

## **EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES ANTISÉPTICAS, POLIVINIL-PIRROLIDONA-YODO Y CLOREXIDINA, DESPUÉS DE LA CONTAMINACIÓN INTENCIONAL DE LOS RECIPIENTES**

Christiane Moreira Padovani<sup>1</sup>  
Kazuko Uchikawa Graziano<sup>2</sup>  
Vânia Regina Goveia<sup>3</sup>

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la sobre vivencia de los micro organismos en las diferentes formulaciones de los antisépticos clorexidina (CHX) y polivinil-pirrolidona-yodo (PVP-Y), después de una contaminación intencional de los recipientes y extrapolar los resultados de los laboratorios para el cuidado mínimo a ser dispensado a los recipientes de múltiple uso para el envase de los antisépticos probados. Para esto, fue desarrollado un estudio de laboratorio, en que 180 recipientes fueron contaminados con  $1 \times 10^5$  UFC/mL de suspensión conteniendo *S.marcescens*. Después de la contaminación, seis diferentes formulaciones de antisépticos (clorexidina y PVP-Y en los vehículos alcohólico, detergente y acuoso) fueron distribuidos y sometidos a la cultura diaria durante siete días, a fin de verificar se hubo crecimiento del microorganismo. Los resultados de esta investigación permiten recomendar la limpieza como el procedimiento mínimo en el procesamiento de esos recipientes que garantiza la seguridad de su utilización repetida para distribución de los antisépticos que fueron sometidos a prueba - CHX y PVP-Y.

DESCRIPTORES: agentes antiinfecciosos locales; contaminación; infección hospitalar

## **MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF DIFFERENT ANTISEPTIC POVIDONE-IODINE AND CHLORHEXIDINE FORMULATIONS AFTER INTENTIONAL CONTAMINATION OF CONTAINERS**

This study aimed to evaluate the survival rate of microorganisms within different antiseptic formulations - povidone-iodine (PVP-I) and chlorhexidine (CHX) - after intentional contamination, and to establish the minimum care necessary to ensure sterilization of non-disposable antiseptic solution containers. A laboratory study was performed with 180 antiseptic containers, which were contaminated with *Serratia marcescens* [ $1 \times 10^5$  UFC/mL]. The containers were closed and stored, at room temperature, during seven days and shaken daily. The antiseptic cultures were evaluated to be 100% negative to *Serratia marcescens* in all of the non-disposable containers. These results suggested that antiseptic solutions inactivate microorganisms [ $1 \times 10^5$  UFC/mL]. Since cleaned antiseptic containers have around 102 UFC coming from tap water, it can be inferred that cleansing is a safe minimum procedure to ensure reuse of containers for distribution of CHX and PVP-I solutions in aqueous, detergent and alcoholic formulations.

DESCRIPTORS: anti-infective agents, local; contamination; cross infection

## **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES ANTI-SÉPTICAS, POLIVINILPIRROLIDONA-IODO E CLOREXIDINA, APÓS CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS ALMOTOLIAS**

Os objetivos deste estudo foram: avaliação da sobrevivência dos microrganismos nas diferentes formulações dos anti-sépticos clorexidina (CHX) e polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I), após contaminação intencional das almotolias, e extrapolar os resultados laboratoriais para o cuidado mínimo a ser dispensado às almotolias de múltiplo uso para o envase dos anti-sépticos testados. Para tanto, foi desenvolvido estudo laboratorial, em que 180 almotolias foram contaminadas com  $1 \times 10^5$  UFC/mL de suspensão, contendo *S.marcescens*. Após a contaminação, seis diferentes formulações de anti-sépticos (clorexidina e PVP-I nos veículos alcoólico, degermante e aquoso) foram distribuídas e submetidas à cultura diária durante sete dias, a fim de verificar se houve crescimento do microrganismo. Os resultados desta investigação permitem a recomendação de que a limpeza como procedimento mínimo no processamento desses recipientes garante a segurança de sua utilização repetida para distribuição dos anti-sépticos testados - CHX e PVP-I.

DESCRITORES: antiinfecciosos locais; contaminação; infecção hospitalar

<sup>1</sup> Enfermeira, Maestra en Enfermería e-mail: chrispadovani@hotmail.com; <sup>2</sup> Profesor Titular de la Escuela de Enfermería de la Universidad de São Paulo, Brasil, e-mail: kugrazia@usp.br; <sup>3</sup> Enfermeira, Doctor en Enfermería, e-mail: vaniagoveia@uol.com.br.

