

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

Christiane Moreira Padovani¹
Kazuko Uchikawa Graziano²
Vânia Regina Goveia³

*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 1×10^5 UFC/mL de suspensão, contendo *S.marcescens*. Após a contaminação, seis diferentes formulações de anti-sépticos (clorexidina e PVP-I nos veículos alcoólico, detergente 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: antiinfeciosos locais; contaminação; infecção 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* [1×10^5 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 [1×10^5 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

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

*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 1×10^5 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 antiinfeciosos locales; contaminación; infección hospitalar

¹Enfermeira, Mestre em Enfermagem, e-mail: chrispadovani@hotmail.com; ²Professora Titular da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, Brasil, e-mail: kugrazia@usp.br; ³Enfermeira, Doutor em Enfermagem, e-mail: vaniagoveia@uol.com.br.

INTRODUÇÃO

Os anti-sépticos são substâncias antimicrobianas de aplicação na pele e mucosas para redução da contagem bacteriana⁽¹⁾. As tentativas de utilização desses agentes para prevenir as infecções e reduzir suas complicações datam da época de Hipócrates. Atualmente, as principais utilizações dos anti-sépticos nas instituições de saúde são: na higienização das mãos, no preparo cirúrgico da pele do paciente, na degermação das mãos e antebraço da equipe cirúrgica e em alguns procedimentos invasivos como punções venosas centrais e arteriais, cateterismos vasculares e vesicais e outros onde ocorre o rompimento das barreiras normais de defesa do indivíduo⁽¹⁻²⁾.

Os relatos encontrados na literatura sobre produtos anti-sépticos que sofreram contaminação microbiológica causam preocupação nos profissionais da área de controle de infecção relacionada à assistência à saúde, pois essas contaminações têm sido causas de surtos em instituições hospitalares⁽³⁻⁹⁾.

Apesar dos questionamentos sobre resistência microbiológica aos biocidas, as concentrações atualmente utilizadas na prática dos serviços de assistência à saúde são substancialmente maiores que aquelas concentrações inibitórias mínimas (CIM) das bactérias que tiveram capacidade de crescer nas soluções anti-sépticas⁽¹⁰⁾. A contaminação dessas soluções está associada principalmente a causas exógenas. Fatores como armazenamento inadequado do anti-séptico e falhas na estabilidade da formulação do produto podem contribuir, pelo menos em parte, à aparente contaminação encontrada na prática⁽¹¹⁾.

Dentre as publicações sobre contaminação de soluções anti-sépticas, não foi identificada nenhuma que relacionasse tal contaminação à forma de processamento dos recipientes (almotolias) que veiculam tais soluções, cuja prática é amplamente discutida nos serviços de saúde sem respaldo científico. Isso posto, propôs-se, nesta pesquisa, avaliar a sobrevivência dos microrganismos nas diferentes formulações dos anti-sépticos – CHX e PVPI-I – após contaminação intencional das almotolias com *Serratia marcescens* e extrapolar os resultados laboratoriais para o cuidado mínimo a ser dispensado às almotolias de múltiplo uso para o envase dos anti-sépticos testados.

MATERIAL E MÉTODO

Este é estudo laboratorial experimental e foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Enfermagem Médico-cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Inóculo: uma amostra da cultura estoque de *Serratia marcescens* ATCC 14756 foi mantida em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) e subcultivada em meio tríplico de soja (*Tryptone Soy Broth* – TSB). Após a confirmação de um tamanho do inóculo de 10⁵ UFC/ml (turvação equivalente na escala de Mac Farland), o material foi utilizado para contaminar as almotolias. A inoculação nas almotolias foi de um volume de 1 mL, coletados por meio de micropipeta automática e distribuído em toda a parede interna da almotolia, com movimentos giratórios.

Tamanho da amostra: após a realização de um pré-teste, o tamanho amostral do experimento ficou estabelecido em 30 amostras para cada formulação (CHX e PVP-I nos veículos aquoso, degermante e alcoólico), totalizando 180 almotolias, com poder amostral da ordem de 95%.

