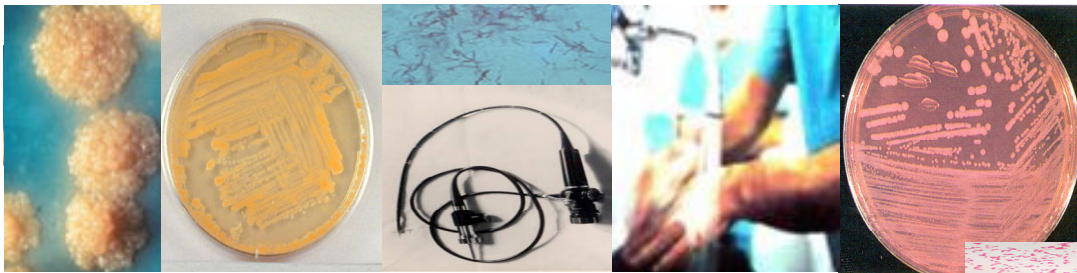




**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA**

**APORTACIONES AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS ANTISÉPTICOS Y
DESINFECTANTES**



**Águeda Hernández Rodríguez
2006**



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA**

**APORTACIONES AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES**

Memoria presentada por Águeda Hernández Rodríguez, para optar al Grado de Doctora en Biología por la Universitat Autònoma de Barcelona

Visto bueno de los directores de Tesis,

Dr. Prof. Vicenç Ausina Ruiz

Dra. Lurdes Matas Andreu

Badalona, mayo 2006

*A mi familia, sin cuyo aliento no hubiera iniciado
ni puesto fin a esta tesis*

A mi padre,

“No llores, es cierto que me marcharé antes que tú, pero cuando ya no esté todavía estaré, viviré en tu memoria con bellos recuerdos: verás los árboles, la huerta, el jardín, y acudirán a tu mente todos los momentos felices que hemos pasado juntos.”

Susana Tamaro
Dónde el corazón te lleve

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Papel de los biocidas en el control de las infecciones nosocomiales	5
1.2. Reseña histórica sobre los ensayos de actividad biocida	7
1.3. Niveles de actividad antimicrobiana de los desinfectantes	10
1.4. Requisitos de los biocidas	12
1.5. Mecanismos de acción biocida	14
1.5.1. Mecanismos de acción bactericida	15
1.5.2. Mecanismos de acción fungicida	16
+1.5.3. Mecanismos de acción esporicida	17
1.5.4. Mecanismos de acción virucida	18
1.6. Regulación de los biocidas	19
1.6.1. Reglamentación en EEUU	19
1.6.2. Reglamentación de los biocidas químicos en nuestro país	20
1.7. Métodos de evaluación de la eficacia antimicrobiana de los biocidas	22
1.7.1. Métodos <i>in vitro</i>	24
1.7.1.1. Ensayos de suspensión	24
1.7.1.2. Ensayos con portagérmenes	27
1.7.2. Métodos que simulan condiciones reales: ensayos prácticos	28
1.7.2.1. Ensayos para la desinfección de superficies	28
1.7.2.2. Métodos de evaluación de la eficacia del proceso de desinfección del instrumental médico	29
1.8. Actividad antimicrobiana de los antisépticos	34
1.8.1. Flora microbiana de la piel	35
1.8.2. Lavado de manos del personal sanitario	36
1.8.3. Métodos de evaluación de los antisépticos	37
1.8.3.1. Métodos <i>in vitro</i>	37
1.8.3.2. Estudios <i>in vivo</i>	38

1.9. Factores físico-químicos que influyen en la evaluación de la actividad biocida de los antisépticos y desinfectantes.....	40
1.9.1. Factores pre-tratamiento	41
1.9.1.1. Microorganismos	41
1.9.1.2. Condiciones de crecimiento de los microorganismos.....	43
1.9.1.3. Accesibilidad a los microorganismos	44
1.9.1.4. Temperatura de incubación de los cultivos.....	44
1.9.1.5. pH del medio de cultivo	44
1.9.1.6. Preparación del biocida.....	44
1.9.1.7. Preparación del inóculo.....	45
1.9.2. Factores durante el tratamiento	45
1.9.2.1. Número y localización de microorganismos.....	45
1.9.2.2. Concentración del biocida.....	45
1.9.2.3. Temperatura de ensayo	47
1.9.2.4. Importancia del pH.....	47
1.9.2.5. Sustancias interferentes.....	48
1.9.3. Factores post-tratamiento	49
1.9.3.1. Eliminación de la actividad residual de los desinfectantes	50
1.9.3.2. Recuperación de los microorganismos supervivientes	54
1.10. Actividad antimicrobiana de los desinfectantes frente a diferentes grupos de microorganismos	55
1.10.1. Actividad fungicida.....	55
1.10.2. Actividad esporicida	56
1.10.3. Actividad virucida.....	56
1.10.3.1. Virus de las hepatitis	59
1.10.3.2. Virus de la inmunodeficiencia humana.....	61
1.10.4. Actividad micobactericida	62
1.10.5.- Actividad frente a priones.....	63
1.11. Resistencia a los biocidas.....	64
1.11.1.- Mecanismos de resistencia bacteriana	65
1.11.1.1.- Mecanismos de resistencia intrínseca bacteriana	66
1.11.1.2.- Mecanismos de resistencia adquirida	72

1.11.2.-Problemas potenciales asociados a la resistencia bacteriana a biocidas	75
1.11.2.1.- Control de bacterias resistentes a los antibióticos	76
1.11.2.2. Factores de riesgo emergente para la adquisición de resistencia antibiótica bacteriana	76
1.11.3.- Mecanismos de resistencia fúngica	78
1.11.4- Mecanismos de resistencia vírica	79
2. ARTÍCULOS EN LOS QUE ESTÁ BASADA LA TESIS	81
3. JUSTIFICACIÓN.....	87
4. OBJETIVOS	95
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
5.1. Evaluación de la actividad biocida de los desinfectantes utilizados para la desinfección de alto nivel.....	106
5.1.1. Actividad micobactericida de biocidas utilizados en la desinfección de alto nivel. 106	
5.1.1.1. Estudio <i>in vitro</i> de evaluación comparativa de Perasafe® con glutaraldehído alcalino al 2% frente a <i>Mycobacterium</i> spp (artículo 1).....	107
5.1.1.2. Estudio <i>in use</i> de evaluación de Perasafe® comparado con Cidex® en la desinfección de BF (artículo 2).....	112
5.1.1.3. Evaluación de la actividad micobactericida y tuberculocida de Korsorex®, un detergente-desinfectante (artículo 3)	119
5.2. Sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes de <i>A baumannii</i> (artículo 4).....	123
5.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de Virkon® al 1% frente a bacterias, hongos, virus y esporas mediante normativas AFNOR (artículo 5).....	135
5.4. Ensayos de inactivación de virus implicados en la adquisición de infecciones nosocomiales.....	143
5.4.1. Estudio <i>in vitro</i> de la actividad virucida de Solprogel® frente al VIH (artículo 6) 143	
5.4.2. Evaluación de la eficacia de Solprogel® frente al VHB (artículo 7)	147
6. CONCLUSIONES	151
6.1. Estudio <i>in vitro</i> de evaluación comparativa de Perasafe® con glutaraldehído alcalino al 2% frente a <i>Mycobacterium</i> spp (artículo 1)	155
6.2. Estudio <i>in use</i> de evaluación de Perasafe® comparado con Cidex® en la desinfección de BFs (artículo 2).....	155
6.3. Evaluación de la actividad micobactericida y tuberculocida de Korsorex®, un detergente-desinfectante (artículo 3).....	156
6.4. Sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes de <i>A. baumannii</i> (artículo 4).....	156

6.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de Virkon® al 1% frente a bacterias, hongos, virus y esporas mediante normativas AFNOR (artículo 5)	156
6.6. Estudio <i>in vitro</i> de la actividad virucida de Solprogel® frente al VIH (artículo 6)	157
6.7. Evaluación de la eficacia de Solprogel® frente al VHB (artículo 7)	157
7. BIBLIOGRAFÍA.....	159
8. ARTÍCULOS	187
8.1. Artículos en los que está basada la tesis	191
8.2. Artículos relacionados con la línea de investigación	227
9. AGRADECIMIENTOS.....	257

RESUMEN

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales son uno de los problemas sanitarios actuales más preocupantes al provocar una elevada mortalidad y morbilidad hospitalaria, así como una gran carga de trabajo para el personal y un elevado coste económico. El uso eficaz de los biocidas, antisépticos y desinfectantes, y de un procedimiento de desinfección correcto de los dispositivos médicos y de superficies, junto con el lavado de manos y las técnicas de barrera, constituyen las medidas más eficaces para la prevención de dichas infecciones nosocomiales.

A pesar de la gran cantidad de ensayos existentes para determinar la actividad antimicrobiana de los biocidas, hoy en día todavía no se dispone de métodos estandarizados y ampliamente aceptados para evaluar la eficacia de los biocidas frente a muchos microorganismos. Por lo tanto, el desarrollo de estudios para la determinación de dicha actividad antimicrobiana y que permitan la selección de productos biocidas eficaces puede suponer una importante mejora en la lucha por impedir la adquisición de infecciones nosocomiales en los centros sanitarios.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido evaluar la actividad micobactericida y tuberculocida, por considerarse un marcador para seleccionar los desinfectantes de nivel intermedio o alto nivel empleados en la reutilización de los dispositivos médicos termosensibles. Para tal fin, se optimizaron ensayos *in vitro* de suspensión cuantitativos y de portagérmenes. Posteriormente, estos ensayos se pusieron en práctica para estudiar la actividad antimicrobiana del ácido peracético al 0.26% (Perasafe[®]) frente a diversas especies del género *Mycobacterium* (*Mycobacterium avium*- *Mycobacterium intracelulare* (MAI), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae*). Por otra parte, se compararon estos estudios con los del glutaraldehído alcalino al 2% (Cidex[®]). También se analizó la influencia de la materia orgánica y de la dureza del agua sobre la actividad antimicrobiana de ambos desinfectantes. Los resultados obtenidos demuestran que Perasafe[®] es micobactericida y tuberculocida (factor de reducción $\geq 5 \log_{10}$) en 20 min. de contacto; mientras que Cidex[®] lo fue en 30 min. de exposición. MAI fue la micobacteria más resistente a la acción de ambos desinfectantes. La materia orgánica y el

agua de dureza estándar redujeron la actividad micobactericida y tuberculocida por lo que los tiempos de exposición se incrementaron.

Un vez confirmada *in vitro* la actividad micobactericida y tuberculocida de Perasafe[®] también demostramos su eficacia en comparación con Cidex[®] para la desinfección de broncoscopios contaminados experimentalmente con *M.tuberculosis* H37Rv y MAI. Estos estudios revelaron que Perasafe[®] y Cidex[®] fueron igualmente eficaces en el procedimiento de desinfección de los BFs tras 10 min. de contacto frente a *M.tuberculosis*, no recuperándose microorganismos viables (cultivos negativos). Frente a MAI, ambos productos consiguieron un factor de reducción logarítmico ≥ 5 en 20 min., aunque con Cidex[®] no se recuperaron micobacterias viables. Así pues, como demuestran los estudios *in vitro* y de “uso simulado”, Perasafe[®], es un desinfectante de alto nivel efectivo frente a micobacterias y constituye una posible alternativa al glutaraldehído alcalino al 2% en la desinfección de BFs.

También se evaluó *in vitro* (estudios de suspensión cuantitativos y de portagérmenes) la actividad antimicrobiana frente a *M.tuberculosis* H37Rv, MAI, *M.kansasii* y *M.chelonae* un nuevo desinfectante del grupo de las aminas denominado Korsolex[®] AF. Korsolex[®] AF demuestra una aceptable actividad biocida frente a todas las micobacterias evaluadas. La concentración del 1% fue eficaz frente a todas las micobacterias ensayadas en 60 min. de contacto, tanto en presencia como en ausencia de materia orgánica. La materia orgánica y el agua de dureza estándar incrementaron el tiempo de exposición requerido. Estos datos sugieren que los productos biocidas que contienen aminas podrían ser útiles en la desinfección intermedia y de alto nivel de los dispositivos médicos.

El género *Acinetobacter*, y principalmente *Acinetobacter baumannii*, destaca por su habilidad para desarrollar y transmitir resistencias antimicrobianas y por ser un patógeno nosocomial emergente difícil de erradicar. Con el objetivo de conocer la sensibilidad a diferentes antisépticos y desinfectantes de *A.baumannii* y establecer la posible relación entre resistencia antimicrobiana a antibióticos y a biocidas, se estudiaron 9 cepas multirresistentes, con adquisición progresiva de la resistencia a los antibióticos betalactámicos, representativas de cuatro clones (A, B, C y D) aisladas del medio ambiente y de diferentes tipos de muestras clínicas en el transcurso de un brote epidémico. Para ello,

se realizó un estudio de suspensión cuantitativo según el *European Standard* EN 1040. Con estos ensayos se puso de manifiesto que todas las cepas de *A.baumannii* aisladas a lo largo del brote epidémico fueron sensibles a todos los antisépticos (Sterillium[®], 2 formulaciones alcohólicas no comercializadas, Hibiscrub[®] y Clorina[®]). Además, los resultados obtenidos confirman que es mejor el empleo de antisépticos que la utilización de jabón convencional (Lifosit[®]) en la eliminación de *A.baumannii* de las manos del personal sanitario. Asimismo, se demostró que todas las cepas bacterianas estudiadas eran sensibles a la acción del ácido peroxigénico (Virkon[®]) e Instrunet superficies[®]. Se comprobó que la resistencia a múltiples antibióticos betalactámicos en cepas de *A.baumannii* no es un factor que se asocie a resistencia o descenso de sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes.

Por otro lado hemos analizado el espectro de actividad antimicrobiana de Virkon[®], por ser un producto cuestionado en nuestro país como desinfectante de alto nivel para la desinfección en frío de broncofibroscopios. Para ello, nos propusimos estudiar *in vitro* (ensayos de suspensión cuantitativos y de portagérmenes) su actividad bactericida, micobactericida, esporicida, fungicida y virucida, siguiendo las normativas AFNOR. Los resultados obtenidos demuestran que Virkon[®] al 1% es un desinfectante de bajo nivel por ser un biocida con efecto antimicrobiano rápido (5 min.) frente a bacterias vegetativas (gramnegativas y grampositivas), levaduras, virus y micobacterias no tuberculosas en ensayos cuantitativos de suspensión, pero bactericida en los ensayos con portagérmenes. Por tanto, Virkon[®] al 1%, al contrario que lo descrito hasta ahora por otros autores, no es un producto alternativo al glutaraldehído alcalino al 2% en la desinfección de alto nivel.

Finalmente, se evaluó la eficacia de un compuesto clorado (Solprogel[®]) frente a virus con envoltura implicados en la adquisición de infecciones nosocomiales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) y el virus de la hepatitis B (VHB). En el primero de estos estudios se determinó la concentración mínima y tiempo de contacto mínimo requerido por el producto para inactivar al VIH-1. La actividad virucida se estableció mediante un ensayo de infectividad en células MT-2 (formación de sincitios y detección de Ag p24 de VIH-1). En el segundo estudio, se evaluó la actividad del mismo compuesto frente al VHB midiendo la inhibición de la actividad de la DNA polimerasa (DNA-P) del virus. En ambos casos la actividad antimicrobiana de Solprogel[®] se comparó con la del dicloroisocianurato sódico (NaDCC).

Los resultados demuestran que Solprogel[®] y NaDCC, a una concentración de 120 ppm y 100 ppm de cloro disponible, respectivamente, inhiben el VIH-1 en 5 min. de contacto. El enzima DNA-P del VHB fue sensible a la inhibición de los dos desinfectantes clorados evaluados. La concentración mínima necesaria de NaDCC y tiempo de contacto mínimo fue de 1.000 ppm de cloro disponible y de 2 min., respectivamente. Solprogel[®] al 16% que contiene 960 ppm de cloro disponible, fue efectivo para inactivar la DNA-P del VHB en un tiempo de exposición mínimo de 2 min. Por tanto, Solprogel[®], por su capacidad de formar un gel en contacto con líquidos y su actividad frente al VIH-1 y VHB es un desinfectante útil para usarlo sobre fluidos y tejidos contaminados con estos virus.

En esta Tesis se proponen varios ensayos para comprobar la eficacia de los biocidas frente a microorganismos para los que no existían todavía normativas estandarizadas. En primer lugar, ensayos *in vitro* para determinar la actividad antimicrobiana frente a micobacterias y la inhibición de la infectividad del VIH-1 y VHB. También se incluye un estudio de “uso simulado” para la desinfección de broncofibroscopios contaminados experimentalmente con micobacterias. Por otro lado, se aporta el hecho de que algunos bacilos gramnegativos multirresistentes a los antibióticos betalactámicos no adquieran resistencia a los biocidas tras uso prolongado de los mismos.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

7H11	Agar 7H11 de Middlebrook suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC).
AENOR	Agencia Española de Normalización
AFNOR	<i>Association Française de Normalisation</i>
AOAC	<i>American Association of Official Analytical Chemists</i>
APIC	<i>Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BF	Broncofibroscopio
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDRH	<i>Center for Devices and Radiological Health, United States Food and Drug Administration</i>
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
CEN	Comité Europeo de Normalización, para España AENOR
CGSB	<i>Canadian General Standards Board</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DGHM	<i>Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine-tetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
ERV	<i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
L-J	Agar Löwenstein-Jensen
Log₁₀	Logaritmo en base 10
LPS	Lipopolisacáridos
MAI	<i>Mycobacterium avium- Mycobacterium intracellulare</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OPA	<i>Ortho-phthalaldehyde</i>
OTC	<i>FDA's Division Over-the-Counter Drug Product</i>
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
QAC	<i>Quaternary ammonium compound</i> , derivados de amonio cuaternario
RNA	Ácido ribonucleico
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
TCDI50	<i>Tissue culture infective dose 50</i>
TFM	<i>FDA Tentative Final Monograph for Healthcare Antiseptic Drug Products</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades infecciosas
VHB	Virus de la hepatitis B
VHBP	Virus de la hepatitis B del pato de Pekín
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN

“Permítame usted que le dé las gracias más cordiales por haberme mostrado con sus brillantes investigaciones la verdad de la teoría de los gérmenes de la putrefacción y por haberme sugerido el principio al cual se debe el éxito de mi sistema antiséptico. Si alguna vez viene usted a Edimburgo, creo que será para usted una verdadera recompensa ver en nuestro hospital el gran beneficio que sus trabajos han producido a la Humanidad”.

