orgánica del 0,3 % de albúmina. El logaritmo decimal de la reducción del número de gérmenes era >4,4.

Ejemplos 4-19

(Ejemplos comparativos, no entran en el alcance de la invención)

Se prepararon soluciones acuosas a partir del 0,5 % de alcanolamina (II) y el 0,25 % de amina o sal de amonio cuaternario (Ia/Ib) y se sometieron a prueba de acuerdo con el procedimiento especificado en CEN 1275. Los resultados están resumidos en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

N.º de Ejemplo	**Amina/sal de amonio**	**Alcanolamina**	**log_{10} de reducción de germen**
4	cloruro de dimetil-dioctil-amonio	monoetanolamina	4,3
5	íd.	dietanolamina	4,0
6	íd.	trietanolamina	3,6
7	íd.	3-amino-1-propanol	4,2
8	cloruro de didecil-dimetilamonio	monoetanolamina	4,0
9	íd.	dietanolamina	3,8
10	íd.	trietanolamina	3,1
11	íd.	3-amino-1-propanol	4,0
12	cloruro de di-alquil C_{8-10}-dimetil-amonio (60 %) / cloruro de alquil C_{12-16}-bencil-di-metilamonio (40 %); Bardac® 205-M	monoetanolamina	3,9
13	íd.	dietanolamina	3,2
14	íd.	trietanolamina	2,8
15	íd.	3-amino-1-propanol	3,8
16	N,N-bis(3-aminopropil)-dodecilamina	monoetanolamina	2,9

17	íd.	dietanolamina	2,7
18	íd.	trietanolamina	2,4
19	íd.	3-amino-1-propanol	2,8

Para la comparación se sometieron a ensayo todos los compuestos expuestos en la Tabla 1 como sustancias individuales en una solución al 0,5 %. Ninguno de estos compuestos presentaba un efecto fungicida marcado (log_{10} de reducción de germen <2).

Ejemplo 20

Se preparó una formulación de agente desinfectante (concentrado) a partir de:

9,9 % de cloruro de didecil-dimetilamonio (solución al 70 %)
8,0 % de monoetanolamina
5,0 % de Genapol® T250 (poliglicol éter de alcohol graso de sebo, 25 mol de óxido de etileno)
5,0 % de carbonato de potasio (anhidro)
6,0 % de sal de tetrasodio de ácido etilendiaminotetraacético (Trilon® B; solución al 40 %) agua hasta el 100 %

Ejemplo 21

El concentrado descrito en el Ejemplo 20 se sometió a ensayo en una dilución al 6 % en el ensayo de suspensión con un tiempo de acción de 30, 60 y 120 minutos en cuanto a la eficacia contra poliovirus de tipo 1 (cepa Mahoney).

Método de prueba:

El ensayo tuvo lugar siguiendo la “Directiva de la Oficina Federal de Sanidad y la Asociación Alemana para el control de enfermedades víricas para el ensayo de desinfectantes químicos en cuanto a la eficacia contra virus” (Bundesgesundheitsbl. 1982, 25, 397). Como medio de crecimiento para la multiplicación de los cultivos celulares Vero sirvió “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, al que se había añadido un 10 % de suero de ternero fetal y 10 U/ml de penicilina así como 10 µg/ml de estreptomicina. Después de la inoculación del cultivo tisular con polio-virus el medio de cultivo tisular contenía sólo aún un 3 % de suero de ternero fetal. Después del desprendimiento casi completo de células infectadas con polio se limpió la suspensión de virus mediante centrifugación de células y constituyentes celulares (3000Xg, 15 min). Dado que el medio del cultivo celular contenía un 3 % de suero de ternero fetal, estaba presente también durante el ensayo de agente desinfectante también en las preparaciones de prueba con agua bidestilada, una pequeña carga de proteína.

Para el ensayo de agente desinfectante se mezclaron 1 parte de la suspensión de virus con 8 partes de una dilución al 7,5 % del concentrado de agente desinfectante (de manera correspondiente a una concentración final del 6 %) y en cada caso 1 parte de agua bidest. o albúmina de suero al 2 % o suero de ternero fetal y se incubó durante 30, 60 y 120 min a 20 °C. Entonces se detuvo el efecto del agente desinfectante mediante una dilución de 100 veces con medio frío, que no contenía nada de suero de ternero fetal. Con en cada caso 1 ml de esta dilución (correspondiente a una dilución de la suspensión de virus hasta 10^{-3}) y etapas de dilución decimales adicionales, se inocularon en cada caso 2 recipientes de placas de múltiples pocillos con 6 cavidades (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, Tipo Falcon™ 353046), que contenían una capa celular gruesa de células Vero. Después de 1 h de tiempo de adsorción a temperatura ambiente se aspiró el líquido sobrenadante. Entonces se cubrió la capa celular de los recipientes con 2 ml de agarosa al 2 %, licuada mediante cocción (Serva high EEO, n.º de cat. 11397), que se había mezclado con medio doblemente concentrado con suero de ternero fetal al 5 % en la relación 1:1 y se había enfriado en el baño de agua hasta 40 °C. Después de solidificar la agarosa a temperatura ambiente se incubaron las placas a 37 °C en la incubadora de CO_2 durante 2 días.