Planejamento experimental: as soluções anti-sépticas investigadas – CHX e PVP-I – nos veículos aquoso, degermante e alcoólico foram divididas em dois grupos, trabalhados em momentos diferentes – grupo I – clorexidina e grupo II – PVP-I. Em um primeiro momento, 90 almotolias foram contaminadas intencionalmente com 1 mL de suspensão de 10⁵ UFC/mL de *S.marcescens*. Nas almotolias contaminadas, as três diferentes formulações de anti-sépticos da clorexidina (alcoólica, degermante e aquosa) foram distribuídas num volume de 150 mL. Para certificação de que os experimentos iniciaram sem microrganismo algum, todas as almotolias foram submetidas à limpeza e esterilização prévia em óxido de etileno (ETO).

Os recipientes foram tampados e armazenados em temperatura ambiente por sete dias com agitação diária, três vezes ao dia, às 8, às 14 e às 20h, para que a solução anti-séptica entrasse em contato com superfícies acima do nível dos 150 mL preenchidos.

Alíquotas de 1 mL de cada uma das 90 soluções de CHX em teste foram diariamente pipetadas e transferidas para os tubos contendo os meios de cultura, a fim de verificar crescimento da *S.marcescens*. Dessa forma, ao final dos sete dias, foram cultivados 630 meios TSB (90 por dia, durante sete dias) inoculados com a amostra de anti-séptico

contaminado com o microrganismo-teste. Os tubos inoculados foram incubados em temperatura ambiente durante 21 dias, com leitura diária na primeira semana e no 7º, 14º e 21º dia.

Após um mês, o estudo prosseguiu com o grupo II, seguindo o mesmo método de trabalho, em que foram testadas as soluções de PVP-I nas três diferentes formulações (alcoólico, degermante e aquoso).

Os meios foram preparados com adição de neutralizante específico para a clorexidina (*tween* 80 0,5%) e para o PVP-I (sulfito de sódio 0,1%).

Controle positivo: crescimento do microrganismo-teste em 10 mL do meio TSB, para controle de qualidade da viabilidade da cepa e adequação da mesma ao meio preparado (dois tubos).

Controle negativo: meios TSB límpido (dois tubos) incubados a 22°C por 72 horas, indicando ausência de microrganismos.

RESULTADOS

Nos experimentos dos grupos I e II, 100% dos meios de cultura permaneceram límpidos, acusando ausência de crescimento do microrganismo-teste. Os controles negativos permaneceram límpidos após 21 dias de leitura. Os controles positivos turvaram em 24h, sendo que em 48h foi visualizada a coloração avermelhada, característica da *S.marcescens*. Os dados de crescimento do microrganismo nos grupos I e II estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos resultados das culturas microbiológicas dos anti-sépticos testados nos grupos I e II após 21 dias de incubação. São Paulo, 2007

Resultados	Grupo I - CHX	Grupo II - PVP-I	Controle positivo	Controle negativo
Crescimento positivo	0/630	0/630	2/2	0/2
Crescimento negativo	630/630	630/630	0/2	2/2

DISCUSSÃO

A forma de processamento de almotolias de múltiplo uso é prática que não está esclarecida na literatura, e é amplamente discutida nos serviços de saúde sem respaldo científico. O caminho metodológico traçado para buscar respostas, que

possam direcionar o procedimento mínimo indicado para o processamento desses recipientes, foi a verificação da capacidade dos anti-sépticos para inativar os microrganismos intencionalmente inoculados nas almotolias por meio de uma contaminação desafio na ordem de 1×10^5 UFC/mL. Esse inóculo foi considerado expressivo frente à possível contaminação que os anti-sépticos seriam expostas, quando envasados em almotolias apenas limpas com água potável e detergente.