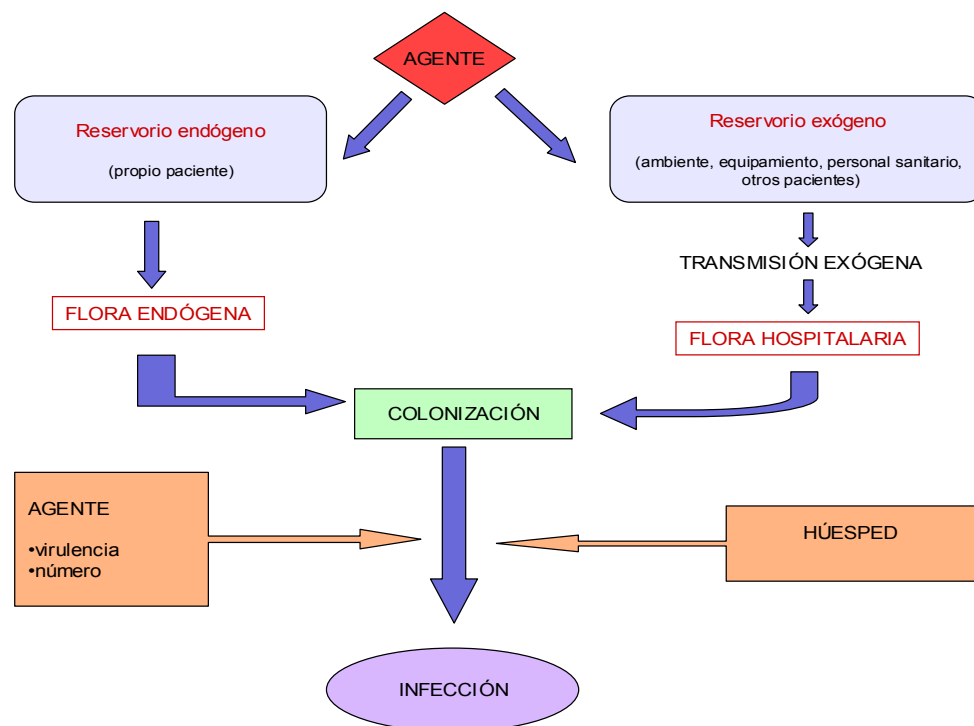
Carta de Joseph Lister a Louis Pasteur

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Papel de los biocidas en el control de las infecciones nosocomiales

Los biocidas, antisépticos y desinfectantes, son ampliamente utilizados en los hospitales y otros centros sanitarios. En particular, una adecuada política de desinfección (uso eficaz de los desinfectantes y de un procedimiento de desinfección correcto de los dispositivos médicos), junto con el lavado de manos y las técnicas de barrera, son las medidas más eficaces para la prevención de las infecciones nosocomiales al actuar sobre los reservorios exógenos que constituyen la flora hospitalaria (figura 1).

Figura 1: Transmisión de infecciones



En los últimos años el interés por la desinfección del instrumental médico y quirúrgico ha aumentado. Junto a un mayor conocimiento de los riesgos que supone una inadecuada desinfección, hay que considerar también el incremento exponencial del número de exploraciones diagnósticas y terapéuticas en pacientes graves e inmunodeprimidos que contribuyen a aumentar el riesgo de adquisición de infecciones nosocomiales. Por otro lado, el incremento, cada vez mayor, del número de pacientes con infección por el virus

inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB) sometidos a estos procedimientos genera también inquietud. Finalmente, hay que señalar el elevado coste económico que suponen para la Sanidad las infecciones nosocomiales. A pesar de este interés actual, diversas comunicaciones sobre casos de infecciones individuales o de brotes epidémicos ponen de manifiesto el irregular cumplimiento de las recomendaciones sobre desinfección de los expertos y la incorrecta realización de las mismas ^{1,2}.

Dentro de la cadena de transmisión de las enfermedades nosocomiales, las manos tienen un papel destacado como vehículo o fuente de infección. Por ello, la reducción de la carga microbiana mediante el lavado de las manos es una de las medidas más importantes y eficaces para prevenir la transmisión de infecciones en los centros sanitarios. Con frecuencia se describen brotes epidémicos, en muchos casos por microorganismos multirresistentes a los antibióticos (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)^{3, 4}, *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (ERV)⁵ y bacterias gramnegativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Kebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter spp*^{6, 7}) que han creado una gran alarma por el elevado riesgo que suponen para los pacientes implicados. La ausencia de seguimiento de las normas de lavado de manos, el incumplimiento de los tiempos de aplicación de las soluciones antisépticas y la utilización de productos poco eficaces para eliminar los microorganismos implicados (ausencia de actividad residual o remanente de los antisépticos) son importantes factores que contribuyen en la transmisión de las infecciones nosocomiales. Las dermatitis ocasionadas por el lavado frecuente y el uso de agentes que irritan y resecan la piel de las manos, es la principal razón que argumentan algunos usuarios para justificar el rechazo al lavado de manos. Las nuevas formulaciones antisépticas con emolientes para la protección de la piel, han facilitado la instauración de protocolos que han contribuido a aumentar la frecuencia del lavado de manos.

Actualmente, existen numerosos productos antisépticos y desinfectantes disponibles en el mercado. Sin embargo, en muchos casos estos productos no cumplen las exigencias de eficacia. Esto es atribuible, en parte, a los diferentes métodos de evaluación usados para determinar su eficacia a nivel internacional y al gran desconocimiento que hay sobre el tema entre el personal sanitario. Una correcta política de desinfección ayudaría a descender la

mortalidad y morbilidad hospitalaria, y reduciría en muchos casos las cargas de trabajo y los costes económicos que suponen las infecciones nosocomiales.

1.2. Reseña histórica sobre los ensayos de actividad biocida

Muchos de los productos biocidas utilizados hoy en día ya eran conocidos por griegos y romanos, mientras que otros fueron introducidos durante la Edad Media. Sin embargo, el auge de estos productos se produjo durante el siglo XIX y primeros años del XX, por el desarrollo de la cirugía, el interés médico y social en reducir el elevado número de infecciones hospitalarias, mejorar la curación de las heridas, el conocimiento científico sobre los microorganismos y su relación con ciertas enfermedades. No obstante, la revolución terapéutica que acompañó la introducción de los antibióticos en medicina hizo que los biocidas fueran olvidados y permanecieran en la sombra, pero la aparición en las últimas décadas de bacterias resistentes a los antibióticos, la emergencia de patologías fúngicas y víricas nuevas y para las que existían limitaciones terapéuticas hizo imponer y actualizar los métodos preventivos para reducir el riesgo de adquisición de las infecciones. Con ello los antisépticos y desinfectantes volvieron a adquirir importancia, no solo en medicina, sino también en otros campos como el veterinario, el industrial y en la conservación de los alimentos (tabla 1).

Aunque los antisépticos y desinfectantes empezaron a ensayarse *in vitro* desde los albores de la Microbiología, los procedimientos para su evaluación no están tan bien definidos como las pruebas para la determinación de la actividad antimicrobiana de los antibióticos. Originalmente, los ensayos se dirigieron al estudio de la cinética de la desinfección, determinándose si los microorganismos eran destruidos por una determinada concentración de desinfectante en un determinado tiempo de contacto. Estudios reseñables en los inicios de los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana de los biocidas fueron los realizados por Bucholtz en 1875, para determinar la CMI del fenol para inhibir el crecimiento de las bacterias; también por Robert Koch, que hizo mediciones del poder inhibitorio del cloruro de mercurio frente a las esporas de *Clostridium anthracis*, y por Geppert en 1889, que utilizó el sulfato amónico como neutralizante del cloruro de mercurio, con resultados más realistas que los obtenidos con anterioridad por Koch ⁸.

Tabla 1: Clasificación de los biocidas (a excepción de los antibióticos) según su utilización

Antisépticos	Desinfectantes	Conservantes
Compuestos fenólicos (hexaclorofeno)	Compuestos fenólicos	Compuestos fenólicos (parabenos)
QACs	QACs	QACs
Compuestos clorados	Compuestos clorados (hipocloritos de sodio y calcio, lejía, cloraminas, ácido isocianurico)	--
Compuestos yodados (tintura de yodo, alcohol yodado,...)	Compuestos yodados	--
Oxidantes (peroxido de hidrógeno)	Oxidantes (peroxido de hidrógeno, ác. peracético,...)	--
Alcoholes (etanol e isopropanol)	--	--
Clorhexidina	--	Clorhexidina y biguanidas
Metales (mercuriales, plata y cobre)	Metales (mercuriales)	Metales (mercuriales)
Aldehídos (taurolidina, noxitiolina)	Aldehídos (formaldehído y glutaraldehído)	--
Colorantes	--	--
Hexamidina	--	Hexamidina
Ác. Bórico	--	--
Tensioactivos aniónicos (jabones y lauril sulfato de sodio)	--	--
--	Compuestos anfóteros	--
--	--	Compuestos ácidos (ác. acético y ácido láctico)

QACs: derivados de amonio cuaternario

Sin embargo, Kronig y Paul publicaron en 1897 ⁸ un estudio que constituye la base de los actuales ensayos al observar: 1) que no todas las bacterias mueren al mismo tiempo, y que esto depende de la concentración del producto y de la temperatura de ensayo; 2) que los desinfectantes pueden ser comparados solo cuando se ensayan bajo condiciones controladas; 3) que el número de bacterias debía ser constante; 4) que los resultados de los ensayos eran más exactos cuando se determinaba el número de supervivientes en placas de cultivo. Así, en 1903, Rideal y Walker ⁹ pusieron en práctica estos principios en su método de coeficiente de fenol para el ensayo de desinfectantes. Estos autores definieron unas condiciones de ensayo, usando bacterias y medios de cultivos concretos. Posteriormente, en 1908, Click y Martin ⁹ modificaron el método anterior con la introducción de materia orgánica en la solución desinfectante. Entre 1965 y 1969 Kelsey et al. ⁹ propusieron los llamados ensayos

de capacidad, en ellos se evalúa la capacidad del desinfectante en permanecer activo tras la incorporación sucesiva de microorganismos.

En 1881, Kock ideó un tipo de método distinto al descrito hasta entonces (ensayos de suspensión), y que tenía por finalidad reproducir en el laboratorio las condiciones reales en las que usaba el producto biocida. Para ello, utilizó hilo de seda impregnado con *Bacillus anthracis*. En base a este estudio se propusieron y publicaron en los años 50 los ensayos con portagérmenes (por ej. AOAC).

Posteriormente, se desarrollaron ensayos cuantitativos para comparar la población microbiana inicial sometida a la acción del biocida con el número de microorganismos supervivientes, tanto para ensayos de suspensión como de portagérmenes. Durante años se crearon grupos de trabajo en distintos países europeos que establecieron sus propios ensayos. Así, en 1960 se publicaron los ensayos del *British Standard* y posteriormente en 1972 los de la DGHM, los ensayos 5-5-5 del *Dutch Comité on Phytopharmacy* y las normativas AFNOR. Éstas últimas fueron las primeras normativas que utilizaron métodos de dilución-neutralización y métodos de filtración.

Actualmente, no existe aún un esquema universalmente aceptado para los ensayos de actividad de los biocidas. No solo cada país tiene sus propios métodos de estudio, o adopta los de otro país, sino que dentro de un mismo país, los métodos de trabajo empleados son diferentes en los distintos campos profesionales de aplicación (alimentación, industria, medicina y veterinaria). Los ensayos más universalmente utilizados han sido los de la AOAC, los de la DGHM y los de la AFNOR.

En el ámbito europeo, el principal avance en el campo de la evaluación de los desinfectantes se produjo a partir de abril de 1990, cuando el CEN creó el *Technical Committee 216* (TC 216) para definir las normas europeas para evaluar la eficacia antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. El objetivo de este Comité es la estandarización de la terminología, requerimientos y metodología, incluyendo la eficacia potencial, las recomendaciones de uso y las condiciones de etiquetado de los antisépticos y desinfectantes químicos, para su aplicación en diferentes áreas de actividad (agricultura, alimentación, industria, medicina y veterinaria). Los estados miembros del CEN, entre los que se

encuentra España, se han comprometido a no publicar ningún estándar nacional que no se adapte a las normas europeas. Existen tres grupos de trabajo que se encargan de elaborar nuevos métodos de ensayo o de adaptar los ya existentes. Éstos grupos son: WG1, medicina humana; WG2, sector veterinario; WG3, uso industrial, doméstico y alimentario. Por otro lado, el Grupo de Trabajo Horizontal tiene la misión de unificar los métodos propuestos por los distintos grupos de trabajo y establecer los métodos comunes en cada uno de los campos de aplicación.

La elaboración de cada norma puede llevar varios años, ya que el borrador elaborado por un grupo de trabajo y aprobado por el Comité Técnico, debe ser examinado por el CEN para pasar a propuesta de estándar europeo (prEN). Ésta, a su vez, ha de ser aprobada por un suficiente número de países miembros para convertirse en estándar europeo (EN). Las normas UNE-EN constituyen la versión española transcrita de las normas europeas.

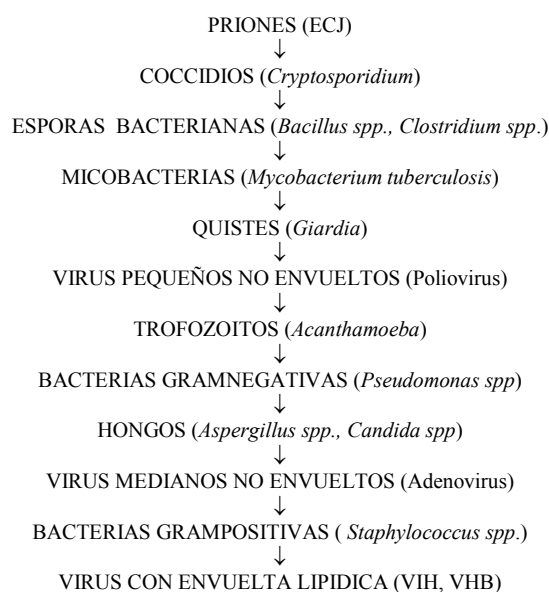
1.3. Niveles de actividad antimicrobiana de los desinfectantes

La desinfección es un proceso que reduce el nivel de microorganismos contaminantes y la materia orgánica presente en los instrumentos médicos y quirúrgicos, pero no elimina todos los microorganismos presentes. Spaulding destacó la importancia de la desinfección y propuso tres niveles o grados de desinfección¹⁰. Estos niveles propuestos (alto, intermedio y bajo) se basan en el hecho de que los microorganismos pueden clasificarse en grupos de acuerdo a su resistencia intrínseca a los desinfectantes químicos. Estos grupos se pueden observar en orden decreciente de resistencia en la figura 2.

La **desinfección de alto nivel** destruye las formas bacterianas vegetativas, los hongos, las micobacterias y los virus, sobreviviendo algunas endosporas bacterianas. Esta menor actividad esporicida es el aspecto que diferencia a la desinfección de alto nivel de la esterilización química. Algunos desinfectantes de alto nivel pueden destruir un elevado número de esporas bacterianas a elevadas concentraciones y un tiempo de exposición prolongado, convirtiéndose así en esterilizantes químicos. Varios productos biocidas se han clasificado en esta categoría, entre ellos se incluyen: el glutaraldehído alcalino al 2% y el peróxido de hidrógeno al 6-8% y varias presentaciones de ácido peracético (tabla 2).

Los **desinfectantes de nivel intermedio** provocan la destrucción de las formas bacterianas vegetativas, los virus lipídicos y los hongos, pero pueden sobrevivir los virus no lipídicos y las micobacterias, así como las esporas bacterianas. Ejemplos de desinfectantes de nivel intermedio son los alcoholes (70-90%), los compuestos clorados y los fenólicos en distintas formulaciones y concentraciones.

Figura 2: Relación de los principales agentes causales de enfermedades infecciosas en orden decreciente de resistencia a los desinfectantes



Entre paréntesis figuran algunos ejemplos característicos.

ECJ: Agente causal de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. VHB: virus de la hepatitis B.

La **desinfección de bajo nivel** elimina las formas bacterianas vegetativas y los virus lipídicos, pero no eliminan, en tiempos prácticos de uso, todas las formas fúngicas, las micobacterias, los virus no lipídicos y las esporas bacterianas. Un ejemplo de desinfectante de bajo nivel lo constituyen los derivados de amonio cuaternario (QACs).

