

Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas

Teresita Bello, Ismar A. Rivera-Olivero y Jacobus H. de Waard

Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina. San José. Caracas. Venezuela.

INTRODUCCIÓN. Se evaluó la actividad micobactericida de desinfectantes disponibles en el mercado venezolano, registrados como tuberculicidas y que son utilizados en la clínica y el laboratorio para la desinfección de materiales críticos y semicríticos.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se utilizó la Prueba de Suspensión Cuantitativa de la Comunidad Europea prEN 14348 bajo circunstancias limpias y sucias, y se evaluó la actividad de Gerdex® y K-Iller® (bromuro de lauril dimetil benzil amonio, en concentraciones de 10 y 0,16%, respectivamente), Microplus-Action® (5% polimetilen diurea), Cidex® (2% glutaraldehído) y Cidex® OPA (0,55% orthophthalaldehído).

La actividad micobactericida se evaluó con las cepas de referencia *Mycobacterium smegmatis* ATCC 19420, y con cepas de *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* aisladas de muestras clínicas.

La actividad tuberculocida se evaluó con *M. tuberculosis* H37Rv.

RESULTADOS. Cidex y Cidex OPA fueron efectivos frente a todas las micobacterias evaluadas bajo condiciones limpias y sucias con un $> 5\text{-Log}_{10}$ de reducción de viabilidad después de 5 min de exposición. Gerdex y K-Iller lograron solamente un 2- Log_{10} de reducción con *M. tuberculosis*, *M. abscessus* y *M. chelonae*, aun después de 60 min de exposición.

El Microplus-Action mostró un 4- Log_{10} de reducción de viabilidad con *M. tuberculosis*, pero menos de 1- Log_{10} de reducción con *M. abscessus* y *M. chelonae* después 60 min de exposición.

CONCLUSIONES. La actividad tuberculicida y micobactericida de varios desinfectantes disponibles en Venezuela, Gerdex®, K-Iller® y Microplus-Action®, que indican sus fabricantes resulta inadecuada cuando es evaluada según las normas europeas. El uso de estos compuestos para la desinfección de materiales críticos y semicríticos podría dar como resultado infecciones iatrogénicas.

Palabras clave: Micobacterias. Desinfectantes. Micobactericida. Tuberculicida.

Correspondencia: Dr. J.H. de Waard.
Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina.
Al lado de Hospital Vargas. Caracas. Venezuela.
Correo electrónico: jacobusdeward@movistar.net.ve

Manuscrito recibido el 21-2-2005; aceptado el 11-7-2005.

Inactivation of mycobacteria by disinfectants with a tuberculocidal label

INTRODUCTION. Disinfectants available in Venezuela, registered as tuberculocidal, and used in clinical and laboratory settings were tested for their mycobactericidal activity.

METHODS. The European Standard Quantitative Suspension test prEN14348 was used in simulated clean and dirty conditions. The disinfectants tested included Gerdex® and K-Iller® (both containing the quaternary ammonium compound dimethyl benzyl lauryl ammonium bromide in concentrations of 10% and 0.16% respectively), Microplus-Action® (5% polymethylene urea), Cidex® (2% glutaraldehyde) and Cidex® OPA (0.55% ortho-phthalaldehyde). The mycobactericidal activity was evaluated with *M. smegmatis* ATCC 19420 and in clinical isolates of *M. fortuitum*, *M. chelonae* and *M. abscessus*. The tuberculocidal activity was assessed with *M. tuberculosis* H37Rv.

RESULTS. Cidex and Cidex OPA were effective against all the test organisms, showing a $> 5\text{-log}^{10}$ reduction in CFU after 5 minutes of exposure under both clean and dirty conditions. Gerdex and K-Iller only achieved a 2-log reduction in *M. tuberculosis*, *M. abscessus* and *M. chelonae* CFU, even after 60 minutes of exposure. Micro Plus Action showed a 4-log reduction in *M. tuberculosis* viability but less than a 1-log reduction in *M. abscessus* and *M. chelonae* CFUs after 60 minutes of incubation.

CONCLUSION. The tuberculocidal activity claimed by the manufacturers of several disinfectants sold in Venezuela, Gerdex®, K-Iller® and Microplus-Action® is inaccurate when tested by European norms. The use of these products for disinfecting material used in critical and semi-critical patients could result in iatrogenic infections.

Key words: Mycobacteria. Disinfectants. Tuberculocidal. Micobactericidal.