Ao extrapolar os resultados dos experimentos da presente investigação, constata-se que a limpeza é o procedimento mínimo para reutilização segura das almotolias, porque a carga de microrganismos presentes no recipiente apenas limpo seria certamente menor do que o inóculo desafio de 1×10^5 UFC/mL. Sendo assim, novo desafio surge no processamento desses recipientes: o da contaminação heterogênea da água para o enxágüe. Pesquisadores têm demonstrado a baixa carga microbiana em materiais cirúrgicos após realização da limpeza, em média, 10^2 UFC/ material⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Como referencial legal dos parâmetros de potabilidade da água, a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde, "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"⁽¹⁵⁾. Nela encontrou-se o padrão microbiológico esperado, com tolerância de contaminação muito inferior ao inóculo testado na presente investigação: ausência de *E.coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL de água.

Esta investigação é um estudo inédito *in vitro*, visto que as publicações que apresentaram contaminação de anti-séptico são resultados de situações de surtos na prática assistencial. No Brasil, os estudos laboratoriais da ação antimicrobiana dos agentes biocidas ganham expressão a partir da década de 80⁽¹⁶⁾.

Os principais referenciais consultados sobre contaminação de anti-sépticos apontam questões de manuseio e cuidados inadequados que levam a falhas na estabilidade do produto e propiciam o crescimento de microrganismos⁽³⁻⁶⁾.

Também foram reportados casos de contaminação com anti-sépticos com achados de *debris* orgânicos na solução e biofilmes nas paredes internas dos recipientes, evidenciados por meio de microscopia eletrônica⁽⁷⁻⁹⁾. A presença desses achados pode ter conferido proteção ao contaminante. A

formação do biofilme é processo pelo qual os microrganismos aderem irreversivelmente e crescem na superfície, produzindo polímeros extracelulares que facilitam a adesão e a formação da matriz. No entanto, os métodos físicos, tais como a limpeza mecânica ou a fricção, e, ainda, o ultra-som são efetivos, garantindo sua remoção, se realizados de forma adequada⁽¹⁷⁾.

Como mencionado anteriormente, as concentrações atualmente utilizadas na prática dos serviços de assistência à saúde são substancialmente maiores que a CIM (Concentração Inibitória Mínima) dessas bactérias⁽¹⁰⁾. Sendo assim, a contaminação de soluções anti-sépticas não está, por ora, associada à redução de susceptibilidade dos microrganismos.

Esta investigação utilizou-se do raciocínio dedutivo para considerar a limpeza como procedimento mínimo no processamento das almotolias em que os anti-sépticos são envasados. Essa consideração está fortemente pautada em estudos que confirmam que o número de microrganismos recuperados de materiais apenas limpos é da ordem de 10^2 UFC⁽¹²⁻¹⁴⁾. Considerando esse raciocínio dedutivo, os cuidados com a limpeza, o enxágüe e a secagem adequados das almotolias tornam-se importantes para o controle da segurança. Resíduos de detergentes eventualmente poderão desestabilizar as formulações químicas, assim como resíduos da água do enxágüe diluir a concentração dos anti-sépticos.

Estudos complementares poderão confirmar esse raciocínio dedutivo, analisando os

microrganismos residuais (quantitativa e qualitativamente) de almotolias apenas limpas em diferentes instituições hospitalares.

Por fim, os resultados deste estudo trazem respostas para a prática de processamento das almotolias, que até o momento não estava respaldada na ciência. Pode-se afirmar que a utilização repetida desses recipientes, após o processo de limpeza, é prática segura, agregando facilidades e economia para as centrais de esterilização de materiais nas instituições de saúde. Pode-se, inclusive, mencionar a questão ecológica envolvida, com redução da geração de resíduos de serviços de saúde provenientes de artigos descartáveis.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu estabelecer as conclusões mostradas abaixo.

Os anti-sépticos testados (clorexidina e o PVP-I nos veículos aquoso, degermante e alcoólico) inativaram os microrganismos intencionalmente inoculados nas almotolias, na concentração de 1×10^5 UFC/mL.

Considerando que as almotolias apenas limpas carregam microrganismos vegetativos da água do enxágüe, na ordem de 10^2 UFC, dedutivamente, a limpeza é considerada segura como procedimento mínimo para utilização repetida desses recipientes na distribuição dos anti-sépticos testados - Clorexidina e PVP-I - nas formulações detergente, aquosa e alcoólica.

REFERÊNCIAS

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, Aguero

- 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.