Los dispositivos médicos que se utilizan para el diagnóstico y tratamiento se clasifican en tres categorías de riesgo para los pacientes: **críticos, semicríticos y no críticos**¹¹. El nivel de desinfección usado dependerá en parte de la naturaleza del equipo y de la categoría a la que pertenezca (tabla 3). La desinfección de alto nivel es el mínimo tratamiento que recomiendan los CDC para la desinfección del material semicrítico¹⁰. Si la limpieza es adecuada, la desinfección de alto nivel para endoscopios y BF es efectiva. La desinfección

es un proceso que reduce el número de microorganismos a un nivel que no es peligroso para la salud, por ello la desinfección de alto nivel no necesariamente destruye todas las micobacterias, esporas o priones.

Tabla 2: Niveles de actividad de algunos desinfectantes

Producto	Concentración	Nivel de actividad
Glutaraldehído	> 2%	Intermedio- alto
OPA	0.5%	Alto
Peróxido de hidrógeno	3-6%	Intermedio-alto
Formaldehído	1-8%	Alto- bajo
Ácido peracético	Variable	Alto
Derivados de cloro	500-5.000 ppm de cloro disponible	Intermedio
Alcoholes	70% (etanol e isopropanol)	Intermedio
Fenoles	0.5-3%	Intermedio-bajo
Compuestos yodados	30-50 mg/l	Intermedio-bajo
QAC	0.1-0.2%	Bajo

OPA: ortho-phthalaldehyde

Tabla 3: Clasificación del material o instrumental medico. Niveles de riesgo y niveles de tratamiento requeridos.

Lugar de acceso del instrumental	Nivel de riesgo	Tipo de instrumento	Nivel de tratamiento
Cavidad estéril	Elevado	Crítico	Desinfección de alto nivel
Mucosa	Mediano	Semicrítico	Desinfección de nivel intermedio
Piel del paciente	Bajo	No crítico	Desinfección de bajo nivel

1.4. Requisitos de los biocidas

No todas las propiedades que debería poseer idealmente un biocida (figura 3) las cumplen todos los productos; además éstas pueden variar dependiendo del uso específico del biocida

(dispositivos médicos, superficies medioambientales y piel). Preferentemente, los biocidas deben poseer un amplio espectro de actividad microbiológica, deben ser bactericidas frente a todas las bacterias vegetativas no esporuladas, incluyendo micobacterias. Actualmente, existe un mayor conocimiento sobre la adquisición de infecciones nosocomiales de origen vírico, por lo que se recomienda incluir a los virus en el espectro de actividad de los biocidas de uso más común. Los desinfectantes utilizados en superficies tanto inanimadas como sobre la piel deben poseer una acción microbiocida rápida, al producirse un descenso de actividad bactericida cuando se seca la superficie. Por otro lado, los desinfectantes no deberían ser inactivados por la materia orgánica presente habitualmente en los dispositivos médicos y superficies medioambientales, y por los jabones y el agua corriente empleados durante el proceso de desinfección.

Además existen otras características de operatividad y seguridad no menos importantes, y que deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar los biocidas. Los efectos tóxicos deben ser mínimos para asegurar la protección de los trabajadores. En el caso de los desinfectantes éstos no deben dañar las superficies o dispositivos médicos tratados, por ello la dilución de uso debe ser, si es posible, no corrosiva y cumplir los requisitos específicos para cada situación de empleo, como por ejemplo no dañar las partes plásticas y lentes de los endoscopios flexibles. Sin embargo, muchos de los desinfectantes utilizados hoy en día de forma rutinaria para la desinfección medioambiental y de dispositivos médicos son tóxicos y corrosivos, lo que exige unas condiciones de almacenamiento y uso cuidadosas. En el caso de los antisépticos, éstos no deben dañar la piel por lo que se pueden incorporar aditivos que lo eviten.

Otras características, como que el biocida disponga de un método indicativo para que el usuario conozca si el producto está activo o no en el momento de uso, que sea fácil de utilizar y que sea biodegradable son requisitos a tener en cuenta. Por otro lado, el costo del empleo de biocidas debe ser razonable, para asegurar la previsión de existencias de este tipo de productos en los centros sanitarios.

Figura 3: Requisitos generales de los biocidas



1.5. Mecanismos de acción biocida

La acción de los biocidas es distinta según el tipo de microorganismo, debido a sus distintas características, tanto en composición química como en estructura, fisiología, replicación y metabolismo. Típicamente, los biocidas actúan sobre múltiples puntos o dianas; al afectar a diversos componentes es muy difícil distinguir entre los efectos primarios y secundarios que provocan y que contribuyen a la muerte o destrucción de los microorganismos.

Muchos productos biocidas interaccionan con la superficie celular y una vez en el interior del microorganismo pueden dañar uno o más componentes celulares. Por ejemplo, la clorhexidina y los QACs actúan sobre la membrana citoplasmática de los cocos grampositivos, bacterias gramnegativas y levaduras. Los fenoles ejercen su acción sobre la membrana de las bacterias vegetativas y de los hongos, pero también coagulan los componentes citoplasmáticos. Otras dianas intracelulares de los biocidas son las proteínas y los ácidos nucleicos. El glutaraldehído y el formaldehído actúan sobre las proteínas, el DNA y el RNA bacteriano.

En este apartado, se comentan los mecanismos de acción antimicrobiana de los biocidas usualmente empleados como antisépticos y desinfectantes. Se consideran diferentes tipos de microorganismos (bacterias, hongos, esporas y virus, como más representativos y no se

incluyen parásitos y priones por los pocos datos existentes acerca de sus dianas de acción) y los efectos que pueden causar en ellos los biocidas.

1.5.1. Mecanismos de acción bactericida

En la figura 4 y tabla 4 se resumen los mecanismos de acción bactericida. Estos afectan fundamentalmente a la pared celular, membrana citoplasmática y ácidos nucleicos. Los cambios en la composición de la membrana externa (lipoproteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos) de las bacterias gramnegativas modifican la respuesta de estas bacterias a los biocidas. Otras sustancias como el fenol y la clorhexidina producen daños o rompen la membrana citoplasmática. En el caso de la clorhexidina, a baja concentración ocasiona goteo o escape de componentes intracelulares, en cambio a elevada concentración éste goteo se reduce por la interacción de la clorhexidina con las proteínas citoplasmáticas y los ácidos nucleicos.

Figura 4: Mecanismos de acción bactericida

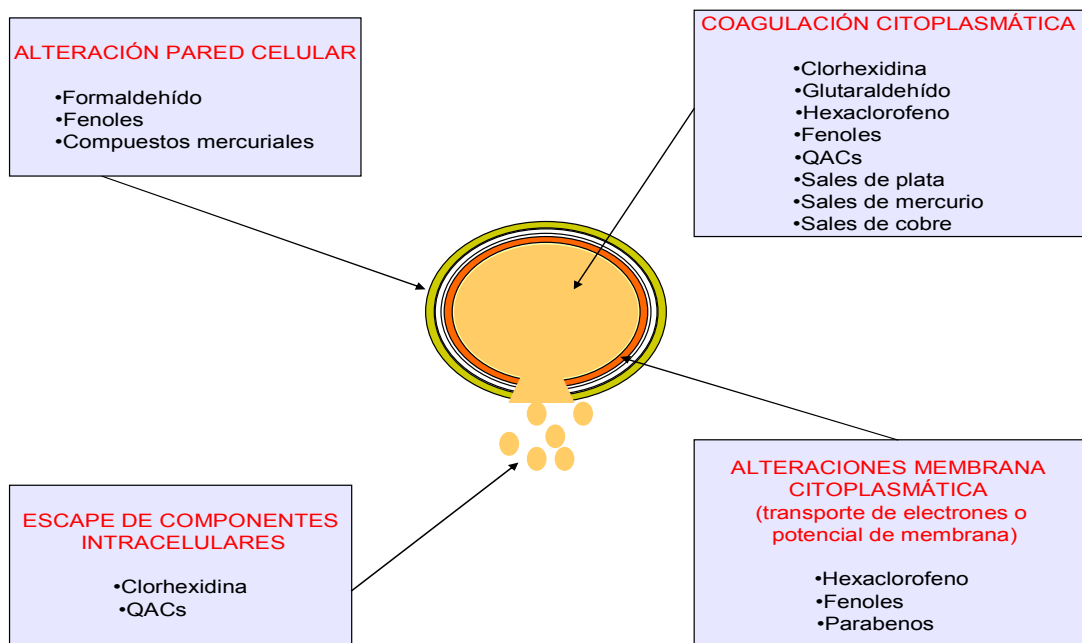


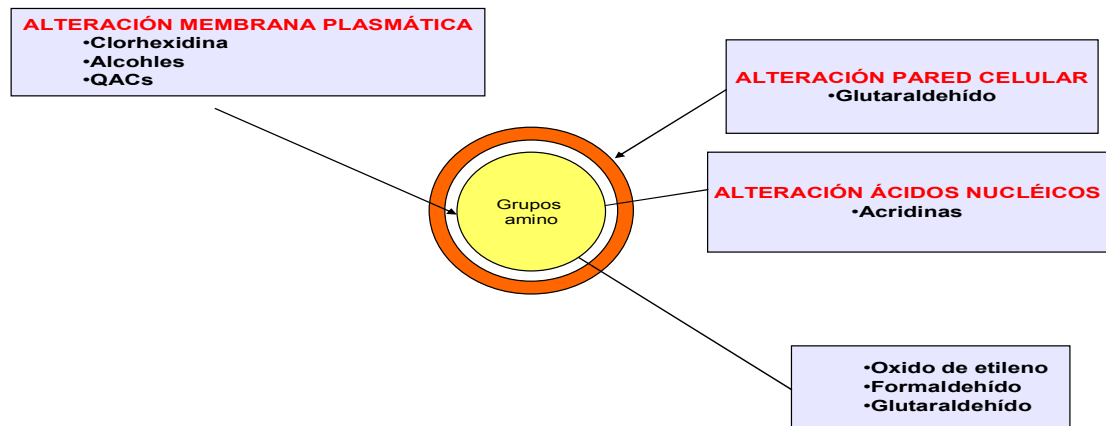
Tabla 4: Mecanismos de acción antibacteriana

Diana	Biocida	Mecanismo de acción
Pared celular y membrana externa	Glutaraldehído	Unión a proteínas
	EDTA	BGN: eliminación de Mg^{+2} , lipopolisacáridos
Membrana citoplasmática	QACs	Daños en la bicapa de fosfolípidos
	Clorhexidina	Bajas concentraciones afectan a la integridad de la membrana, altas concentraciones causan daños en el citoplasma
	Diaminas	Inducción al goteo de aminoácidos
	Fenoles	Goteo
Macromoléculas	Formaldehído	Unión a proteínas, RNA y DNA
	Glutaraldehído	Unión a proteínas de la envuelta celular
DNA	Acridinas	Intercalación de las moléculas de acridina entre los pares de bases del DNA
	Halógenos	Inhibición de la síntesis de DNA
	Peroxido de hidrógeno, iones de plata	Rotura de la hebra de DNA
Interacción con grupos tiol	Compuestos de plata	Interacción de los grupos tiol de los enzimas de la membrana
Compuestos oxidantes	Halógenos	Oxidación de los grupos tiol
	Peroxigénos	Peroxido de hidrógeno: formación de OH^- , oxidación de grupos tiol en enzimas y proteínas Ácido peracético: disrupción de los grupos tiol en proteínas y enzimas

1.5.2. Mecanismos de acción fungicida

En comparación con las bacterias existen muy pocos datos acerca de los mecanismos por los que los biocidas destruyen a los hongos. Se asume que estos mecanismos son similares o idénticos a los de las bacterias vegetativas. Sin embargo, las importantes diferencias estructurales y biológicas entre estos dos grupos de microorganismos hacen que, muy probablemente, esto no sea cierto. Las potenciales dianas de acción en el caso de los hongos son la pared celular, la membrana plasmática, los ácidos nucleicos y las proteínas estructurales o funcionales. El lugar de acción sobre el que actúan un mayor número de biocidas de tipo antifúngico como clorhexidina, QACs y alcoholes es probablemente la membrana plasmática (figura 5).

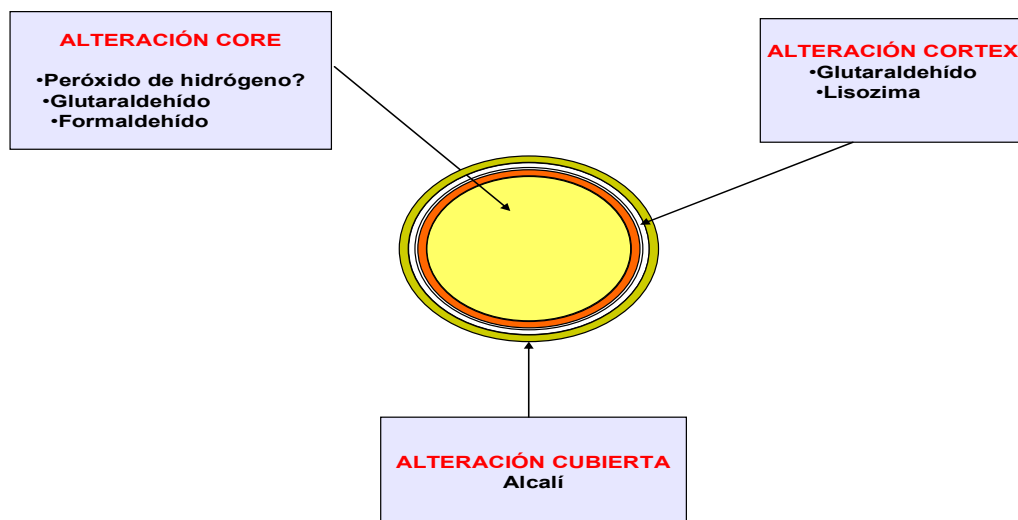
Figura 5: Mecanismos de acción fungicida



1.5.3. Mecanismos de acción esporicida

Existe un amplio número de productos biocidas, pero de estos muy pocos son esporicidas y algunos con actividad bactericida tienen un efecto muy pequeño sobre las esporas bacterianas (figura 6). Estos productos pueden inhibir 3 etapas del ciclo biológico de las esporas: esporulación, maduración y germinación.

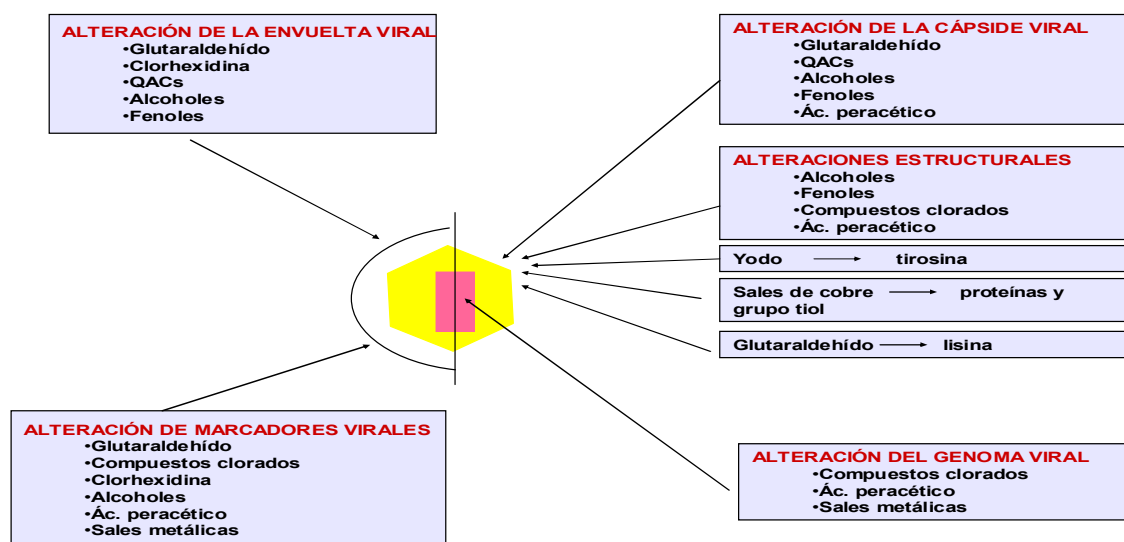
Figura 6: Mecanismos de acción esporicida



1.5.4. Mecanismos de acción virucida

Los virus al no mostrar actividad metabólica, tienen un reducido número de dianas de acción disponibles para los biocidas, siendo éstas de tipo estructural: envoltura, receptores glicoproteicos, cápside y genoma vírico (figura 7). Desafortunadamente, la penetración de los antisépticos y desinfectantes en diferentes tipos de virus y su interacción con los diferentes componentes víricos ha sido muy poco estudiada, aunque se dispone de algunos datos obtenidos con bacteriófagos. Así, se sabe que la exposición repetida del fago f2 de *E.coli* a derivados clorados, incrementa su resistencia a la desinfección.

Figura 7: Mecanismos de acción de los virucidas



La envoltura lipídica es sensible a los agentes de tipo lipofílico como los surfactantes catiónicos del tipo de los QACs, clorhexidina e isopropanol, así como al éter y al cloroformo. En la envoltura existen proteínas (glucoproteínas) que constituyen los receptores celulares específicos del virus y que tienen un papel fundamental en las infecciones víricas. La alteración de estas glucoproteínas conlleva un descenso de la infectividad vírica.

La cápside vírica, predominantemente de naturaleza proteica, sería el lugar de acción del glutaraldehído, hipoclorito y peróxido de hidrógeno. La alteración de la composición proteica influye en la permeabilidad de la cápside, permitiendo la penetración de los

biocidas y liberando el ácido nucléico. La inactivación vírica solo es completa cuando se destruye el genoma vírico.