Introducción

Los desinfectantes son muy utilizados en los hospitales y consultorios médicos, donde tienen un rol fundamental para el control y la prevención de las infecciones nosocomiales. Son productos químicos capaces de inhibir o destruir microorganismos presentes sobre objetos inanimados y/o superficies. Su eficacia depende de factores como el

tipo de desinfectante, tiempo de acción, temperatura, concentración del desinfectante, pH, configuración del objeto que tratar, factores físicos y químicos del medio, presencia de materia orgánica y la naturaleza de los microorganismos presentes¹.

Las micobacterias son reconocidas por su alta resistencia a la desinfección. Esta propiedad es consecuencia de la presencia de una pared celular compuesta por un alto contenido lipídico ácidos micólicos que actúan como barrera de protección frente a agentes químicos². Se conoce de la resistencia de las micobacterias a la acción de ácidos y álcalis, por lo cual se emplean en técnicas para su aislamiento a partir de muestras clínicas. Igualmente, se ha descrito resistencia de las micobacterias a una gran variedad de desinfectantes, entre ellos los compuestos amonio cuaternario (QAC)^{3,4}. Diferentes publicaciones indican que una desinfección inefectiva o el uso de desinfectantes inadecuados con materiales críticos o semicríticos es una posible explicación para infecciones con micobacterias en procedimientos quirúrgicos o invasivos. Se han comunicado casos de infección originados por cánulas contaminadas empleadas en procedimientos de liposucción^{5,6}. Así mismo, por desinfección inadecuada, se reportó la contaminación de un compartimento del equipo de hemodiálisis⁷. Un desinfectante contaminado con micobacterias (cloruro de benzalconio) y aplicado durante un procedimiento invasivo fue responsable de un brote de infecciones de piel⁸, así como jeringas desinfectadas inadecuadamente⁹.

Debido a la aparición en Caracas de varios brotes de infecciones por micobacterias atípicas en tejido blando y piel tras procedimientos estéticos, que involucraron de 5 hasta 15 personas (liposucción, lipoescultura, mesoterapia), se decidió evaluar la actividad sobre micobacterias de varios desinfectantes de producción nacional^{6,10}. Estos desinfectantes son usados comúnmente en Venezuela en hospitales y consultorios para la desinfección de materiales críticos y semicríticos y están registrados como productos esterilizantes y/o tuberculicidas.

Materiales y métodos

Desinfectantes

Fueron estudiados cinco desinfectantes, registrados en el Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS) con actividad micobactericida. Gerdex® (Rodeneza C.A., Caracas, Venezuela), K-lle® (Laboratorios K-lle C.A., Las Tejerías, Venezuela) ambos desinfectantes contienen el compuesto amonio cuaternario bromuro de lauril dimetil benzil amonio en una concentración del 10 y 0,16%, respectivamente. Microplus-Action® (5% polymethylén urea, Laboratorio de Galenica y Técnica Industrial, Facultad de Farmacia, UCV, Caracas, Venezuela), Cidex® (2% glutaraldehído elaborado por Cira Ingeniería Export Ltda. para Johnson & Jonson, Palmira Valle, Colombia) y Cidex®-OPA (0,55% ortho-phthalaldehido, Johnson & Johnson, Skipton, Reino Unido), ambos de Cidex®, fueron activados siguiendo instrucciones del fabricante antes su uso. La concentración final de los desinfectantes ensayados fue del 80%.

Cepas

Se emplearon las cepas de referencia *Mycobacterium smegmatis* ATCC 19420 y *M. tuberculosis* H37Rv, así como cepas aisladas de pacientes con infección de tejido blando (Colección Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela): *M. fortuitum* LTA 531, *M. chelonae* LT 1529, *M. abscessus* LT 949. Para los

ensayos las cepas fueron sembradas en medio sólido Middlebrook y Cohn Agar 7H10+ 10% OADC (Himedia, Mumbai, India).