El ensayo de la infecciosidad de la suspensión de virus tuvo lugar en el ensayo en placa. A este respecto, cada área de células destruidas corresponde a una unidad infecciosa del poliovirus. El número de las placas muestra por lo tanto el número de las partículas de virus infecciosas presentes a una dilución determinada de la preparación de ensayo. Las placas se hacen visibles mediante tinción con en cada caso 1,0 ml de una solución del 0,1 % de Brilliant Blue R (Sigma, n.º de cat. B0149) en una solución acuosa con un 20 % de metanol y un 5 % de ácido acético durante 30 min. Las placas no teñidas se separan a continuación de la capa celular teñida de azul. A partir de en cada caso dos preparaciones de una dilución se calculó un valor medio del número de placas.

Como “controles de virus”, en los que se determinó la concentración inicial del virus, sirvieron preparaciones en las que el agente desinfectante se había sustituido por el mismo volumen de agua bidestilada. La concentración de virus así determinada sirvió como valor de referencia para el cálculo del efecto inactivador de virus de los desinfectantes sometidos a prueba.

Como “controles de toxicidad” para la detección de un daño eventual de las células de cultivo tisular mediante el agente desinfectante sirvieron preparaciones en las que la suspensión de virus se había sustituido por el mismo volumen de agua bidestilada. Estas preparaciones se diluyeron en la relación 1:100 y 1:1000 (correspondiente a una dilución de la suspensión de virus de 10^{-3} o 10^{-4} en la preparación de prueba de agente desinfectante) con medio sin suero de ternero fetal. Entonces se añadieron tal como las preparaciones para la prueba del efecto desinfectante durante 1 h al cultivo tisular y entonces se separaron. Después de 2 días de incubación a 37 °C se sometió a ensayo mediante tinción si la capa celular se había dañado por el agente desinfectante.

Como indicio de la resistencia del virus de ensayo y para la comparabilidad con otros exámenes se realizó conjuntamente un “control de formaldehído”. Para ello se mezcló 1 parte de la suspensión de virus con 4 partes de solución salina tamponada con fosfato (0,1 M; pH 7; “Dulbecco’s PBS”) y se añadió la misma cantidad de una solución de formalina que contenía 1,4 g de formaldehído en 100 ml de solución (concentración final: 0,7 g de HCHO/100 ml). Después de 5, 15 y 60 min de tiempo de acción se detuvo la eficacia del formaldehído tal como en la prueba de agente desinfectante mediante una dilución hasta 1:100 y se determinó la infecciosidad restante del poliovirus en diluciones decimales adicionales en la prueba de placa.

Resultados:

Experimentos de control:

El “control de virus” dio como resultado en la preparación con agua bidestilada una concentración de virus de $1{,}6 \cdot 10^8$ unidades infecciosas/ml, en la preparación con albúmina de suero $1{,}2 \cdot 10^8$ unidades infecciosas/ml y en la preparación con suero de ternero fetal $1{,}0 \cdot 10^8$ unidades infecciosas/ml.

El “control de toxicidad” mostró después de la dilución de la preparación de ensayo hasta 1:100 (correspondiente a una dilución de la suspensión de virus de 10^{-3}) un ligero daño de la capa celular. A una dilución de 1:1000 ya no podía reconocerse ninguna toxicidad. Por lo tanto, en las Condiciones de prueba puede seguirse una disminución de la concentración de virus bajo la acción de agente desinfectante hasta una concentración de virus de $5 \cdot 10^3$ unidades infecciosas/ml en la suspensión de virus (en ambos recipientes de la dilución 10^{-4} ya no puede verse ninguna placa) y a una concentración inicial de al menos 10^8 partículas de virus infecciosas/ml puede observarse una disminución de la concentración de virus por encima de al menos 4,5 potencias de diez. Dado que la directiva de ensayo para la detección de la eficacia de un agente desinfectante exige sólo una disminución de la concentración de virus en al menos 4 potencias de diez, puede comprobarse que se satisface esta condición con la preparación de ensayo seleccionada.

En la preparación con formaldehído al 0,7 % se midió después de 5 min de tiempo de acción una concentración de virus de $1{,}05 \cdot 10^6$/ml, después de 15 min $1 \cdot 10^3$/mm y después de 60 min $\leq 5 \cdot 10^2$/ml. Estos son valores esperados que confirman los resultados de ensayos previos: formalina al 0,7 % puede, normalmente, reducir la concentración de poliovirus en el plazo de 30 min en más de 4 potencias de diez.