1.6. Regulación de los biocidas

Gran parte de los antisépticos y desinfectantes usados en los hospitales españoles están comercializados por empresas internacionales que siguen los criterios y regulaciones americanas. Otra parte de los biocidas empleados se fabrican en nuestro país o en los que integran la CEE, y lo hacen con criterios y reglamentación comunitarios o del propio país. Por este motivo, a continuación se comentan brevemente algunos aspectos de la legislación americana y europea sobre biocidas.

1.6.1. Reglamentación en EEUU

Hasta 1996 los biocidas químicos utilizados en sanidad eran regulados por la EPA y la FDA. La EPA exigía a los fabricantes que las formulaciones utilizadas en los hospitales como desinfectantes esterilizantes/desinfectantes de alto nivel utilizaran protocolos específicos para demostrar su actividad antimicrobiana, su estabilidad y su toxicidad para el hombre. Sí además, el producto se comercializaba para su uso con dispositivos médicos debía cumplir las reglamentaciones de la CRDH.

En los primeros años de la década de los 90, la EPA y la FDA firmaron el *Memorandum of Understanding*^{12, 13} en el que se estableció que la FDA adquiriría la responsabilidad de revisar los datos *pre-market* de los desinfectantes considerados como esterilizantes/alto nivel en medicina para la reutilización de dispositivos médicos críticos y semicríticos, estando estos productos a partir de ese momento exentos de la definición de pesticidas y, por tanto, de las regulaciones de la EPA. En este *pre-market* (lista 510 (k)) los fabricantes deben aportar información sobre las propiedades físico-químicas del producto, su actividad micobactericida y esporicida mediante ensayos *in vitro* de la AOAC¹⁴, eficacia microbiológica mediante estudios de “uso simulado” y de uso práctico, biodegradación del producto y de sus residuos, y finalmente la compatibilidad del producto con los materiales que integran los dispositivos médicos.

Además, la FDA regula los compuestos formulados como antisépticos y otros productos usados para inhibir o destruir los microorganismos de la piel, mientras que la EPA tiene una responsabilidad idéntica en el caso de los desinfectantes de uso no médico. En concreto, los productos antisépticos para el lavado de manos están regulados por la división OTC de la FDA y los requerimientos, así como los estudios *in vitro* e *in vivo* a realizar están definidos por la TFM.

En 1998, la FDA propuso la clasificación de los desinfectantes considerados como esterilizantes/alto nivel utilizados en medicina, éstos debían incluirse en la Clase II y los desinfectantes de uso general en la Clase I, excluyendo a estos últimos de ser incluidos en la lista 510 (k). Esta propuesta fue aprobada finalmente en el año 2000¹⁵.

Los CDC, son una agencia que no tiene competencia reguladora sobre los biocidas, no los ensaya ni evalúa, pero si elabora guías de recomendaciones sobre estos productos, los métodos y estrategias de esterilización y desinfección de los dispositivos médicos, superficies medioambientales y las indicaciones del lavado de manos en base a la experiencia del personal sanitario de los hospitales americanos. Estas guías constituyen una herramienta de consulta y de referencia para los hospitales americanos y también para otros muchos países, entre los que se encuentra España, por lo que se actualizan periódicamente.

1.6.2. Reglamentación de los biocidas químicos en nuestro país

La entrada de nuestro país en la CEE, nos obliga a cumplir la legislación que de ella proviene y que, tras un plazo de adaptación, entra en vigor y pasa a ser de obligado cumplimiento. En el ámbito sanitario existen dos tipos de normativas: por un lado las Directivas o legislación aplicable, y por otro las normativas EN, que tienen valor orientativo para el mejor cumplimiento de la Directiva.

Actualmente, la CEE está haciendo considerables esfuerzos por unificar y armonizar las normativas existentes en los diversos países miembros sobre la evaluación de los biocidas. En Francia se utilizaba la normativa AFNOR, en Alemania la DGHM y en el Reino Unido la Kelsey-Seyker. España siempre ha carecido de normativa propia. En 1990 el CEN creó el TC 216 para la estandarización de las pruebas de evaluación de eficacia de los antisépticos y

desinfectantes. Las normativas que dicta este comité facilitan la lectura y composición de los dossiers técnicos de los productos biocidas que se comercializan en Europa.

Los desinfectantes para superficies y material inerte (suelos, mobiliario, paredes,...) no se consideran productos sanitarios y únicamente precisan un registro de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios. A éstos, se les aplica la Ley 3349/1983 para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, modificada por los Reales Decretos 162/1991, 443/1994 y 255/2003.

Por el contrario, los desinfectantes que se utilizan con los dispositivos médicos sí se consideran productos sanitarios y deben llevar la marca CE. La marca CE denota conformidad con los requisitos de la legislación europea (Real Decreto 414/96, transposición de la Directiva del Consejo de Europa 93/42/CEE). En dicha Directiva, los desinfectantes se incluyen en la Clase IIA y se precisa la intervención de un Organismo Notificado que inspeccione y verifique la calidad del producto antes de la otorgación de la marca CE. Las normas EN constituyen la principal referencia para ello, aunque son de cumplimiento voluntario, ayudan al fabricante que las sigue a poder demostrar que cumple con los requisitos esenciales exigidos por la Directiva. Las normas EN no son los únicos procedimientos para acreditar el cumplimiento de los requisitos esenciales de la Directiva, pero el procedimiento elegido debe ser equivalente al que establece la EN para cada tipo de producto.

La situación de los antisépticos es similar. Los antisépticos para piel sana o intacta no se consideran productos sanitarios, pero requieren el registro de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios. En cambio, los que se aplican sobre heridas, mucosas o piel no sana se les considera especialidades farmacéuticas y se les aplica la Ley del Medicamento (Ley 25/1990).

Finalmente, la Directiva del Parlamento y Consejo de Europa 98/8/CE ha sido transcrita recientemente en el Real Decreto 1054/2002 de 11 de octubre de 2002, que regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de los biocidas. El ámbito de aplicación de este Real Decreto incluye en el grupo 1 a los desinfectantes, tanto los biocidas dedicados a la higiene humana como los desinfectantes que se aplican para la

salud pública, pero excluye a los productos que se rigen por la Directiva 93/42/CE. Los objetivos de dicha directiva, entre otros, es el de establecer los principios de autorización, registro y comercialización en el territorio español, coordinación de los principios de evaluación, elaboración de un listado de sustancias activas autorizadas como ingredientes de los biocidas, establecer la documentación común y necesaria de las sustancias activas y de los biocidas. Otro objetivo es el de eliminar las barreras entre los países miembros de la CEE y al mismo tiempo velar por la protección del hombre y del medio ambiente. Según esta directiva para determinar la eficacia y evaluación de los productos biocidas se debe incluir la actividad antimicrobiana, de acuerdo a las normativas UNE-EN publicadas por el TC 216, para poder afirmar que el producto tiene o no actividad bactericida, funguicida, esporicida, micobactericida y virucida. Según el reglamento 1896/2000 de puesta en marcha de la primera fase del programa de desarrollo de la directiva 98/8/CE (artículo 16.2) para el estudio sistemático de las sustancias biocidas, ampliado según el reglamento 1687/2002, se debe elaborar un listado de sustancias activas que puedan ser comercializadas.

Otra de las situaciones que ha creado gran confusión entre los usuarios europeos es la referente al envasado y etiquetado de los productos biocidas porque en muchos envases las instrucciones de uso y dosificación son ambiguas o no se identifica correctamente la sustancia activa y su concentración. Este hecho se ha intentado paliar con varias Directivas Comunitarias: Directiva 67/548/CEE sobre las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias peligrosas (Real Decreto 365/1995); Directiva 88/379/CEE (Directiva 1999/45/CE), sobre las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de los preparados peligrosos (Real Decreto 1078/1993).

1.7. Métodos de evaluación de la eficacia antimicrobiana de los biocidas

Un buen ensayo de evaluación de los biocida debería ser sencillo, cuantitativo, reproducible y riguroso en su diseño. Muchos de los métodos aceptados actualmente por diversas instituciones no cumplen estos requisitos ¹⁶. Además, no solo debe evaluarse la actividad antimicrobiana del desinfectante propiamente, sino su eficacia en una aplicación determinada, dados los múltiples factores que pueden influir en su actividad ¹⁷. Un ejemplo lo tenemos en la evaluación de la desinfección de endoscopios flexibles en razón de la estructura y del material que compone estos equipos y que dificulta su limpieza y

desinfección. Hay múltiples publicaciones que implican a estos equipos como causa de transmisión de infección nosocomial ^{1,7, 18, 19}.

La evaluación antimicrobiana de los biocidas incluye cuatro etapas fundamentales. La **primera etapa** consiste en determinar la actividad antimicrobiana básica del producto, mediante ensayos *in vitro*, enfrentando suspensiones de distintos microorganismos al desinfectante. Posteriormente en una **segunda etapa**, se ha de determinar si el desinfectante posee actividad antimicrobiana en las condiciones que se pueden encontrar en la práctica de la desinfección para un determinado uso (concentración y tiempo de contacto compatibles con el material y la práctica clínica). En una **tercera etapa** se evalúa la actividad del desinfectante mediante un método experimental con el equipo clínico que va a ser utilizado, contaminándolo artificialmente y estudiando la reducción del número de microorganismos por la acción del desinfectante. En una última fase (**cuarta etapa**), el desinfectante se evalúa en la práctica clínica, mediante estudios de campo en los que se controla el resultado de la desinfección. Actualmente, se dispone de algunos métodos oficiales para las dos primeras etapas. Sin embargo, en las dos últimas etapas la estandarización no ha podido aún ser consensuadas.

Dado el amplio número de ensayos disponibles para evaluar la eficacia de los biocidas, su clasificación en función de distintas variables, facilitará la comprensión de los mismos y su utilidad (tabla 5).

Tabla 5: Clasificación de los ensayos para evaluar la eficacia de los desinfectantes

1. *Según el microorganismo evaluado*
 - Determinación de la actividad bactericida
 - Ensayos bactericidas
 - Ensayos micobactericidas
 - Ensayos esporicidas
 - Determinación de la actividad fungicida
 - Determinación de la actividad virucida
2. *Según el tipo de acción*
 - Ensayos bacteriostáticos/ bactericidas
 - Ensayos fungistáticos/ fungicidas
 - Ensayos virostáticos/ virucidas
 - Ensayos esporostáticos/ esporicidas
3. *Según la estructura del ensayo*
 - Ensayo *in vitro*
 - Ensayos de suspensión

- Ensayos de capacidad
- Ensayos de portagérmenes
- Ensayos prácticos
 - Determinación de la eficacia en desinfección de superficies, instrumental, manos...
- Ensayos *in use*

4. Según el objetivo del ensayo

- Primer estadio: Ensayos preliminares, ensayos de cribaje
 - Ensayos para determinar actividad antimicrobiana
 - Ensayos para determinar tiempos de exposición y dilución del desinfectante
 - Ensayos para determinar la influencia de la materia orgánica y otras sustancias interferentes
- Segundo estadio
 - Ensayos para determinar la dilución “en uso” del desinfectante para una determinada aplicación
- Tercer estadio
 - Ensayos de campo (ensayos “en uso”)
 - Estudios de efectividad clínica

5. Clasificación del CEN/TC 216

- Fase 1: Ensayos para determinar actividad antimicrobiana: Ensayos de suspensión básicos
- Fase 2/ etapa 1: Ensayos para determinar la actividad antimicrobiana específica para una determinada aplicación: Ensayos de suspensión amplificados
- Fase 2/ etapa 2: Ensayos para determinar la actividad antimicrobiana en condiciones similares a la práctica (lavado de manos, frotación de manos, desinfección de superficies,...)
- Fase 3: Ensayos de campo (ensayos “en uso”)

1.7.1. Métodos *in vitro*

A pesar de sus limitaciones, los métodos de estudio *in vitro* son indispensables para evaluar la actividad antimicrobiana de las moléculas consideradas como posibles antisépticos y/o desinfectantes.

1.7.1.1. Ensayos de suspensión

El esquema básico de los ensayos de suspensión, consiste en mezclar un determinado inóculo microbiano con una determinada dilución de desinfectante y después de un tiempo de contacto, transferir alícuotas de la mezcla microorganismos-desinfectante a un medio que contenga el neutralizante del desinfectante. Estos ensayos pueden ser cualitativos (cuando se detecta presencia o ausencia de microorganismos supervivientes en los subcultivos) o cuantitativos (cuando se realiza el recuento del número de microorganismos supervivientes con respecto al inóculo inicial). Los ensayos cualitativos fueron muy utilizados en el pasado, pero actualmente se prefieren los ensayos cuantitativos porque dan una información de mayor utilidad. Mediante estos ensayos se puede determinar la reducción del inóculo inicial conseguida por el desinfectante en una determinada dilución y en un determinado tiempo de contacto. Estos ensayos pueden realizarse con varias concentraciones del desinfectante y

con distintos tiempos de contacto, en presencia o ausencia de materia orgánica y con diferente dureza del agua. Todos estos factores influirán en los resultados.

La recuperación de los microorganismos puede realizarse por cultivo directo en un medio sólido o por filtración sobre membrana. El recuento por cultivo directo (cultivo en masa o en superficie) es el utilizado habitualmente y resulta menos engorroso, pero requiere la neutralización del desinfectante y por tanto ensayos previos para determinar cual es el neutralizante ideal para cada caso; son los denominados ensayos de dilución-neutralización. Cuando no se halla un neutralizante adecuado para el desinfectante, se puede recurrir a la técnica de filtración sobre membrana para el recuento de microorganismos viables.

El número de microorganismos supervivientes en los subcultivos se compara con el número de microorganismos presentes en un control en el que el desinfectante se sustituye por agua destilada estéril u otro tipo de diluyente. La tasa de reducción logarítmica o efecto biocida es la diferencia entre el logaritmo en base 10 del número de unidades formadoras de colonias (ufc) recuperadas en el control y el número de ufc recuperadas después de la exposición con el desinfectante. La reducción logarítmica exigida en los diferentes ensayos de suspensión cuantitativa está comprendida entre 3 y 5 \log_{10} , en función fundamentalmente de los microorganismos de ensayo. El ensayo básico de actividad bactericida europeo del CEN ²⁰ requiere una reducción de 5 \log_{10} en 1 min. de contacto, las pruebas de actividad esporicida básica ²¹ y los de actividad fungicida ²² requieren una reducción de 4 \log_{10} en un tiempo máximo de 120 y 60 min. a 20°C, respectivamente (tabla 6).

Los ensayos de suspensión cuantitativa pueden realizarse en ausencia o presencia de sustancias interferentes en función de la finalidad de la prueba. Así, los ensayos de actividad bactericida y fungicida básicos (fase 1/ etapa 1) del CEN, EN 1040 ²⁰ y 1275 ²², se realizan en ausencia de sustancias interferentes, mientras que los EN 1276 y EN 1650 correspondientes a la fase 2/ etapa 1, se realizan en condiciones simuladas "limpias" (niveles mínimos de materia orgánica) y en condiciones simuladas "sucias" (condiciones representativas de superficies con materia orgánica) ^{23, 24}. En estas pruebas la dilución del desinfectante se hace en agua dura, y se requiere una disminución de 5 \log_{10} en 5 min. de contacto a 20°C.

Tabla 6: Normativas EN de actividad biocida para desinfectantes químicos. Normas en vigor, proyectos y normativas pendientes de elaboración

	Sector médico	Sector veterinario	Sector agroalimentario, industrial, doméstico y colectivo
Normativas básicas Fase 1	<ul style="list-style-type: none"> • EN 1.040: Actividad bactericida básica • EN 1.275: Actividad fungicida básica • Pr EN 14.347: Actividad esporicida básica • PrEN 12.353: Conservación de cepas microbianas utilizadas para la determinación de la actividad bactericida y fungicida. 		
Normativas Fase 2/ etapa 1 (ensayos de suspensión)	<ul style="list-style-type: none"> • PrEN 13.713: Actividad bactericida de desinfectantes de superficie. • PrEN 13.623: Actividad bactericida frente a <i>Legionella pneumophila</i>. • PrEN 14.476: Ensayo cuantitativo de suspensión de actividad virucida. • Actividad fungicida. • Actividad esporicida • PrEN 14.348: Ensayo cuantitativo de actividad micobactericida de desinfectantes de DM • PrEN 13.727: Ensayos cuantitativos para la evaluación de la actividad bactericida de desinfectantes de DM • PrEN 13.624: Ensayo cuantitativo de actividad fungicida de desinfectantes de DM. • Desinfectantes para DM. Actividad esporicida. • PrEN 12.353: Ensayo cuantitativo para la evaluación de actividad fungicida de productos para el lavado y tratamiento por frotación higiénico y quirúrgico. 	<ul style="list-style-type: none"> • EN 1.656: Actividad bactericida para antisépticos y desinfectantes... • EN 1.657: Actividad fungicida para antisépticos y desinfectantes. • Pr EN 14.204: Ensayo cuantitativo para la evaluación de actividad micobactericida para antisépticos y desinfectantes. • PrEN 14.675: Ensayo cuantitativo de evaluación de la actividad virucida de antisépticos y desinfectantes. 	<ul style="list-style-type: none"> • EN 1.276: Actividad bactericida. • EN 1.650. Actividad fungicida. • PrEN 13.704: Ensayo cuantitativo para la evaluación de la actividad esporicida. • PrEN 13.610: Ensayo cuantitativo para la evaluación de la actividad virucida frente a bacteriófago para antisépticos y desinfectantes.
Normativas de aplicación Fase 2/ etapa 2 Simulación de condiciones practicas	<ul style="list-style-type: none"> • Desinfectantes de superficie • PrEN 14.561: Ensayo de portagérmenes cuantitativo para la evaluación de la actividad bactericida para desinfectantes de DM. • PrEN 14.562: Ensayo de portagérmenes cuantitativo para la evaluación de la actividad fungicida para desinfectantes de DM • PrEN 14.563: Ensayo de portagérmenes cuantitativo para la evaluación de la actividad micobactericida para desinfectantes de DM • Desinfectantes de DM. Actividad esporicida. • Desinfectantes de DM. Actividad virucida. • Ensayos de suspensión cuantitativos para la evaluación de la actividad micobactericida en desinfectantes de DM. 	<ul style="list-style-type: none"> • PrEN 14.349: Ensayo cuantitativo de superficie para la evaluación de actividad bactericida de antisépticos y desinfectantes. 	<ul style="list-style-type: none"> • PrEN 13.697: Ensayo cuantitativo de superficies para la evaluación de la actividad bactericida y fungicida.