Protocolo de ensayo

Los desinfectantes fueron ensayados con la Prueba de Suspensión Cuantitativa de la Comunidad Europea¹¹ en circunstancias limpias y sucias a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir del crecimiento de micobacterias se preparó una suspensión bacteriana en triptona pancreática digestiva de caseína (Himedia, Mumbai, India), ajustada al patrón de McFarland # 3 ($1-9 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/ml]). Un mililitro de esta suspensión se mezcló con 1 ml de 0,3% albúmina bovina fracción V (condiciones limpias) o con 1 ml 3% albúmina bovina fracción V y 3% (v/v) eritrocitos humanos (condiciones sucias) y 8 ml de desinfectante. Después de una incubación de 5 y 60 min, se mezcló 1 ml de la suspensión bacteriana con una solución neutralizante, dejando la mezcla en reposo durante 5 min. Se sembraron diluciones adecuadas en placas 7H10+ OADC e incubados a 37°C . Se cuantificó el número de UFC/ml del inóculo inicial y después de la incubación con los desinfectantes, contando las colonias en aquellas placas que contenían recuentos mayores de 10 UFC/ml y menores de 500 UFC, tomando en cuenta la dilución sembrada. Se calculó el \log_{10} de reducción de viabilidad = \log_{10} de UFC/ml antes de la acción del desinfectante menos \log_{10} de UFC/ml después de la acción del desinfectante a los 5 y 60 min de incubación con el desinfectante en condiciones limpias y sucias. Se indicó como desinfectante efectivo aquel que presentó $> 5 - \log_{10}$ de reducción de viabilidad a los 5 min de exposición en condiciones limpias y sucias. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las soluciones neutralizantes empleadas varían dependiendo de cada desinfectante ensayado diluyendo la suspensión 100 veces en 6% Tween 80, 1% tiosulfato de sodio, 0,5% tioglicolato de sodio y 0,15% cisteína (Cidex, Cidex OPA) 10% Tween 80 y 1,0% tiosulfato de sodio (Microplus-Action), 0,25 M buffer fosfato (pH 7,0) con 1% Tween 80, 0,5% tiosulfato de sodio y 0,1% histidina (Gerdex y K-lle). En el caso de K-lle una dilución de 10 veces con la solución neutralizante fue suficiente para inactivar el desinfectante.

Controles

Control de neutralización. Para comprobar que el neutralizante lograba detener la acción del desinfectante se mezclaron 1 volumen de desinfectante con el volumen indicado del neutralizante (10 o 100 volúmenes). Posteriormente se adicionó a 9 volúmenes de una dilución 1 volumen de una dilución adecuada de la suspensión bacteriana. Se incubó esta mezcla durante 30 min a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Control de toxicidad del neutralizante. Para comprobar que el neutralizante no era tóxico para las micobacterias se incubó un volumen del inóculo en 9 volúmenes de neutralizante durante 5 min.

De ambos ensayos de control se sembró diluciones adecuadas para determinar el UFC/ml y se comparó con el UFC/ml del inóculo inicial. Un ensayo fue considerado válido cuando no hubo disminución de viabilidad.

Resultados

Los resultados de la actividad micobactericida de los desinfectantes ensayados están resumidos en la tabla 1 y expresados en \log_{10} de reducción de viabilidad a los 5 y 60 min de exposición al desinfectante en condiciones limpias y sucias. En todos los ensayos el control de toxicidad del neutralizante y el control de neutralización mostraron validez de los resultados. La tabla muestra el promedio de tres ensayos realizados y la variabilidad entre los tres ensayos fue menor del 10%. Cidex® y Cidex-OPA resultaron efectivos frente a todos los microorganismos, demostrando un $> 5 - \log_{10}$ de reducción después de 5 min de exposición bajo condiciones limpias y sucias. Gerdex® y K-lle® mos-

TABLA 1. Actividad micobactericida de desinfectantes expresada en logaritmo de reducción después de 5 y 60 min de exposición. En condiciones limpias y en condiciones sucias. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestra el promedio de tres determinaciones. La variabilidad entre los ensayos fue menos del 10%

Desinfectantes	<i>Mycobacterium smegmatis</i>		<i>Mycobacterium fortuitum</i>		<i>Mycobacterium chelonae</i>		<i>Mycobacterium abscessus</i>		<i>Mycobacterium tuberculosis H37rv</i>	
	5'	60'	5'	60'	5'	60'	5'	60'	5'	60'
Condición limpia										
Gerdex	4,1	4,8	4,1	> 5	2,1	2,5	1,2	1,5	1,8	2,0
K-ller	3,9	4,9	3,8	> 5	1,6	1,9	1,3	1,5	1,8	2,0
Micro Plus Action	3,4	4,7	3,0	> 5	< 1	< 1	< 1	< 1	3,9	> 5
Cidex	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—
Cidex OPA	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—
Condición sucia										
Gerdex	3,4	4,6	3,5	> 5	2,0	2,2	1,1	1,3	1,7	1,9
K-ller	3,2	4,6	3,4	> 5	1,5	1,8	1,0	1,2	1,7	2,1
Micro Plus Action	3,2	4,1	2,8	4,9	< 1	< 1	< 1	< 1	3,8	4,7
Cidex	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—
Cidex OPA	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—	> 5	—

traron un 2-Log₁₀ de reducción frente a *M. tuberculosis*, *M. abscessus* y *M. chelonae*, después de 60 min de exposición. Microplus Action® mostró un 4-Log₁₀ de reducción frente a *M. tuberculosis*, pero menos de 1-Log₁₀ de reducción frente a *M. abscessus* y *M. chelonae* después de 60 min de incubación.