## INTRODUCCIÓN

Los antisépticos son sustancias antimicrobianas de aplicación en la piel y mucosas para reducción del número de bacterias<sup>(1)</sup>. La utilización de esos agentes para prevenir las infecciones y reducir sus complicaciones se remontan a la época de Hipócrates. Actualmente, las principales utilidades de los antisépticos en las instituciones de la salud son utilizados en: la higienización de las manos, en la preparación quirúrgica de la piel del paciente, la eliminación de gérmenes de las manos y antebrazo del equipo de cirugía, y en algunos procedimientos como punciones venosas centrales y arteriales, cateterismos vasculares y vesicales y otros donde ocurre el rompimiento de las barreras normales de defensa del individuo<sup>(1-2)</sup>.

Los relatos encontrados en la literatura sobre productos antisépticos que sufrieron contaminación microbiológica causan preocupación en los profesionales del área de control de infección relacionada a la asistencia a la salud, ya que esas contaminaciones ha sido causa de brotes infecciosos en instituciones hospitalarias<sup>(3-9)</sup>.

A pesar de los cuestionamientos sobre la resistencia microbiológica a los biocidas, las concentraciones actualmente utilizadas en la práctica de los servicios de asistencia a la salud son substancialmente mayores que las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de las bacterias que tuvieron capacidad de crecer en las soluciones antisépticas<sup>(10)</sup>. La contaminación de esas soluciones está asociada principalmente a causas exógenas. Factores como almacenamiento inadecuado del antiséptico y fallas en la estabilidad de la formulación del producto pueden contribuir, por lo menos en parte, a la aparente contaminación encontrada en la práctica<sup>(11)</sup>.

Entre las publicaciones sobre contaminación de antisépticos, no fue identificada ninguna que relacionase tal contaminación a la forma de procesamiento de los recipientes que contienen tales soluciones, cuya práctica es ampliamente discutida en los servicios de la salud sin respaldo científico. Así, nos propusimos, en esta investigación, evaluar la supervivencia de los microorganismos en las diferentes formulaciones de los antisépticos CHX y PVPI-Y – después de una contaminación intencional de los recipientes con *Serratia marcescens* y extrapolar los resultados del laboratorio para el

cuidado mínimo a ser dispensado a los recipientes de múltiple uso para el envase de los antisépticos probados.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un estudio de laboratorio experimental, desarrollado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Enfermería Médico-quirúrgica de la Escuela de Enfermería de la Universidad de San Pablo.

*Inóculo:* Una muestra de cultivo existente en el depósito de *Serratia marcescens* ATCC 14756 fue mantenida en medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) y sub-cultivada en un medio de soya (Tryptone Soy Broth – TSB). Después de la confirmación de un tamaño del inóculo de  $10^5$  UFC/ml (turbiedad equivalente en la escala de Mac Farland), el material fue utilizado para contaminar los recipientes. La inoculación en los recipientes fue de un volumen de 1 mL, recolectados por medio de micro pipeta automática y distribuido en toda la pared interna del recipiente, con movimientos giratorios.

*Tamaño de la muestra:* Después de la realización de una pre prueba, el tamaño de la muestra del experimento quedó establecido en 30 muestras para cada formulación (CHX y PVP-Y en los vehículos acuoso, detergente y alcohólico), totalizando 180 recipientes, con un poder de la muestra del orden de 95%.

*Planificación experimental:* Las soluciones antisépticas investigadas - CHX y PVP-Y - en los vehículos acuoso, detergente y alcohólico fueron divididas en dos grupos, trabajados en momentos diferentes: Grupo I - clorexidina y Grupo II - PVP-Y. En un primer momento, 90 recipientes fueron contaminados intencionalmente con 1 mL de suspensión de  $10^5$  UFC/mL de *S. marcescens*. En los recipientes contaminados, las tres diferentes formulaciones de antisépticos de la clorexidina (alcohólica, detergente y acuosa) fueron distribuidas en un volumen de 150 mL. Para certificarse que los experimentos se iniciaron sin ningún microorganismo, todos los recipientes fueron sometidos a la limpieza y esterilización previa en óxido de etileno (ETO).

Los recipientes fueron tapados y almacenados a temperatura ambiente por siete días con agitación diaria, tres veces al día, a las 8:00h, a las 14:00 y a las 20:00h, para que la solución

antiséptica entrase en contacto con la superficies sobre el nivel de los 150 mL vaciados.

Las alícuotas de 1 mL de cada una de las 90 soluciones de CHX en prueba fueron diariamente transferidas con pipetas para los tubos que contenían los medios de cultura, a fin de verificar el crecimiento de la *S. marcescens*. De esta forma, al final de los siete días, fueron cultivados 630 medios TSB (90 por día durante siete días) inoculados con la muestra de antiséptico contaminado con el microorganismo de prueba. Los tubos inoculados fueron incubados en temperatura ambiente durante 21 días, con lectura diaria en la primera semana y en los 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> y 21<sup>o</sup> días.

Después de un mes, el estudio prosiguió con el grupo II, siguiendo el mismo método de trabajo, en que fueron comprobadas las soluciones de PVP-Y en las tres diferentes formulaciones (alcohólico, detergente y acuoso).