DM: dispositivo médico; Pr: proyectos

1.7.1.2. Ensayos con portagérmenes

Los ensayos de portagérmenes suponen una mayor aproximación a la práctica de la desinfección que los ensayos de suspensión, ya que utilizan pequeñas piezas de distintos materiales que simulan instrumental o equipo clínico. El principio de estas pruebas consiste en contaminar los portagérmenes, desinfectarlos con la dilución de uso del desinfectante y determinar si los microorganismos han sido destruidos. A diferencia de los ensayos prácticos que utilizan instrumental o equipo clínico, los portagérmenes no son instrumentos clínicos reales sino objetos estandarizados.

La inapropiada naturaleza de los portagérmenes es la mayor fuente de variabilidad en los resultados, aumentando este problema con la reutilización de los mismos, bien por una incorrecta limpieza, o por el posible deterioro¹⁶. La rugosidad de las superficies interna y externa, así como pequeñas grietas o concavidades en la superficie del portagérmen pueden suponer una mayor carga microbiana y proteger a las bacterias de la acción del desinfectante^{25, 26}.

Al igual que los ensayos de suspensión las pruebas con portagérmenes pueden ser cualitativas o cuantitativas. En los ensayos cualitativos se utiliza un número de portagérmenes contaminados con un determinado inóculo y se exige la eliminación de los microorganismos en una determinada proporción de los mismos. Los ensayos de la AOAC son de este tipo. La actividad bactericida exige un resultado de ≤ 2 portagérmenes (≤ 3 si el microorganismo ensayado es *P.aeruginosa* ATCC 15442) de 60 ensayados, en 10 min. de desinfección. La actividad esporicida permite 1 solo fallo de 60 de los portagérmenes probados, también en 10 min. de desinfección, y para demostrar la actividad tuberculicida se deben ensayar 10 portagérmenes, no permitiéndose ningún fallo¹⁷.

En el caso de los ensayos cuantitativos, se debe demostrar la reducción logarítmica en los portagérmenes desinfectados respecto al porta germen control. Las pruebas de portagérmenes de la AFNOR son de este tipo. El ensayo NF T72-190, (Determinación de la actividad bactericida, fungicida y esporicida por el método de portagérmenes)²⁷ requiere una disminución de 5, 4 y 3 logaritmos para la actividad bactericida, fungicida y esporicida respectivamente, en presencia de materia orgánica, utilizando 3 portagérmenes para cada ensayo y en un tiempo de desinfección acorde con la actividad presuntiva.

1.7.2. Métodos que simulan condiciones reales: ensayos prácticos

Estas pruebas corresponden a un tercer estadio en la evaluación de los desinfectantes. Una vez que, por medio de las pruebas preliminares, se ha determinado la actividad biocida del desinfectante, la concentración activa y el tiempo requerido, los ensayos prácticos tienen como objetivo verificar que la dilución de uso y el tiempo propuesto son adecuados en situaciones similares a la práctica real, en las mismas condiciones y con el material que será objeto de la desinfección. Tienen la ventaja de que son ensayos experimentales que se desarrollan en el laboratorio, y que por tanto, son susceptibles de una cierta estandarización.

Los ensayos con portagérmenes pueden considerarse ensayos prácticos, en la medida que distintos portagérmenes simulan instrumental, superficies y tejidos, aunque, en sentido estricto, solo deberían considerarse ensayos prácticos aquellos que utilizan instrumental o equipo clínico real para evaluar la eficacia del desinfectante.

1.7.2.1. Ensayos para la desinfección de superficies

La eficacia de la desinfección de una superficie dependerá en gran medida de que la superficie esté limpia o sucia y de la cantidad y tipo de materia orgánica presente ²⁸. El ensayo de portagérmenes NF T72 190 de la AFNOR ²⁷, puede considerarse una prueba práctica para superficies. Las guías de la DGHM también tienen un ensayo práctico (para desinfección de superficies, bien para aplicación por frotación o por spray, que utiliza como objetos a contaminar baldosas estándar de quirófanos o piezas de PVC para suelos ¹⁷. Los microorganismos contaminantes son cepas ATCC de *E.coli*, *S.aureus* y *P.aeruginosa*. Se utiliza un inóculo estandarizado para la contaminación y después de 90 min. de secado a temperatura ambiente, se aplica un volumen conocido de desinfectante que cubra la superficie o pulverice el desinfectante sobre las piezas contaminadas. Una pieza es pulverizada con agua destilada estéril en lugar de desinfectantes como control de la prueba. El desinfectante se deja actuar distintos tiempos de contacto (de 15 min. a 4 horas) y se determinan los microorganismos supervivientes, bien sumergiendo las piezas en caldo de cultivo o mediante placas de contacto.

El CEN/TC 216 ha desarrollado nuevos ensayos para evaluar la desinfección de superficies ^{29, 30}, que realmente son ensayos de portagérmenes con piezas circulares de acero inoxidable

de 2 cm de diámetro y una hora de secado a 37°C del inóculo bacteriano. El ensayo ha demostrado buena reproductibilidad, pero precisa futuras revisiones ^{17, 31}.

1.7.2.2. Métodos de evaluación de la eficacia del proceso de desinfección del instrumental médico

Los ensayos de “uso simulado” y los “en uso”, cuando se combinan con los datos obtenidos en los estudios *in vitro*, proporcionan una evaluación completa de la eficacia y potencia de acción de un producto desinfectante. En estos ensayos es importante poder recuperar el 90% del inóculo inicial de microorganismos para que el procedimiento sea reproducible y los resultados que se obtengan correctos. En los ensayos de “uso simulado” se debe incorporar al inóculo materia orgánica para que los métodos se asemejen a las condiciones que se producen en la práctica clínica.

Es importante realizar un número suficiente de experiencias y obtener también un número elevado de muestras tras el inóculo, lavado y desinfección del material o instrumental para que los resultados sean fiables. Asimismo, se debe eliminar la posibilidad de obtener resultados falsos negativos causados por la actividad biocida remanente del desinfectante en la superficie del objeto inanimado y trasladado al medio de recuperación. Para evitar este hecho es conveniente incorporar un neutralizante al caldo de cultivo que se utiliza para la obtención de las muestras.

Para evaluar la eficacia de los biocidas se debe tener en cuenta si el producto es un desinfectante de alto nivel o un esterilizante. En EEUU, según la FDA un producto será adecuado para realizar un procedimiento de desinfección de alto nivel si es bactericida, fungicida, esporicida incluyendo dos tipos de superficies (cilindros de porcelana e hilo de sutura), virucida y tuberculicida. En el caso de los productos esterilizantes, la FDA exige los mismos ensayos que para los productos de alto nivel con la salvedad de que los tiempos de contacto son mayores.

En Europa, el CEN TC 216 ha elaborado los ensayos que deben realizarse a los productos biocidas que se utilizan para la desinfección de los dispositivos médicos y que se rigen por la directiva 93/42/CEE. Estas normativas incluyen la actividad bactericida ³², fungicida ³³ y micobactericida ³⁴, pero quedan pendientes las de actividad esporicida y virucida.

Previamente los productos han tenido que pasar los ensayos básicos de actividad para esta aplicación³⁵⁻³⁷.

La clasificación de material o instrumental médico, así como el nivel de riesgo y el tipo de procedimiento de desinfección que se debe realizar con ellos se ha indicado previamente en la tabla 3. Para la desinfección de nivel intermedio y alto, una etapa importante del procedimiento es la limpieza o lavado del instrumental (manual o automático). A pesar de la importancia de la limpieza, aún no existe en Europa ni en EEUU un procedimiento *in vitro* que evalúe la eficacia de la limpieza. El objetivo de la limpieza del material o del instrumental médico es la de eliminar la materia orgánica, prevenir la formación de *biofilms* y reducir la carga microbiana inicial. Esta limpieza se puede realizar combinando la acción físico-química de un detergente con la acción mecánica de arrastre por cepillado o aspersion con agua. El nivel de contaminación existente en el instrumental médico después de la limpieza ha de ser el más bajo posible para asegurar el proceso de desinfección posterior. El proceso de limpieza se debe realizar tras la etapa de pre-desinfección y antes de la etapa de desinfección.

1.7.2.2.1. Ensayos de “uso simulado” o de contaminación experimental de instrumentos

Los estudios de “uso simulado” sirven para establecer un adecuado margen de seguridad al emplear un producto para dispositivos médicos. El diseño de algunos instrumentos (tamaño del lumen, tipo de material,...) hace muy difícil una adecuada y exhaustiva limpieza, favoreciendo la formación de *biofilms* en el interior de los instrumentos. Ciertos instrumentos semicríticos utilizados en el medio hospitalario, como los endoscopios flexibles, deben soportar un procedimiento de desinfección de alto nivel. Este tipo de ensayos puede ayudar a definir las condiciones y tiempo de contacto de este tipo de procedimientos. Los ensayos de “uso simulado” se realizan para tener en cuenta los siguientes factores:

- El producto desinfectante ha de penetrar en todas las áreas, incluso las más difíciles, para que entre en contacto con los microorganismos. La cantidad de microorganismos o inóculo en el material o instrumental médico y su eliminación mediante lavado determinaran la recomendación de uso del desinfectante.

- Se pueden dar cambios de actividad biocida al incorporar materia orgánica o inorgánica junto con el inóculo de microorganismos.
- Con respecto a la recuperación de microorganismos supervivientes los medios de cultivo deben ser capaces de: a) recuperar un número mínimo de microorganismos, comprendidos entre 10 a 100 ufc; b) el periodo de incubación debe ser adecuado para la obtención de los microorganismos; c) el neutralizante elegido no debe tener ningún efecto bactericida ni bacteriostático y no interferir en la actividad del desinfectante.
- El desinfectante también debe ser compatible con el producto que se utilice para el lavado o descontaminación del instrumental.
- Comprobar la compatibilidad del material que se recomienda con instrumental que contenga ese tipo de material.

Los aldehídos (formol, glutaraldehído,...) no deben formar parte de los compuestos utilizados para el lavado o descontaminación del instrumental al fijar las proteínas y ser inhibidos por la materia orgánica. Desde la aparición de los priones, en algunos países europeos se ha eliminado completamente el uso de aldehídos como descontaminantes.

A continuación se detallan algunos de los principales estudios de “uso simulado” realizados en los últimos años frente a diversos microorganismos (tabla 7).

Tabla 7: Evaluación de la eficacia de los biocidas de alto nivel para la desinfección de endoscopios contaminados. Principales estudios de “uso simulado” realizados en los últimos 6 años

Estudio	Microorganismos	Tipo de endoscopio	Desinfectante	Conclusiones
Bradley et al. 1995 ³⁸	<i>P.aeruginosa</i> <i>S.aureus</i> <i>B.subtilis</i>	Endoscopio	AP al 0.2%	No-detección bacteriana, aunque se hallan <10 esporas de <i>B.subtilis</i> .
Deva et al. 1996 ³⁹	VHBP	Laparoscopios,	GA al 2%	No existe buena correlación entre la PCR de DNA de VHBP y la transmisión de la infección <i>in vivo</i>
Tsuji et al. 1999 ⁴⁰	Bacterias vegetativas y virus	Endoscopios digestivos	Agua electrolítica y NaCl al 0.05% a pH=2.7	Proceso de desinfección que incluye 5 min. de contacto con el desinfectante. No se detectan supervivientes.
Chanza et al. 1999 ⁴¹	VHC	Endoscopio	--	No-detección de RNA de VHC tras el

				proceso de desinfección.
Cronmiller et al. 1999 ⁴²	<i>Helicobacter pylori</i>	Endoscopio	GA al 2% AP (Steris System®)	No detección
Middleton et al. 2000 ⁴³	<i>M.tuberculosis</i> MAI <i>M.chelonae</i>	Broncoscopio	PH al 7% GA al 2%	Para PH se consigue en 5 min. > 6 log10 para <i>M.tuberculosis</i> y >5 log10 para MAI. Para GA se consigue en 10 min. 4 log10 para <i>M.tuberculosis</i> y MAI.
Folliente et al. 2001 ⁴⁴	<i>M.chelonae</i>	5 colonoscopios 5 duodenoscopios	GA al 2% PH al 7% AP al 0.2% Alcohol isopropílico al 70%	El tiempo de exposición para GA debe ser de 20 min. a 20°C; para PH de 30 min. a 20°C; para AP de 12 min. a 50-56°C, y de 20 min. a 20°C para el alcohol.

GA: Glutaraldehído alcalino. AP: Ácido peracético. PH: Peróxido de hidrogeno. VHBP: Virus de la hepatitis B del pato de Pekín.

1.7.2.2.2. Estudios de campo (ensayo “en uso”)

El objetivo último de la desinfección es la prevención de la transmisión de infecciones nosocomiales y de las contaminaciones. Por tanto, la evaluación más válida de un desinfectante sería demostrar el cumplimiento de este objetivo. Sin embargo, es prácticamente imposible evaluar la eficacia de los desinfectantes utilizando este criterio. Diversos factores influyen en la aparición de la infección, pero solo unos pocos pueden ser identificados y evaluados; no sería factible diseñar un estudio comparativo en el que la única variable fuera el desinfectante utilizado ¹⁷.

En general, este tipo de estudios, se realizan bajo condiciones de uso clínico con múltiples tipos de instrumental (distintas superficies) y con la ayuda del personal que realiza los procedimientos de limpieza y desinfección de acuerdo con los protocolos hospitalarios específicos para la reutilización de cada tipo de dispositivo médico. El personal que interviene en la realización de este tipo de ensayos debe seguir las indicaciones del fabricante del producto desinfectante, utilizar soluciones o diluciones del producto recién preparadas y no emplear procedimientos extraordinarios de preparación del material antes del uso del biocida.

Estos estudios constituyen el último estadio en la evaluación de los desinfectantes. Suponen la evaluación del conjunto del proceso de desinfección bajo las condiciones de uso real (dilución del desinfectante, instrumental o equipo médico, tipo de superficies,...). Su mayor utilidad es la evaluación de los desinfectantes de alto nivel para equipo semicrítico, fundamentalmente endoscopios flexibles ⁴⁵⁻⁴⁹. Múltiples factores que influirán en el resultado final de la desinfección podrán evidenciarse, en mayor o menor medida, en los estudios “en uso”. Como ejemplos, la estabilidad de la solución desinfectante a lo largo de la jornada de trabajo, el grado de afectación por restos de materia orgánica "real", o la tensión superficial del desinfectante que favorece o dificulta la puesta en contacto con toda la superficie interior de los canales del endoscopio.

Las guías APIC para la prevención y control de la infección en endoscopia flexible ⁴⁹, describen la forma de muestrear los endoscopios. Deben muestrearse los diferentes canales (canal de biopsia/succión, y en el caso de la endoscopia digestiva, canal aire/agua), siendo preferible el método del cepillado por su mayor sensibilidad, y debe utilizarse un caldo de cultivo con un neutralizante previamente validado para el desinfectante. Este tipo de ensayos se realizan a menudo en algunos servicios hospitalarios, pero generalmente no se publican y solo constan como una evaluación interna. Por ello, es difícil encontrar ensayos de evaluación de este tipo, no obstante en la tabla 8 se presentan algunas de estas evaluaciones.

Tabla 8: Evaluación de la eficacia de los biocidas de alto nivel para la desinfección de endoscopios. Principales estudios “en uso” realizados en los últimos años.

Estudio	Tipo de endoscopio	Desinfectante	Comentario
Tsuji et al. 1999 ⁴⁰	Endoscopio	Agua electrolítica y NaCl al 0.05% a pH=2.7	Se detecta mediante PCR <i>Helicobacter pylori</i> y VHC
De la Peña et al. 1999 ⁵⁶	15 gastroscopios y 15 colonoscopios	GF y PH	No-recuperación de microorganismos
Chaufour et al. 1999 ⁵⁷	Angioscopio (utilizando patos de Pekín infectados por VHBP)	GA al 2%	Transmisión de VHBP en el 70% de los casos tras la desinfección, pero sin limpieza. Cuando se utiliza el desinfectante durante 20 min. de contacto solo se da un 2% de casos de transmisión
Vesley et al. 1999 ⁵⁸	Gastroscopios y colonoscopios	GA al 2% y AP	El AP es más efectivo en 20-25 min. de contacto que GA en 45 min.

GA: Glutaraldehído alcalino. GF: Glutaraldehído fenolado. AP: Ácido peracético. PH: Peróxido de hidrogeno. VHBP: Virus de la hepatitis B de pato de Pekín.