Eficacia de los desinfectantes contra poliovirus:

Después de 30, 60 y 120 min de acción de dilución al 6 % de la composición de agente desinfectante del Ejemplo 20 ya no se observó ninguna placa en la preparación con suero de ternero fetal a la dilución de virus de 10^{-4} en cada caso en ambos recipientes de prueba. Por lo tanto, después del tratamiento con agente desinfectante está presente una concentración de virus de $\leq 5 \cdot 10^3$ unidades infecciosas/ml. Este resultado se encontró tanto en el caso de baja carga de proteína (preparación con agua bidest.) como carga de proteína media (preparación con albúmina de suero al 2 %) y carga de proteína alta (preparación con suero de ternero fetal). Se había llegado con ello a una disminución de la concentración del virus de al menos 4,5 etapas $\log_{10}$ o potencias de diez en comparación con la determinación control sin agente desinfectante.

Por lo tanto, se cumple el requisito de eficacia para el registro como agente desinfectante para instrumentos en la República Federal de Alemania.

Ejemplo 22

Eficacia contra ECBO-virus:

El concentrado descrito en el Ejemplo 20 se sometió a ensayo siguiendo la directiva de la Oficina Federal de Sanidad (alemana) y de la Asociación Alemana para el Control de Enfermedades Víricas e.V. para el ensayo de desinfectantes químicos con respecto a la eficacia contra virus (Bundesgesundheitsbi. 1982, 25, 397-398; comentario: Bundesgesundheitsbl. 1983, 26, 413-414) en el ensayo de suspensión cuantitativo en cuanto a sus propiedades viricidas con respecto a la cepa de ECBO-virus LCR-4. Se examinaron diluciones del 1,0 %, 3,0 % y 5,0 % del concentrado en agua bidestilada en tiempos de acción de 15, 30, 60 y 120 min.

La temperatura de ensayo ascendió a 20±1 °C, como cara de proteína se usó suero de ternero fetal (FKS) o albúmina de suero (bovine serum albumin, BSA).

Para la producción de la suspensión de virus se infectaron células pulmonares de ternero fetal (FKL 107) en frascos Roux con Minimum Essential Medium (MEM, Eagle) con aproximadamente 10 PBE (unidades formadoras de placa) del virus (obtenidas por Dr. W. Herbst, Instituto de higiene y enfermedades infecciosas de animales en la universidad Justus-Liebig de Giessen) por célula y después de aparecer el efecto citopático (aproximadamente 12 h) se sometió a un proceso de congelación/descongelación triple. Siguió una centrifugación a 770 X g durante 10 min, que proporcionó la suspensión de virus como sobrenadante.

Para la producción de las preparaciones de inactivación se mezclaron 8 partes en volumen del agente desinfectante en la concentración deseada de 1,25 veces con suspensión de virus y agua bidestilada (por 1 parte en volumen). En los ensayos con carga de proteína se usó en lugar del agua bidestilada una parte en volumen de FKS (Flow Laboratories) o solución de BSA al 2 % (Behringwerke AG).

La realización de los ensayos de inactivación tuvo lugar en tubos de vidrio cerrados. Después de los tiempos correspondientes se tomaron muestras para determinar la infecciosidad residual.

La determinación de la infecciosidad tuvo lugar con ayuda de la valoración de dilución final en el microprocedimiento. Para ello se diluyeron las muestras directamente después de su toma con Minimum Essential Medium (MEM), seleccionándose como factores de dilución potencias de 10 de números enteros. En cada caso se transfirieron 100 µl de una muestra diluida en 8 cubetas de una placa de poliestireno estéril con fondos planos. Entonces se añadieron en cada caso 100 µl de una suspensión recién tripsinizada de células KOP-R (tejido orofaríngeo de ternera, obtenido de Dr. R. Riebe, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere auf der Insel Riems, n.º de catálogo RIE 244). Esta suspensión se ajustó de modo que en casa cubeta se encontraban aproximadamente 10-15 X 10^3 células. Después se incubaron las muestras a 37 °C en la incubadora de CO_2 (al 5 % en volumen de CO_2). Después de 5 a 7 días se determinó después de acuerdo con el método de Spearmann-Kärber la dosis infecciosa (DI_{50}/ml).

La evaluación de la acción viricida tuvo lugar mediante cálculo de la caída de titulación con respecto a las titulaciones de control llevadas a cabo en cada caso en paralelo (después del tiempo de acción más largo). La diferencia se indicó como $\Delta \log_{10} DI_{50}$.