Los medios fueron preparados con adición de neutralizante específico para la clorexidina (tween 80 0,5%) y para el PVP-Y (sulfito de sodio 0,1%).

*Control positivo:* crecimiento del microorganismo de prueba en 10 mL del medio TSB, para control de calidad de la viabilidad de la cepa y adecuación de la misma al medio preparado (dos tubos).

*Control negativo:* medios TSB limpio (dos tubos) incubados a 22°C por 72 horas, indicando ausencia de microorganismos.

## RESULTADOS

En los experimentos del grupo I y II - 100% de los medios de cultura permanecieron límpidos - acusando ausencia de crecimiento del microorganismo de prueba. Los controles negativos permanecieron límpidos después de 21 días de lectura. Los controles positivos se volvieron turbios en 24 horas, siendo que en 48 horas fue visualizada la coloración rojiza, característica de la *S. marcescens*. Los datos de crecimiento del microorganismo en el Grupo I y II están resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1 - Distribución de los resultados de los cultivos microbiológicas de los antisépticos comprobados en el Grupo I y Grupo II después 21 días de incubación. San Pablo, 2007

Resultados	Group I - CHX	Group II - PVP-I	Control Positivo	Control Negativo
Crecimiento Positivo	0/630	0/630	2/2	0/2
Crecimiento Negativo	630/630	630/630	0/2	2/2

## DISCUSIÓN

La forma de procesamiento de recipientes de múltiple uso es una práctica que no está esclarecida en la literatura, y es ampliamente discutida en los servicios de salud sin respaldo científico. El camino metodológico trazado para buscar respuestas que puedan dirigir el procedimiento mínimo indicado para el procesamiento de esos recipientes, fue el de verificar la capacidad de los antisépticos de inactivar los microorganismos intencionalmente inoculados en los recipientes por medio de una contaminación desafío del orden de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Este inóculo fue considerado expresivo frente a la posible contaminación a que los antisépticos estarían expuestos cuando son envasados en recipientes limpiados solamente con agua potable y detergente.

Al extrapolar los resultados de los experimentos de la presente investigación, se constata que la limpieza es el procedimiento mínimo para reutilizar con seguridad los recipientes, porque la carga de microorganismos presentes en el recipiente apenas limpio sería, ciertamente menor que el inóculo desafío de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Siendo así, un nuevo desafío surge en el procesamiento de esos recipientes: el de la contaminación heterogénea del agua por el enjuague. Algunos investigadores han demostrado la baja carga microbiana en materiales quirúrgicos después de la realización de la limpieza, en promedio,  $10^2$  UFC/material<sup>(12-14)</sup>.

Como referencia legal de los parámetros de potabilidad de la agua, la Portería nº 518, de 25 de marzo de 2004 del Ministerio de la Salud "establece los procedimientos y responsabilidades relativos al control y vigilancia de la calidad del agua para consumo humano y su estándar de potabilidad, y da otras indicaciones"<sup>(15)</sup>. En ella encontramos el estándar microbiológico esperado, con una tolerancia de contaminación muy inferior al inóculo comprobado en la presente investigación: ausencia de *E. coli* o coliformes termo-tolerantes en 100 mL de agua.

Esta investigación es un estudio inédito *in vitro*, ya que las publicaciones que presentaron contaminación de antiséptico son resultados de situaciones de brotes infecciosos en la práctica asistencial. En Brasil, los estudios de laboratorio de la acción antimicrobiana de los agentes biocidas obtuvieron expresión a partir de la década del 80<sup>(16)</sup>.

Las principales referencias consultadas sobre contaminación de antisépticos apuntan cuestiones de manipulación y cuidados inadecuados que llevan a fallos en la estabilidad del producto y propician el crecimiento de microorganismos<sup>(3-6)</sup>.

También fueron relatados casos de contaminación de antisépticos con restos orgánicos en la solución y biopelículas en las paredes internas de los recipientes, evidenciados por medio de microscopia electrónica<sup>(7-9)</sup>; la presencia de estos puede haber conferido protección al contaminante. La formación de la biopelícula es un proceso por el cual los microorganismos se adhieren irreversiblemente y crecen en la superficie, produciendo polímeros extracelulares que facilitan la adhesión y la formación de la matriz. Sin embargo, los métodos físicos, tales como la limpieza mecánica o la fricción y también el ultrasonido son efectivos, garantizando su remoción, si son realizados de forma adecuada<sup>(17)</sup>.

Como mencionamos anteriormente, las concentraciones actualmente utilizadas en la práctica de los servicios de asistencia a la salud son substancialmente mayores que la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de estas bacterias<sup>(10)</sup>. Siendo así, la contaminación de soluciones antisépticas no está, por ahora, asociada a la reducción de la susceptibilidad de los microorganismos.