El objetivo de la desinfección de alto nivel es la eliminación de bacterias, hongos, virus, micobacterias y gran parte de las esporas bacterianas. Sin embargo, el criterio de aceptabilidad de la desinfección de alto nivel en los estudios “en uso” es la ausencia de crecimiento de microbiano^{49, 50, 51}. Algunos autores han investigado la presencia de diferentes grupos de microorganismos (bacterias, micobacterias, virus, hongos e incluso parásitos) en los endoscopios para la evaluación de la desinfección⁴⁷. La demostración de la eliminación de la flora bacteriana aeróbica, procedente de la mucosa digestiva o del tracto respiratorio, según el tipo de endoscopia, garantiza la eliminación de la mayoría de los microorganismos potencialmente patógenos que puedan encontrarse y ser vehiculizados por el endoscopio. En principio, los microorganismos patógenos estarán en concentración inferior a la flora habitual de las mucosas, y en segundo lugar, a excepción de las micobacterias y de los virus pequeños sin envuelta, tendrán una resistencia similar o inferior que la flora bacteriana antes aludida. Así, la ausencia de flora bacteriana aerobia en un endoscopio desinfectado, por ejemplo un colonoscopio, cuya carga en enterobacterias y estreptococos previa a la desinfección se estima superior a 10^6 ufc, garantizará la eliminación de los virus con envuelta (HIV, VHB, VHC), más sensibles a los desinfectantes^{45, 52}.

Sin embargo, las micobacterias escapan a esta afirmación, por presentar un grado mayor de resistencia a los desinfectantes⁵². Por esta razón, la actividad micobactericida es evaluada separadamente mediante ensayos prácticos de “uso simulado”, como último estadio de evaluación⁵³⁻⁵⁵. Tanto en el caso de los desinfectantes de alto nivel como en los productos esterilizantes, la FDA exige la no-recuperación de micobacterias o de esporas bacterianas tras la realización de los ensayos “en uso”. Si se recuperan microorganismos supervivientes, se deben analizar todas las posibles causas que conlleven al fallo del ensayo y reevaluar el biocida con otras condiciones de exposición.

1.8. Actividad antimicrobiana de los antisépticos

Dentro de la cadena de transmisión de las infecciones, las manos tienen un papel destacado como vehículo o como fuente de infección por depositar microorganismos en áreas de

posible colonización y/o infección, como pueden ser ciertas zonas corporales de los pacientes, fármacos, superficies medioambientales o alimentos. Unas medidas eficaces de prevención pueden interrumpir esta cadena no solo eliminando o destruyendo la flora cutánea transitoria o residente, sino también retrasando el restablecimiento de la flora residente.

1.8.1. Flora microbiana de la piel

La flora microbiana cutánea está constituida por los microorganismos que residen y se multiplican en la piel (flora residente) y los microorganismos que contaminan la piel de forma ocasional, bien sean microorganismos patógenos o no (flora transitoria). La flora residente incluye especies de bacterias grampositivas de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*. Los estafilococos plasmocoagulasa negativa son especialmente predominantes en la piel y, principalmente *Staphylococcus epidermidis*. Estas especies pueden actuar como patógenos oportunistas causando infecciones asociadas a procedimientos médicos. *Staphylococcus aureus* y algunas corinebacterias pueden ser colonizantes de la piel, especialmente en las manos del personal sanitario. También se pueden encontrar entre la flora residente de la piel levaduras como *Candida albicans*.

La composición de la flora transitoria de la piel no es constante y depende de las personas, las cavidades corporales colonizadas y de la capacidad de supervivencia de los microorganismos. Este tipo de flora no se multiplica en la piel y se elimina, usualmente, en unos días. Al contrario que la flora residente, este tipo de flora puede eliminarse fácilmente de la piel mediante lavado. Los microorganismos que constituyen la flora transitoria son los que mayoritariamente causan las infecciones nosocomiales, bien por contacto directo o indirecto. Algunas especies son patógenos oportunistas, entre ellas cabe destacar las bacterias gramnegativas como *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* y *P. aeruginosa*.

Los antisépticos se utilizan principalmente para la desinfección de la piel, más en concreto para la desinfección de las manos, ya que están involucradas en la transmisión de microorganismos patógenos y no patógenos en el medio hospitalario. Es esencial conocer la

ecología de las poblaciones bacterianas que colonizan la piel para desarrollar métodos de evaluación de antisépticos más acordes con la realidad. La piel es una superficie dinámica con células que continuamente son eliminadas por desprendimiento y reemplazadas por otras nuevas. Las células viejas contienen un elevado número de bacterias asociadas, pudiendo estos microorganismos ser exportados a otras superficies por las escamas de la piel⁵⁹.

1.8.2. Lavado de manos del personal sanitario

La utilización de soluciones antisépticas para el lavado de manos puede eliminar los microorganismos patógenos presentes en las manos del personal sanitario. Aunque el primero en considerar las manos como vector de infección fue el americano Oliver Wendell Holmes, los fundadores de la antisepsia fueron los europeos Ignaz Philip Semmelweis y Joseph Lister. Holmes recomendó el lavado de manos, mientras que Semmelweis sugirió la aplicación de soluciones de clorina después del lavado de manos para reducir, en ambos casos, la mortalidad ocasionada por la fiebre puerperal. Estas dos recomendaciones, lavado de manos y tratamiento con desinfectante, puede ser una de las causas de las diferentes prácticas de antisepsia de manos que se realizan en los centros sanitarios de ambos lados del Atlántico y también a nivel mundial. Para el lavado de manos ordinario se precisa la utilización de jabón, mientras que la desinfección de manos implica la utilización de un desinfectante de la piel (antiséptico) o de una solución antimicrobiana. Posteriormente a la recomendación de Semmelweis, diferentes evaluaciones han observado que la utilización de un antiséptico influye positivamente en el control de las infecciones nosocomiales y, por deducción, la necesidad de formar e informar a los usuarios sobre el empleo de los antisépticos y su aplicación en una gran variedad de situaciones.

Actualmente, en la práctica clínica los métodos usados con antisépticos para el lavado de manos se agrupan en dos: desinfección higiénica y desinfección quirúrgica; también denominados lavado higiénico y quirúrgico de manos, respectivamente. En ambos casos se puede realizar el procedimiento con productos antisépticos líquidos que requieran el empleo de agua o bien con productos que no la requieran y se apliquen por frotación. Las soluciones antisépticas formuladas para la desinfección higiénica de manos deben eliminar de forma rápida la flora transitoria de la piel. Idealmente, estas soluciones deben ser activas en 15-30

segundos de contacto, el tiempo preciso requerido para un lavado de las manos convencional. El lavado quirúrgico de manos se realiza para reducir la flora residente y los patógenos transitorios de la piel, de cara a transferir el menor número de microorganismos posibles durante el proceso quirúrgico, en el caso de rotura o perforación de los guantes.

1.8.3. Métodos de evaluación de los antisépticos

1.8.3.1. Métodos *in vitro*

Al igual que en el caso de los desinfectantes, para cada antiséptico se debe comprobar su eficacia, primero mediante estudios *in vitro* y después con estudios prácticos. En una primera fase de los estudios *in vitro* se debe comprobar si los productos poseen o no actividad bactericida (frente a bacterias gramnegativas y grampositivas) y fungicida básica.

En la CEE, los antisépticos en la fase 1 de evaluación deben demostrar actividad frente a *S.aureus*, *P.aeruginosa* y hongos, en ensayos de suspensión cuantitativos (UNE-EN 1040 y EN 1275)^{20, 22}, pruebas comunes para todos los productos biocidas. No obstante, este tipo de pruebas no son imprescindibles, por lo que muchos fabricantes evalúan los productos directamente para una aplicación específica. En una segunda fase se deben realizar ensayos específicos para la aplicación concreta del producto, en este caso la desinfección higiénica y quirúrgica de manos. Estos ensayos son pruebas de suspensión cuantitativa ampliada (fase 2/ etapa 1) en los que se incluyen microorganismos adicionales como *E.coli k12* y *Enterococcus hirae* y el efecto de sustancias interferentes en la actividad antimicrobiana (PrEN 12054)⁶⁰. Éste último aspecto es importante para los antisépticos que están en contacto con sangre y mucina, como es el caso de los antisépticos de uso oral o que se aplican sobre otras mucosas⁶¹. En esta fase de ensayos actualmente se incluye la actividad virucida (PrEN 14476)⁶², utilizando poliovirus tipo 1 y adenovirus tipo 5; en el futuro también se desarrollaran ensayos de evaluación de la actividad micobactericida frente a *M.terrae* y *M.avium*; y de actividad fungicida frente a levaduras como *Candida albicans*. En EEUU, además se incorporan estudios con portagérmenes, incluidos los de actividad virucida, y el empleo de microorganismos patógenos asociados a infecciones nosocomiales⁹. Sin embargo, este tipo de estudios *in vitro* no proporcionan información sobre la actividad de los antisépticos en la piel, mientras que los estudios *in vivo* sí (fase 2/ etapa 2). En la tabla 9 se detallan las normativas EN *in vitro* e *in vivo*, anteriormente comentadas, para los antisépticos utilizados en la desinfección de manos.

Tabla 9: Normativas EN de actividad biocida para antisépticos de manos. Normas, proyectos y normativas en elaboración

Tipo de utilización	Fase/ Etapa	Tipo de actividad			
		Bactericida	Fungicida	Micobactericida	Virucida
Lavado higiénico de manos	2/1	PrEN 12054	WI 216039	-	PrEN 14476
	2/2	EN 1499 ⁶³	-	-	-
Tratamiento higiénico de manos por frotación (también denominada desinfección higiénica de manos)	2/1	PrEN 12054	WI 216039	WI 16038	PrEN 14476
	2/2	EN 1500 ⁶⁴	-	-	-
Lavado quirúrgico de manos	2/1	PrEN 12054	WI 216039	-	-
	2/2	PrEN 12791 ⁶⁵	-	-	-
Tratamiento quirúrgico de manos por frotación (también denominada desinfección quirúrgica de manos)	2/1	PrEN 12054	WI 216039	-	-
	2/2	PrEN 12791	-	-	-

WI: normativas en elaboración; Pr: proyectos

1.8.3.2. Estudios *in vivo*

Los métodos *in vivo* son pruebas de laboratorio que simulan las condiciones reales del lavado de manos y que requieren la colaboración de voluntarios (fase 2/ etapa 2). Para ello, en los estudios para eliminar la flora transitoria se contaminan las manos de forma artificial y se usan como modelo para representar una situación en la que se requiere un tratamiento antiséptico para conseguir eliminar el mayor número de microorganismos posible. Este proceso se puede realizar para comprobar la eficacia de productos que se utilizan restregándose las manos, sin la utilización de agua o bien para antisépticos que si la requieran. Por el contrario, los productos evaluados para la desinfección quirúrgica de manos se ensayan por su habilidad para eliminar la flora residente, sin contaminar de forma artificial las manos de los voluntarios. Además, la eficacia de los antisépticos sobre la flora residente de la piel de las manos se puede evaluar en base a su efecto sobre los microorganismos: inmediato, persistente y residual.

La eficacia final del uso de un antiséptico para una indicación específica requiere una fase de estudios clínicos (fase 3), para los que todavía no existen normativas. Sin embargo, aún hoy en día, algunos estudios clínicos como por ejemplo la conveniencia de la desinfección quirúrgica de manos para prevenir las infecciones nosocomiales no ha sido demostrada aún,

por limitaciones de tipo ético y de tamaño muestral. Por otro lado, el tratamiento antiséptico de las mucosas y heridas presenta idénticos problemas. La mayoría de antisépticos utilizados hoy en día de forma preventiva o terapéutica sobre mucosas se seleccionan basándose únicamente en los datos obtenidos en los estudios *in vitro*. Por ello, recientemente Pitten et al.^{66, 67} han sugerido el diseño de ensayos en fase 2/ etapa 2 para antisépticos orales.

Tanto en los estudios con flora transitoria como residente se precisa conocer el número de microorganismos presentes en las manos, previamente a la aplicación del antiséptico. Las bacterias no pueden contarse directamente sobre la piel, por eso la evaluación de la eficacia de un antiséptico debe basarse en el número de bacterias que se pueden recuperar a partir de un procedimiento estandarizado. Los resultados se pueden comparar con formulaciones de referencia, como jabón en el caso de los productos utilizados para el lavado higiénico de la piel; y alcohol isopropílico al 60% en el caso de productos con base alcohólica y tratamiento higiénico de las manos por frotación, si se realizan los ensayos en el mismo tiempo. El recuento de ufc se determina antes y después de haber utilizado el antiséptico, para establecer la tasa de reducción de microorganismos debida a éste (expresado en porcentaje o \log_{10}). Una reducción de 2.5-3 \log_{10} se aplica para la desinfección higiénica de manos y de 3-5 \log_{10} para la reducción de la flora residente.

Los principales métodos de recuperación de microorganismos supervivientes en los estudios *in vivo* son la impresión y el lavado. La impresión puede realizarse de forma directa, al poner en contacto la zona de la piel sobre un medio de cultivo sólido; o por impresión indirecta, al tocar las yemas de los dedos una placa de Petri vacía y luego depositar medio sólido fundido. El lavado permite dispersar la flora presente en un medio líquido y posteriormente realizar un cultivo de éste. Variaciones de este método son el ensayo de Gaschen (la mano se introduce en una bolsa cerrada que contiene medio líquido de cultivo y posteriormente, se analiza el líquido y se realiza el recuento de microorganismos) y el ensayo de Walter del lavado del guante (la mano se introduce en un guante de tipo quirúrgico y se mantiene durante cierto tiempo, después del cual se lava el interior del guante con agua estéril y se analiza ésta).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente sobre la composición de la flora microbiana de la piel y las características de estos ensayos, en Europa el CEN TC 216 decidió establecer varias pruebas *in vivo* para la evaluación de los desinfectantes de manos en las siguientes aplicaciones: lavado higiénico de manos, tratamiento higiénico de manos por frotación, lavado quirúrgico de manos y tratamiento quirúrgico de manos por frotación (tabla 9). La normativa UNE-EN 1499 se aplica en el caso de productos para el lavado higiénico de manos, la UNE-EN 1500 para el tratamiento higiénico de las manos por frotación y la PrEN 12791 para antisépticos empleados en el lavado y tratamiento quirúrgico de manos⁶³⁻⁶⁵. El microorganismo que se utiliza en este tipo de ensayos es *E.coli* k12, cepa de origen humano no patógena y que forma parte de la flora habitual de la piel.

En EEUU, los requerimientos de los ensayos *in vitro* e *in vivo* para los antisépticos de manos los establece la TFM de la FDA. En los ensayos *in vivo* de lavado de manos higiénico y quirúrgico se utiliza *S.marcescens* en lugar de *E.coli* k12. Sin embargo, ni en la CEE ni en EEUU existen evaluaciones *in vivo* con microorganismos nosocomiales u otros patógenos por razones éticas. Por ello, recientemente Messenger et al.⁶⁸ han desarrollado un método *ex-vivo* con el objetivo de reducir las discrepancias de los resultados obtenidos entre diferentes estudios realizados con voluntarios y la inclusión de microorganismos patógenos.

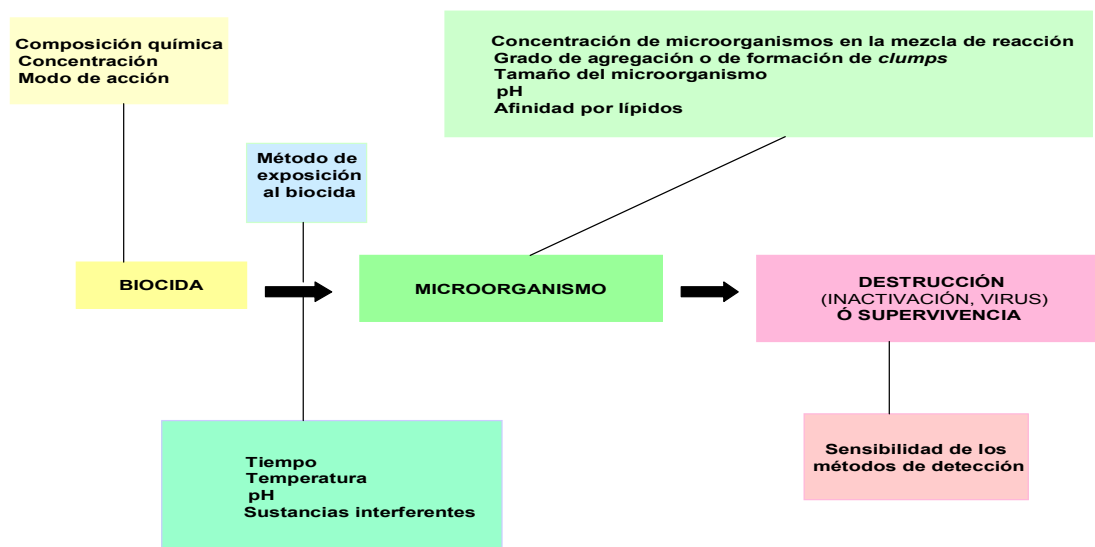
En general, los estudios *in vivo* han demostrado, tanto para el lavado higiénico de manos como para el quirúrgico, que las formulaciones de antisépticos que contienen 60-95% de alcohol o alcohol combinado con QACs, hexaclorofeno o glucanato de clorhexidina son más efectivas que otros compuestos de acción más persistente. Los compuestos más activos, son por orden decreciente de actividad: glucanato de clorhexidina, yodóforos, triclosan y jabón neutro⁵⁹.