Discusión

La finalidad de este trabajo fue evaluar la actividad micobactericida de un grupo de desinfectantes disponibles en el mercado venezolano, cuyas etiquetas indican tener actividad esterilizante, o tuberculicida. En Venezuela, no existen normas oficiales para evaluar los desinfectantes, por lo cual se utilizó la Prueba de Suspensión Cuantitativa de la Comunidad Europea¹¹. Tres desinfectantes de producción nacional, Gerdex, K-ller y Microplus Action mostraron una actividad tuberculicida ineficiente. Dos de ellos, Gerdex y K-ller, tienen como componente un QAC y estos compuestos no son efectivos sobre micobacterias^{1,4}. Microplus Action, una base fuerte, nunca fue evaluado en la literatura especializada. Sin embargo, bases fuertes como una solución de NaOH al 4% es utilizada para descontaminar muestras clínicas y así aislar las micobacterias.

Las micobacterias utilizadas presentaron sensibilidad variable frente a los diferentes desinfectantes evaluados. La más resistente fue *M. abscessus* y la más sensible, *M. smegmatis*. Eso sugiere que *M. smegmatis* no es un referente apropiado para establecer la actividad tuberculicida. En nuestra opinión, los protocolos que por razones de bioseguridad usan este microorganismo no deben considerarse válidos.

Aunque en el mercado venezolano hay desinfectantes que pretenden ser esterilizantes o tener actividad micobactericida, los resultados de este estudio indican que no tienen una actividad suficiente para definirlos como tales cuando se evalúan bajo las normas europeas. La comunidad médica venezolana debe ser informada de que la actividad micobactericida indicada en las etiquetas de estas marcas de desinfectantes no es válida. El uso de estos compuestos para la desinfección de materiales críticos y semicríticos podría ocasionar infecciones iatrogénicas con micobacterias.

Hacemos una llamada de alerta a las autoridades venezolanas para establecer normas nacionales para evaluar y certificar los desinfectantes utilizados en el país, así como para elaborar normativas para la acreditación de laboratorios encargados de determinar la actividad de los desinfectantes sobre los microorganismos. Además, se debe definir claramente al público consumidor términos como esterilización, tuberculicida y micobactericida.

Bibliografía

- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Review*. 1999;12:147-79.
- Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious disease*. 4th ed. Vol. II. New York: Churchill Livingstone; 1995.
- Carson LA, Petersen NJ, Favero MS, Aquerio SM. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978;36:839-46.
- Rutala WA, Cole EC, Wannamaker NS, Weber DJ. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants. *Am J Med*. 1991;16:91(3B):267-71.
- Meyers H, Brown-Elliott BA, Moore D, Curry J, Truong C, Zhang Y, et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. *Clin Infect Dis*. 2002;1:34:1500-7.
- Murillo J, Torres J, Bofill L, Ríos-Fabre A, Irausquin E, Isteriz R, et al. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. The Venezuelan Collaborative Infectious and Tropical Diseases Study Group. *Arch Dermatol*. 2000;136:1347-52.
- Bolan G, Reingold AL, Carson LA, Silcox VA, Woodley CL, Hayes PS, et al. Infections with *Mycobacterium chelonae* in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. *J Infect Dis*. 1985;152:1013-9.
- Tiwari TS, Ray B, Jost KC Jr, Rathod MK, Zhang Y, Brown-Elliott BA, et al. Epub 2003 Mar 31. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. *Clin Infect Dis*. 2003;36:954-62.
- Wenger JD, Spika JS, Smithwick RW, Pryor V, Dodson DW, Carden GA, Klontz KC. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection associated with use of jet injectors. *JAMA*. 1990;18:264-373-6.
- Rivera-Olivera IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez Alfonzo R, Piñero J, et al. Soft tissue infections due to non-tuberculous mycobacteria following mesotherapy. What is the price of beauty. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2006;24:302-6.
- European Standard. DRAFT prEN 14348. Chemical disinfectants and antisepsics – Quantitative suspension test for the evaluation of mycobacterial activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants- Test methods and requirements (phase 2/step 1). European Committee for Standardization. December 2001.