Para la determinación de la citotoxidad del agente desinfectante se mezclaron 2 partes en volumen de PBS (solución salina tamponada con fosfato) con 8 partes en volumen de la dilución desinfectante (concentración de 1,25 veces), diluido correspondientemente y se llevó a los cultivos celulares. Los datos de la dosis citotóxica tuvieron lugar como $\log_{10} DC_{50}$/ml (en analogía al valor de DI_{50}).

Los resultados de los ensayos de inactivación están resumidos en la siguiente Tabla 2, los de la determinación de la citotoxicidad en la Tabla 3.

Tabla 2

Concentración	Contenido de virus (control) ($\log_{10} DI_{50}$/ml)	Carga de proteína	Disminución del título de infección ($\Delta \log_{10} DI_{50}$) después de			
			15 min	30 min	60 min	120 min
1,0 %	6,85	-	1,25	1,25	1,64	n.d.
1,0 %	7,05	0,2 % de BSA	1,00	1,25	1,34	n.d.
1,0 %	7,15	10,0 % de FKS	1,00	1,15	1,25	n.d.
3,0 %	7,65	-	≥4,15	≥4,15	≥4,15	≥4,15
3,0 %	7,75	0,2 % de BSA	3,45	≥4,25	≥4,25	≥4,25
3,0 %	7,65	10,0 % de FKS	2,17	3,45	≥4,15	≥4,15
5,0 %	7,65	-	≥4,15	≥4,15	≥4,15	≥4,15
5,0 %	7,75	0,2 % de BSA	4,05	≥4,25	≥4,25	≥4,25
5,0 %	7,65	10,0 % de FKS	3,15	≥4,15	≥4,15	≥4,15
n.d. = no determinado						

Tabla 3

Concentración	Nivel de dilución				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1,0 %	+	-	-	-	-
3,0 %	+	+	-	-	-
5,0 %	+	+	-	-	-

Los resultados muestran que la composición sometida a prueba (concentrado) a una concentración de aplicación del 3,0 % después de 60 min de tiempo de acción y al 5,0 % después de 30 min presenta la eficacia definida en la directiva (Δlog_{10} DI_{50} ≥ 4,0; de manera correspondiente a una inactivación de ≥99,99 %) contra ECBO-virus.

Ejemplo 23

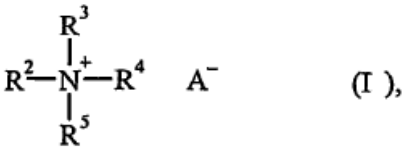
Eficacia contra parvovirus canino:

Las diluciones del concentrado descrito en el Ejemplo 20 se sometieron a prueba en cuanto a su eficacia contra parvovirus canino de tipo 2 (obtenido de Dr. Parrish, Cornell University) en células NLFK (Norden Lab Feline Kidney) a 22 °C y 10 min de tiempo de acción. Las diluciones en la relación 1:35 en agua desalada o dura (400 ppm AOAC hard water) con un 5 % de carga orgánica (suero de ternero fetal) mostraron una eficacia viricida suficiente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición de agente desinfectante, que como agente viricida contiene

a) una sal de amonio cuaternario de fórmula general

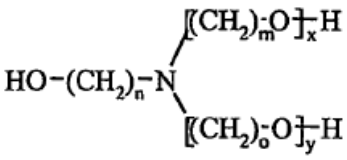


(I),

en la que

R^2 significa alquilo C_{6-18},
R^3 significa alquilo C_{1-18} o $-[(CH_2)_2-O]_nR^6$ con n = 1-20,
R^4 y R^5 significan independientemente entre sí alquilo C_{1-4},
R^6 significa hidrógeno o fenilo dado el caso sustituido y A^- significa un anión monovalente o un equivalente de un anión polivalente de un ácido inorgánico u orgánico; y

b) al menos una alcanolamina de fórmula general



(II),

en la que n y, siempre que estén presentes, m y o tienen independientemente entre sí el valor 2 o 3 y x e y tienen independientemente entre sí el valor 0 o 1;

en la relación en masa I:II de 20:1 a 1:20.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la sal de amonio cuaternario se selecciona del grupo que consiste en sales de didecil-dimetilamonio, sales de dioctil-dimetilamonio, sales de octil-decil-dimetilamonio, así como mezclas de estos compuestos.

3. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** la alcanolamina (II) se selecciona del grupo que consiste en monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina y 3-amino-1-propanol.

4. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la relación en masa I:II se encuentra entre 1:5 y 5:1.

5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la composición de agente desinfectante contiene agua como disolvente.

6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la composición de agente desinfectante contiene adicionalmente una o varias sustancias auxiliares del grupo que consiste en disolventes orgánicos, tensioactivos, agentes complejantes, sustancias olorosas y colorantes.

7. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en la desinfección de superficies e instrumentos.

8. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en la desinfección de la colada.

9. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en la desinfección de las manos.

10. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en aseos químicos.

11. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10 contra parvovirus o picornavirus, en particular contra poliovirus.