1.9. Factores físico-químicos que influyen en la evaluación de la actividad biocida de los antisépticos y desinfectantes

Cada tipo de antiséptico o desinfectante químico tiene una acción biocida característica, la cual se determina por su espectro antimicrobiano y su mecanismo de acción. Sin embargo, esta eficacia puede estar influenciada por diversos factores, frecuentemente adversos, cuando se utiliza el biocida (figura 8).

En los estudios *in vitro* existen una serie de factores que deben estandarizarse para que sea cual sea el método elegido, los resultados sean estrictamente dependientes del producto evaluado y del procedimiento de ensayo. A continuación pasamos a describir algunos de estos factores y su influencia sobre la actividad del biocida.

Figura 8: Factores que influyen en las interacciones entre biocida y microorganismo



1.9.1. Factores pre-tratamiento

1.9.1.1. Microorganismos

La eficacia de un biocida debe demostrarse ante una serie de microorganismos: bacterias vegetativas, micobacterias, levaduras, hongos filamentosos, esporas bacterianas y virus. La evaluación de la actividad biocida depende, en gran parte, de las especies y cepas de microorganismos utilizados en los ensayos, según el tipo de membrana o pared celular y de las actividades metabólicas del microorganismo. No es posible utilizar, por razones prácticas, un gran número de especies y cepas, por lo que se suelen emplear cepas representativas de los principales grupos de microorganismos. En el caso de las bacterias, se deben seleccionar una o varias especies de bacterias grampositivas y una o varias especies de bacterias gramnegativas.

Actualmente, todas las normativas vigentes describen la colección y el número de la cepa que se debe emplear. En un principio se eligieron especies patógenas, pero resultaban demasiado sensibles a los biocidas. En cambio, si se escogen cepas representativas de la

flora común, al determinar la actividad antimicrobiana de un producto podremos definir las condiciones de aplicación del biocida para garantizar su eficacia en las situaciones más comunes. Si seleccionamos cepas resistentes para esta finalidad, garantizamos la eficacia del producto en muchas situaciones, pero incrementamos el costo y la toxicidad para los usuarios y el medio ambiente. En Europa, se ha establecido por consenso la selección de cepas bacterianas representativas de la flora común y la no utilización de cepas resistentes a los antibióticos. Por tanto, y como norma general, deben excluirse de los ensayos de actividad biocida las bacterias multirresistentes, excepto aquellas que tengan una permeabilidad de membrana reducida. No obstante, el uso de cepas microbianas responsables de infecciones nosocomiales en el medio hospitalario debe ser sometido a revisiones periódicas, para seleccionar el biocida más eficaz y determinar los métodos para su uso.

Existen otras cuestiones que se deben tener en cuenta. Así por ejemplo, ¿se debe sustituir a todos los microorganismos patógenos causantes de enfermedades por un microorganismo alternativo inocuo? La respuesta sería sí. Sin embargo, la comparación directa de los resultados de los ensayos obtenidos con un microorganismo alternativo inocuo y con un microorganismo patógeno debe demostrar que, bajo idénticas condiciones experimentales, el microorganismo alternativo obtiene conclusiones similares a las del microorganismo patógeno. Un ejemplo que en el pasado creo gran controversia fue la utilización de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis* BCG, por ser más sensibles a la acción de los biocidas, como microorganismos alternativos a *M.tuberculosis*⁶⁹⁻⁷¹.

Otro aspecto importante a considerar es que todas las cepas que se utilicen en los ensayos deben ser estables genéticamente, ya que el subcultivo continuado en el laboratorio puede dar origen a poblaciones microbianas con modificaciones de algunas de sus características. La estabilidad genética debe ser controlada regularmente, por ello es importante trabajar con cepas de colección y sustituirlas periódicamente. La paralización del crecimiento de los microorganismos garantiza al máximo la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas. Los métodos de conservación más adecuados para mantener las características de los microorganismos son la congelación o la liofilización. Sin embargo, hay que tener presente que cada microorganismo soportará determinados métodos de conservación mejor que otros. Es el caso de los hongos filamentosos, especialmente los no

esporulados, que no pueden guardarse liofilizados. Cuando se recuperan las cepas microbianas hay que revitalizar o rejuvenecer las células microbianas sembrándolas en un medio de cultivo no selectivo, es decir, en un medio que asegure el crecimiento, y a partir de este primer cultivo ya se podrá trabajar con ellas, pero siempre limitando el número de replicaciones.

1.9.1.2. Condiciones de crecimiento de los microorganismos

Las condiciones en las que crecen los microorganismos en la naturaleza son, generalmente, desconocidas. No obstante, la estructura de la pared celular de las bacterias varía en respuesta a los cambios que se producen en el medio ambiente en el que crece.

La composición del medio y las condiciones de crecimiento influyen en la sensibilidad de los microorganismos a los biocidas ⁷². Las bacterias grampositivas “engordadas o cebadas” (*fattened*) se producen cuando crecen en presencia de glicerol o en caldos de cultivo microbiológico que contienen glicerol. En estas bacterias, se producen alteraciones en la capa lipídica de la pared celular que afectan a su actividad frente a los compuestos fenólicos ⁷³. Algunos tipos de bacterias gramnegativas como las pseudomonas, son muy resistentes a los desinfectantes cuando crecen en agua o en medio de cultivo con escasos nutrientes ⁷³. El crecimiento de *E.coli* en medios que contienen L-alanina induce el crecimiento de bacterias más permeables y por tanto más sensibles a los desinfectantes ⁷³. El déficit de Mg^{+2} provoca cambios importantes en la pared celular de *P.aeruginosa* asociados a la resistencia al EDTA, cloro y xilenol ⁷³. Se ha demostrado que los diferentes tipos de agua utilizada para la preparación de los medios de cultivo influyen en la germinación y esporulación de *B.subtilis* ⁷⁴. La presencia de polisorbato, probablemente altera la permeabilidad de las células ya que se ha observado que afecta a los constituyentes intracelulares y hace a las bacterias más sensibles a los cambios de pH, de temperatura y a la acción del cloruro sódico.

Las bacterias que se multiplican activamente en fase logarítmica son más sensibles a los productos biocidas que las bacterias más viejas de una fase estacionaria de crecimiento ⁷⁵. Por tanto, en los ensayos de evaluación de los antisépticos y desinfectantes se deben emplear, para la preparación del inóculo, microorganismos tomados en fase estacionaria de la curva de crecimiento.

1.9.1.3. Accesibilidad a los microorganismos

Las bacterias en suspensión en un medio líquido son más sensibles a los biocidas que las bacterias adheridas y fijadas sobre una superficie⁷⁶. Por otro lado, los microorganismos para sobrevivir en condiciones hostiles y aprovechar mejor los sustratos disponibles, se organizan en *biofilms* para adherirse a las superficies o forman agregados en suspensiones acuosas. Estas estructuras de adherencia, los *biofilms*, están compuestas por depósitos orgánicos e inorgánicos y pueden causar muchos y diversos problemas en la evaluación de la actividad biocida de los desinfectantes, especialmente en la desinfección hospitalaria o de los dispositivos médicos.

1.9.1.4. Temperatura de incubación de los cultivos

No existen muchos datos acerca de la influencia de la temperatura de incubación de los cultivos microbianos en la actividad de los biocidas, al contrario de lo que ocurre con los antibióticos. No obstante, las esporas de *B.subtilis* producidas a 37°C son más sensibles a la inhibición de su germinación por clorocresol que las esporas que crecen a 50°C⁷³.

1.9.1.5. pH del medio de cultivo

Hay muy poca información acerca del efecto que las variaciones de pH del medio de cultivo pueden tener en la sensibilidad de los microorganismos a los biocidas, pero podrían producir cambios en la pared celular de las bacterias en crecimiento. Estos cambios de pH también pueden ocurrir durante el crecimiento de los microorganismos como resultado de su actividad metabólica.

1.9.1.6. Preparación del biocida

Las soluciones biocidas a evaluar se deben preparar el día de realización del ensayo siguiendo las indicaciones del fabricante. Una excepción a esta regla general es cuando se desee investigar el grado de afectación del compuesto con el transcurso del tiempo (reutilización). Para los ensayos *in vitro* se debe utilizar agua destilada o agua de dureza estándar, según el requerimiento del procedimiento, pero nunca debe emplearse agua corriente del grifo. El agua corriente del grifo se utiliza de forma rutinaria para la preparación de las diluciones de los biocidas en la práctica clínica diaria, pero contiene gran cantidad de compuestos químicos que pueden provocar la precipitación de algunos componentes. Además, existen grandes variaciones de tipo geográfico y temporal en la

composición del agua corriente. Para evitar los inconvenientes descritos se debe utilizar agua de dureza estándar cuando el fabricante indique la dilución del biocida con agua corriente.

1.9.1.7. Preparación del inóculo

El título del inóculo o número de células viables se fija basándose en el método de ensayo y la reducción requerida en cada caso. Éste debe ser lo suficientemente elevado para que la reducción que obtengamos al realizar el ensayo sea estadísticamente significativa. Por ello, para determinar la actividad bactericida en muchos métodos, que requieren una reducción de $5 \log_{10}$ del número inicial de bacterias y establecer con precisión el número de bacterias supervivientes, es preciso que el inóculo inicial contenga al menos 10^7 ufc/ml en contacto con el producto biocida⁹. Sin embargo, esta cantidad no debe sobrepasarse; de hecho, las respectivas proporciones del número de microorganismos y el número de moléculas activas del biocida influyen en los resultados, particularmente en los productos en los que su actividad se ve reducida por la presencia de proteínas.

1.9.2. Factores durante el tratamiento

1.9.2.1. Número y localización de microorganismos

Para un biocida es fácil ser efectivo y destruir un número reducido de microorganismos. Sin embargo, cuando el número de microorganismos se incrementa también aumentan las dificultades para eliminarlos. Como se ha comentado con anterioridad, el número de microorganismos inicial en los inóculos, debe ser elevado, pero no excesivo.

1.9.2.2. Concentración del biocida

1.9.2.2.1. Expresión de la concentración de los biocidas

La mayoría de los ensayos, estandarizados o no, se establecen para una o más concentraciones específicas de biocida y según las recomendaciones de uso establecidas por el fabricante. Existen diversas formas de expresar estas concentraciones (o diluciones):

- Porcentaje peso/ peso (p/p): el contenido de cloro disponible en un desinfectante clorado, se expresa como gramos de cloro por 100 g de producto. La concentración de alcohol en una mezcla de agua y alcohol también se expresa en % p/p.

- Porcentaje peso/volumen (p/v): la concentración de aldehídos, clorhexidina y los QACs se expresan cómo gramos de compuesto activo por 100 ml de solución. Este método debe usarse para expresar la concentración de las soluciones stock y también para las diluciones de uso. Si una solución de clorhexidina al 20% (p/v) se diluye 1:200 (v/v), la concentración de la solución diluida es 0.1% (p/v).
- Porcentaje volumen/volumen (v/v): La concentración de los compuestos fenólicos y de otros desinfectantes que contienen varios ingredientes activos se expresa de esta manera. El factor de dilución puede expresarse como % v/v o 1:X (volumen total X+1 ml). El % v/v se refiere a los ml de la solución concentrada de desinfectantes por 100 ml de la solución diluida de desinfectante.

1.9.2.2.2. Concentración de los biocidas

Muchos biocidas son formulados como óptimos, con un espectro de actividad antimicrobiano a elevada concentración, para uso directo. Es importante conocer el efecto de la concentración sobre la actividad biocida de los compuestos para poder evaluar correctamente esta actividad y para tomar decisiones acerca de las instrucciones de dilución en la práctica.

La actividad de un biocida se representa como el coeficiente de dilución (η), el cual se calcula a partir de la formula $k=tc^\eta$, donde k es la constante de destrucción, c es la concentración y t el tiempo de desinfección (min.). Los biocidas con elevado η , como los compuestos alcohólicos y fenólicos, se ven afectados por los cambios en su concentración o dilución, mientras que los compuestos con baja actividad biocida, como los compuestos órganomercuriales y el formaldehído, son influenciados en menor grado ⁷⁷. Los compuestos que tienen $\eta < 2$ como órganomercuriales, peróxidos, QACs, acridinas, formaldehído, clorhexidina,...., a pesar de diferir en sus mecanismos de acción interaccionan fuertemente con su diana mediante enlaces iónicos. Por el contrario, los compuestos con $\eta > 4$, como por ejemplo los alcoholes aromáticos y los alifáticos y fenoles, actúan como disruptores de membrana y conductores de protones provocando interacciones físicas con los componentes lipófilos de la envuelta bacteriana. Los compuestos con valores de η intermedios, como por ejemplo el ácido ascórbico, son considerados como compuestos que poseen ambas acciones, química y física.

En resumen, un descenso en la concentración de los compuestos con un elevado valor de η precisa un aumento del tiempo para conseguir un grado de eliminación bacteriana comparable, si el resto de condiciones se mantienen constantes. Por el contrario, los compuestos con un valor de η bajo son menos influenciados por estos cambios. Cuando disminuye el tiempo de acción, se debe aumentar el exponente de concentración para que se mantenga la misma actividad. En la práctica, este hecho es importante, ya que existen numerosos biocidas que su tiempo de acción debe ser corto.

1.9.2.3. Temperatura de ensayo

Los desinfectantes químicos son utilizados, habitualmente, a temperatura ambiente por lo que la temperatura de los ensayos de evaluación de su actividad se suelen realizar a 20°C. En cambio, los antisépticos se evalúan a una temperatura de 30-37°C, según las condiciones de utilización y a 20°C si se utilizan normativas europeas.

En general, la actividad de un producto biocida se incrementa con la temperatura. El coeficiente de temperatura = $t \text{ de muerte a } x^\circ\text{C} / t (x + 10^\circ\text{C})$, está comprendido entre 2-14. El glutaraldehído alcalino tiene un coeficiente de temperatura de 4, un incremento de 10°C en la temperatura hace que se reduzca 4 veces el grado de eliminación de los microorganismos viables. El glutaraldehído tiene, por tanto, una actividad microbiocida dependiente de la temperatura. La solución alcalina es mucho más activa a 20°C que la formulación ácida del compuesto⁷⁸. Los compuestos fenólicos tienen un coeficiente de temperatura de 2-6 y los compuestos clorados como la lejía, ven incrementada en un 50% su actividad esporicida cuando la temperatura aumenta 10°C. Las variaciones de temperatura también llevan consigo variaciones de índole química. Así, el descenso de la temperatura incrementa la solubilidad de los compuestos clorados⁷³.

1.9.2.4. Importancia del pH

La actividad microbiocida de un compuesto químico se puede ver influenciada por el pH a tres niveles: 1) cambios moleculares, 2) cambios en la superficie celular y 3) por partición de los compuestos.

Un ejemplo de los cambios moleculares lo constituye el glutaraldehído, éste es más estable a pH ácido, pero más potente a pH alcalino porque la interacción de los grupos amino es rápida y es la responsable del efecto letal de este desinfectante ⁷⁸.

Cuando aumenta el pH el número de cargas negativas de la superficie bacteriana aumenta, con lo que las moléculas con carga positiva tienen un cierto grado de *binding*. Este es el caso de los QACs o del cristal violeta ⁷³.

1.9.2.5. Sustancias interferentes

1.9.2.5.1. Materia orgánica

La materia orgánica soluble, coloidal o particulada como la sangre, suero, pus, heces, grasas,... pueden ser introducidas en las soluciones diluidas de los biocidas por los objetos o instrumentos que se desean tratar, inactivando la acción de los biocidas. La materia orgánica interactúa con los compuestos químicos según las características y naturaleza físico-química de éstos, interfiriendo en las reacciones de oxidación-reducción que consumen el principio activo del biocida o reducen la superficie de adsorción disponible del compuesto para los microorganismos. En los ensayos *in vitro* la materia orgánica se añade en forma de extracto de levadura, albúmina bovina, suero bovino fetal, caldos nutritivos, sangre, leche bacteriológica,... y más raramente, secreciones respiratorias, heces,... En la práctica, la albúmina bovina utilizada debe carecer de toxicidad para los microorganismos y la leche bacteriológica debe estar exenta de trazas de antibióticos ⁹. Los compuestos clorados, los yodados, los ácidos y los fenólicos ven reducida su actividad en presencia de proteínas, mientras que en otros casos, como en el de algunos aldehídos, la actividad puede verse incrementada ⁷⁹.

1.9.2.5.2. Agua

Los iones bivalentes como el Ca^{+2} y Mg^{+2} influyen en la composición del agua corriente y están también presentes en el agua de dureza estándar, por lo que pueden interferir en la actividad de los antisépticos y desinfectantes.

Por un lado, estos iones pueden formar compuestos inactivos o insolubles con compuestos activos al actuar como quelantes. Los compuestos quelantes como el EDTA reducen la interferencia entre el agua dura y la actividad bactericida. Así, la actividad bactericida frente

a bacterias gramnegativas se ve potenciada en presencia de EDTA, aunque reducida con Ca^{+2} , Mg^{+2} o agua de dureza estándar (Ca_2CO_3)^{9,73}.

1.9.2.5.3. Iones metálicos

La actividad de los antisépticos y desinfectantes químicos puede verse reducida o incrementada por la presencia de cationes.

El Mn^{+2} y el Zn^{+2} son iones que reducen y aumentan, respectivamente, la actividad del salicilaldehído frente a *Pseudomonas* spp. Por el contrario, los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} no le afectan. La actividad antimicrobiana de los compuestos aniónicos frente a estafilococos se incrementa en presencia de bajas concentraciones de iones divalentes. En cambio, la actividad bactericida de los compuestos de ácidos grasos de cadena larga disminuye en presencia de Mg^{+2} , Ca^{+2} o Ba^{+2} ⁹. La actividad biocida frente a bacterias gramnegativas de muchos compuestos se potencia en presencia de EDTA^{9,73}.