Esta investigación utilizó el raciocinio deductivo para considerar a la limpieza como el procedimiento mínimo en el procesamiento de los recipientes usados para envasar antisépticos. Esta consideración está fuertemente basada en estudios que confirman que el número de microorganismos recuperados de materiales apenas limpiados es del orden de  $10^2$  UFC<sup>(12-14)</sup>. Considerando este raciocinio deductivo, los cuidados con la limpieza, el enjuague y el secado adecuados de los recipientes se vuelven importantes para el control de la seguridad. Los residuos de detergentes eventualmente podrán

desestabilizar las formulaciones químicas, así como los residuos del agua de enjuague pueden diluir la concentración de los antisépticos.

Los estudios complementarios podrán confirmar este raciocinio deductivo, analizando, en diferentes instituciones hospitalarias, los microorganismos residuales (cuantitativa y cualitativamente) de recipientes solamente limpiados.

Finalmente, los resultados de este estudio ofrecen respuestas para la práctica del procesamiento de los recipientes, que hasta el momento no estaba respaldada en la ciencia. Se puede afirmar que la utilización repetida de estos recipientes después del proceso de limpieza es una práctica segura, agregando facilidades y economía para las centrales de esterilización de materiales en las instituciones de la salud. Podemos inclusive mencionar la cuestión ecológica, con la reducción de la generación de residuos de servicios de la salud proveniente de artículos desechables.

## CONCLUSIÓN

El presente estudio permitió establecer las siguientes conclusiones:

Los antisépticos comprobados (clorexidina y el PVP-Y en los vehículos acuoso, detergente y alcohólico) inactivaron los microorganismos intencionalmente inoculados en los recipientes, en una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

Considerando que los recipientes solamente limpiados contienen microorganismos vegetativos del agua del enjuague, del orden de  $10^2$  UFC, se deduce que la limpieza es considerada segura y como el procedimiento mínimo para utilización repetida de estos recipientes en la distribución de los antisépticos que fueron sometidos a prueba - Clorexidina y PVP-Y en las formulaciones detergente, acuosa y alcohólica.

## REFERENCIAS

1. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. MMWR 2002; 51 (RR-16):1-45.
2. USA Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Monograph for Health-Care Antiseptic

- Drug Products; Part III. Proposed Rule, 59 Federal Register; 1994.
3. Gómez R, Melero MI, García PP, Altes AG, García MA, Jiménez C, et al. Outbreak of Burkholderia cepacia caused by contaminated chlorhexidine in a hemodialysis unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29(4):377-8.
4. Goetz A, Muder RR. Pseudomonas aeruginosa infections

associated with use of povidone – iodine in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989; 10(10):447-9.

5. Archibald LK, Corl A, Shah B, Schlte M, Arduino MJ, Agüero S, et al. *Serratia marcescens* outbreak associated with extrinsic contamination of 1% chloroxylenol soap. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18(10):704-9.

6. Vigeant P, Loo VG, Bertrand C. An outbreak of *Serratia marcescens* infections related to contaminated chlorhexidine. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19:791-4.

7. Marrie TJ, Costerton W. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42(6):1093-102.

8. Berkelman RL, Lewin S, Allen JR, Anderson RL, Budnick LD, Shapiro S, et al. Pseudobacteremia attributed to contamination of povidone-iodine with *Pseudomonas cepacia*. *An Inter Med* 1981; 95: 32-6.

9. Anderson RL, Vess RW, Panlilio AL, Faver MS. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:3598-600.

10. Russel AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is a not a new phenomenon. *J Hosp Infect* 2004; 57:97-104.

11. Spainhour S. Letters to the Editor. *Serratia marcescens* outbreak associated with extrinsic contamination of 1%

chloroxylenol soap. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; (18):476.

12. Chan-myers H, Mcalister D, Antonoplos P. Natural bioburden levels detected on rigid lumened medical devices before and after cleaning. *Am J Infect Control* 1997; 25(6): 471-6.

13. Chu NS, Chan-Myers H, Ghazanfari N, Antonoplos P. Levels of naturally occurring microorganisms on surgical instruments after clinical use and after washing. *Am J Infect Control* 1999; 27:315-9.

14. Rutala WA, Gergen MF, Jones JF, Weber DJ. Levels of microbial contamination on surgical instruments. *Am J Infect Control* 1998; 26:143-5.

15. Ministério da Saúde [homepage na Internet] Brasília: Ministério da Saúde; [Acessado em 2007 janeiro 14]. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>.

16. Lacerda RA. Produção científica sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas. *Rev Latino-am Enfermagem* 2002; 10(1):55-63.

17. Donlan RM. Biofilm and device-associated infection. *Emerging Infect Dis* 2001; 7(2):277-81.