1.9.2.5.4. Tipo de microorganismos

Los diferentes tipos de microorganismos difieren en sus respuestas a las sustancias biocidas, debido en parte a la presencia de estructuras de barrera como membrana y pared celular, que pueden actuar interfiriendo en la penetración de fluidos y solutos.

En el apartado 1.10 se describe el efecto de los biocidas frente a hongos, virus, esporas y priones. No se incluye a los protozoos dados los escasos estudios de evaluación realizados hasta la fecha con desinfectantes químicos.

1.9.3. Factores post-tratamiento

Diversos factores influyen en la recuperación de los microorganismos expuestos a la acción de las soluciones biocidas. De éstos, destacamos los siguientes: la composición del medio de recuperación, la eliminación del antiséptico o desinfectante, la temperatura y el periodo de recuperación y la composición del diluyente empleado.

1.9.3.1. Eliminación de la actividad residual de los desinfectantes

La actividad residual de un biocida químico puede inhibir el crecimiento de los microorganismos en el medio de recuperación, sobrestimando la destrucción de microorganismos por parte del producto biocida y potenciando resultados falsos negativos. Por ello, es necesario establecer una adecuada neutralización para que los resultados obtenidos en los ensayos sean realmente los de la actividad biocida. A continuación se detallan algunos de los métodos empleados para la eliminación de la actividad residual de un antiséptico o desinfectante químico.

1.9.3.1.1. Dilución

La relación entre concentración y el efecto antimicrobiano difiere entre los biocidas, pero ésta es constante para un principio activo concreto. Esta relación es exponencial ($k = c^n t$), donde c es la concentración, k es una constante, t el tiempo necesario para destruir el inoculo y η el coeficiente de dilución. En la tabla 10 se muestra el coeficiente de dilución para varios biocidas. Así, se observa que los biocidas que poseen un coeficiente de dilución elevado (4-8), como por ejemplo los alcoholes, pierden rápidamente su actividad por dilución, siendo este procedimiento suficiente para eliminar la actividad residual. Mientras que los biocidas con valores de η bajos no se ven tan afectados. Es importante demostrar que el proceso de dilución es eficaz para eliminar la actividad biocida o bioestática del producto a evaluar en los biocidas con valores de η elevados. En la práctica, la dilución casi siempre esta asociada con un proceso de neutralización o de lavado.

El agua destilada, la solución de Ringer 1/4, la solución salina, el agua de peptona o un caldo de cultivo adecuado pueden utilizarse como diluyentes. Sin embargo, los recuentos de bacterias viables son más reducidos cuando se utiliza el agua destilada como diluyente para algunas cepas de *P.aeruginosa* y *Proteus* spp que cuando se utiliza otro tipo de diluyente⁷³. La utilización de un diluyente inadecuado puede contribuir a aumentar el estado de estrés de los microorganismos tras la exposición al biocida químico y provocar la muerte de los mismos al potenciar el efecto microbiocida del producto.

La dilución en muchos casos es insuficiente para eliminar el efecto residual del desinfectante por lo que pueden incluirse neutralizantes en el primer tubo de dilución o en el medio de recuperación de los microorganismos supervivientes o en ambos.

Tabla 10: Coeficiente de dilución de los biocidas más comunes

Biocida	Valor η
Alcoholes	10
Fenoles	6
Parabenos	2.5
Clorhexidina	2
QACs	1
Formaldehído	1
Compuestos mercuriales	1

1.9.3.1.2. Neutralización por inhibición química

La inactivación química de los biocidas es el método más empleado de neutralización. En la tabla 11 se indican los neutralizantes más comunes para algunos biocidas. Los medios de cultivo líquidos más utilizados como neutralizantes son el caldo de Letheen, el caldo de Dey-Engley (D/E) y el tioglicolato⁸⁰. El caldo de Letheen es eficaz para los QACs y las biguanidas. Por su parte, el caldo de tioglicolato es un buen neutralizante de los compuestos mercuriales.

Tabla 11: Neutralizantes de uso más frecuente

Desinfectante	Neutralizante
Fenoles	<ul style="list-style-type: none"> • 1% de polisorbato 80, 3% de saponina, 0.3% de lecitina en PBS
Aldehídos	<ul style="list-style-type: none"> • 3% de polisorbato 80, 0.3% de lecitina • 0.1% L-histidina. • Glicina • Yema de huevo fresca diluida al 5 o al 0.5% • Yema de huevo fresca diluida al 5% y polisorbato 80, 40 g/l. • Lecitina al 4%.
QAC	<ul style="list-style-type: none"> • 0.3% de lecitina y 3% de polisorbato 80. • Emulsión comercial de fosfolípidos (50mg/ ml), diluida al 1/10
Compuestos organomercuriales	<ul style="list-style-type: none"> • Tioglicolato sódico al 0.5 o 5 g/l • L-cisteína al 0.8 o 0.15 g/l
Peróxidos	<ul style="list-style-type: none"> • Catalasa
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Tiosulfato sódico 5 g/l • PBS, 0.25 M • Polisorbato 80 30g/l, saponina 30 g/ñ, L-histidina 1 g/ l y L-cisteína 1 g/ l.

En la composición de los neutralizantes se pueden utilizar detergentes no iónicos como el polisorbato 80 (Tween 80), solo o en combinación con lecitina para inactivar los QACs, clorhexidina y compuestos fenólicos. No obstante, el polisorbato puede alterar la permeabilidad de la membrana y hacer que los microorganismos sean más sensibles a los cambios de pH, temperatura y concentraciones de biocida incrementando el efecto antimicrobiano del biocida.

En muchos casos los neutralizantes son tóxicos para ciertas especies, y la eficacia de los biocidas es variable según el tipo de microorganismo, y esto requiere diferentes niveles o grados de neutralización (tabla 12). Así, el tiosulfato sódico inactiva la clorina y los desinfectantes yodados, pero inhibe el crecimiento de los estafilococos^{75, 80}. Por ello, la concentración de tiosulfato sódico no debe exceder de 0.1% p/v en el medio de neutralización. Los desinfectantes que tienen como base glutaraldehído o formaldehído son difíciles de neutralizar, requieren elevadas cantidades de bisulfito sódico, que también inhibe el crecimiento microbiano y la germinación de las esporas bacterianas⁸⁰.

Tabla 12: Neutralizantes con potencial toxicidad

Compuesto	Biocida	Toxicidad
Bisulfito sódico	Glutaraldehído	Bacterias no esporuladas
Tioglicolato sódico	Mercuriales	Bacterias y esporas
Tiosulfato sódico	Clorados y yodados	Estafilococos
Glicina	Glutaraldehído	Células en crecimiento
Lubrol W	QACs	<i>Pseudomonas spp.</i>

Es esencial incluir controles en los ensayos de actividad biocida cuando se utiliza un método de neutralización para eliminar los restos de biocida. De no realizarse estos controles se podrían dar resultados falsos negativos causados por la actividad microbioestática o microbiocida del neutralizante. La eficacia o capacidad del neutralizante para inhibir la acción del biocida sobre los microorganismos, puede demostrarse comparando el número de

microorganismos recuperados a partir del neutralizante en presencia y ausencia del biocida. Esta comparación evita confundir el efecto tóxico del neutralizante con una inadecuada inhibición del producto biocida. La toxicidad puede estimarse comparando los microorganismos recuperados a partir de dos poblaciones, como se ha comentado en el caso de la eficacia del neutralizante. El primer tratamiento consistirá en mezclar el neutralizante con tampón salino y el segundo en hacerlo entre el neutralizante y el producto biocida. Ambas mezclas de productos se inoculan con un número de microorganismos reducido, del orden de 100 ufc/ml, y a continuación se calculará el número de supervivientes. Si el neutralizante es efectivo y no tóxico, los dos grupos de tratamiento tendrán idéntico o parecido número de microorganismos viables ⁸⁰.

En el caso de los ensayos de actividad virucida existen muy pocos neutralizantes que carezcan de efectos tóxicos sobre las células. El suero bovino fetal, es un reconocido neutralizante no-tóxico (compuestos catiónicos, alcalinos, ácidos, oxidantes y aldehídos) que tiene la ventaja de ser además un factor de crecimiento en los medios de cultivo. Sin embargo, en la actualidad la neutralización química es un método poco utilizado en este tipo de ensayos y se prefiere: 1) la dilución, es un método sencillo, rápido y apropiado, pero tiene el inconveniente de diluir también el virus por lo que se requiere un título vírico elevado; 2) el tamizado molecular o filtrado en gel utilizando columnas de gel de dextrano como el Sephadex LH-20 ⁸¹ o gel de agarosa ⁸²; 3) filtración molecular selectiva o ultrafiltración; y 4) filtración de membrana.

1.9.3.1.3. Filtración de membrana

El procedimiento de filtración de membrana permite separar los microorganismos en suspensión de la solución biocida. Es de fácil realización, siempre y cuando los residuos de los biocidas o agentes tensioactivos no se fijen a la membrana. Si se pasa la mezcla de biocida y microorganismos a través de una membrana de filtración, los microorganismos son retenidos sobre la membrana y las trazas o restos de desinfectante eliminados. El proceso de filtración por si solo puede no ser suficiente para eliminar completamente el biocida. El incluir uno o varios lavados con diluyentes o neutralizantes químicos puede ser una medida muy útil para asegurar una completa neutralización del biocida y que la porosidad de la membrana no se vea alterada por este hecho. Para una correcta y efectiva

recuperación de los microorganismos supervivientes por este método se requiere demostrar la eficacia del neutralizante y del sistema de neutralización.

1.9.3.2. Recuperación de los microorganismos supervivientes

La composición del medio utilizado para el cultivo de microorganismos que sobreviven a la exposición y acción del biocida debe ser adecuada para favorecer el crecimiento de estos microorganismos y no debe contener restos o trazas de sustancias inhibitorias.

El agua destilada y las soluciones salinas son tóxicas para *P.aeruginosa* y otras bacterias gramnegativas, mientras que el agua de peptona favorece su crecimiento⁹. Además, puede incluirse en el medio de recuperación una sustancia neutralizante o inactivadora de la acción del biocida. Diversos cationes mejoran el crecimiento de las bacterias tratadas con fenol⁹. El incremento del tiempo de incubación de los cultivos puede contribuir también a aumentar el número de microorganismos recuperados.

La recuperación de microorganismos supervivientes en los ensayos de suspensión es más sencilla que en los ensayos con portagérmenes, especialmente cuando el material empleado es poroso. La recuperación de microorganismos dañados es en ocasiones difícil de cuantificar. Un método empleado para estimar el número de microorganismos inviables en un estudio de actividad biocida es comparar el número de microorganismos recuperados a partir de un medio de cultivo rico en nutrientes y la recuperación en un medio hipertónico. Los microorganismos que no crecen en el medio hipertónico son los microorganismos inviables. El medio sólido de tripticasa de soja es un ejemplo de medio de cultivo enriquecido y que es útil para recuperar una gran variedad de bacterias. Ejemplos de medios hipertónicos son los medios suplementados con 5.5% de KCl o aquellos que tienen un pH ácido.

Después de la filtración mediante membrana, ésta se puede colocar en el interior de tubos que contengan medios de cultivo líquido o bien sobre la superficie de medios de cultivo sólido. En el último caso, los nutrientes pasan a través de la membrana, permitiendo el crecimiento de las colonias de microorganismos sobre la superficie de la membrana de filtración y facilitando, por tanto, la cuantificación de los microorganismos supervivientes.

1.10. Actividad antimicrobiana de los desinfectantes frente a diferentes grupos de microorganismos

1.10.1. Actividad fungicida

El papel de los hongos como patógenos nosocomiales aumenta día a día debido al incremento de pacientes inmunodeprimidos. Esto justifica el renovado interés por eliminar los posibles focos ambientales y la aplicación de desinfectantes y antisépticos activos que limiten la transmisión de estos microorganismos. Las infecciones nosocomiales más comunes son debidas a *Candida* spp., aunque *Aspergillus* spp. y otras especies de hongos filamentosos son también patógenos oportunistas importantes. Se ha documentado la transmisión de levaduras de superficies ambientales u otros pacientes a través de las manos del personal sanitario⁸³. Los antisépticos con actividad fungicida incluyen a los alcoholes, clorhexidina y yodoforos; y entre los desinfectantes para superficies los QACs e hipocloritos.

La mayoría de los factores que causan variabilidad en los ensayos de actividad fungicida ya se han descrito de forma genérica anteriormente.

Como en todos los estudios de biocidas, en los de actividad fungicida también es muy importante la especie fúngica que se selecciona para la realización de los ensayos. Van Voor et al.⁸⁴ clasificaron los hongos en 3 categorías en base a su resistencia a los biocidas: 1) hongos muy resistentes, como por ejemplo *Mucor mucedo*, *Candida albicans* y *Penicillium chrysogenum*; 2) hongos con resistencia intermedia, como por ejemplo *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* y *Epidermophytum floccosum*; 3) hongos sensibles a los biocidas, como por ejemplo *Trichophyton equium* y *Trichophyton rubrum*. En cambio, estudios más recientes señalan a *Aspergillus niger* y *A.fumigatus* como los hongos menos sensibles a la acción de los biocidas⁸⁵. Por ello, debería incluirse una especie de *Aspergillus* en los estudios de evaluación de la actividad fungicida, como es el caso de las normativas CEN^{22,33,36}. En el ensayo de actividad fungicida de la AOAC, (ensayo de portagérmenes) y en el de la AFNOR (ensayo de suspensión) se utiliza *Trichophyton mentagrophytes*^{86,87}.

1.10.2. Actividad esporicida

Las esporas son la única forma de diferenciación bacteriana. Se producen como mecanismo de resistencia a condiciones ambientales adversas como por ejemplo la desecación, la escasez de nutrientes y las bajas temperaturas. Están formadas por la célula germinal (protoplasto o core) rodeada a su vez por la pared celular o córtex, por fuera de la cual se encuentran las cubiertas interna y externa. Únicamente algunas especies de bacilos grampositivos son capaces de producirlas, son las pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Algunas especies de *Clostridium* son de gran importancia en patología, al producir graves enfermedades por la liberación de potentes exotoxinas como las neurotoxinas del tétanos y del botulismo, o las necrotoxinas de la gangrena gaseosa.

Las esporas bacterianas son los microorganismos más resistentes, exceptuando los priones, a la acción de los biocidas, considerándose a los desinfectantes que poseen actividad esporicida como esterilizantes. La resistencia de las esporas a la acción de los desinfectantes se debe, principalmente, a la túnica de la spora y no tanto al córtex, que impide la penetración del biocida. En EEUU, un producto es esporicida si es activo frente a las esporas de *Bacillus subtilis* y *Clostridium sporogenes*⁸⁶. Miner et al.⁸⁸ propusieron algunas modificaciones al ensayo de actividad esporicida de la AOAC. Entre ellas cabe señalar: la eliminación del hilo de sutura como portagérmen, el secado del inóculo de esporas en portagérmenes durante un mínimo de 72 horas a temperatura ambiente, los portagérmenes debían contaminarse con un mínimo de 2×10^5 esporas y realizar un mínimo de 5 experiencias.

1.10.3. Actividad virucida

Gran parte de las infecciones víricas nosocomiales pueden ser adquiridas a través del instrumental médico o a la exposición accidental del personal sanitario y de los pacientes a la sangre y otros fluidos corporales^{19, 89-92}. Este riesgo es particularmente importante en las unidades de pediatría, unidades de vigilancia intensiva (UVIs) y en pacientes inmunodeprimidos. La desinfección de superficies y manos es una de las medidas más efectivas para prevenir las infecciones por virus patógenos que se adquieren en los hospitales. La enorme diversidad existente entre las diferentes familias de virus, en relación a su tamaño, tipo de ácido nucleico del genoma (DNA o RNA) y modo de replicación, no

permite realizar generalizaciones sobre la sensibilidad a los biocidas. No obstante, los virus con envuelta son, generalmente, más sensibles que los virus sin envuelta. Dado que algunos virus son más resistentes a los biocidas que las bacterias vegetativas (figura 2), es inapropiado en muchos casos seguir las recomendaciones basadas en la actividad bactericida, por lo que se precisan estudios que determinen la actividad virucida para los principales virus patógenos.

Entre los virus patógenos más importantes causantes de infección nosocomial se encuentran el VHB, el VHC, norovirus y, más recientemente, el virus del síndrome respiratorio agudo (SARS). Estos virus tienen en común que no se pueden propagar en líneas celulares, lo que dificulta las posibilidades de desarrollo de estudios de inactivación con biocidas. No obstante, debido a su importancia médica, podrían ser incorporados a las normativas de evaluación de biocidas si algún otro tipo de ensayo indirecto fuera reproducible. La no existencia de vacunas contra algunos de estos virus y las pocas posibilidades de su desarrollo en un futuro próximo, como en el caso del VHC, hace que se deban extremar las medidas de seguridad y prevención al trabajar con ellos, y ha frenado en parte, el desarrollo y estandarización de los procedimientos de ensayo para biocidas. Por ello, en muchos casos se han buscado virus alternativos que reemplacen aceptablemente a estos hepadnavirus, norovirus y coronavirus, y puedan ser útiles en modelos animales o en cultivo virológico (tabla 13).

Tabla 13: Virus alternativos usados en ensayos de actividad virucida de los biocidas

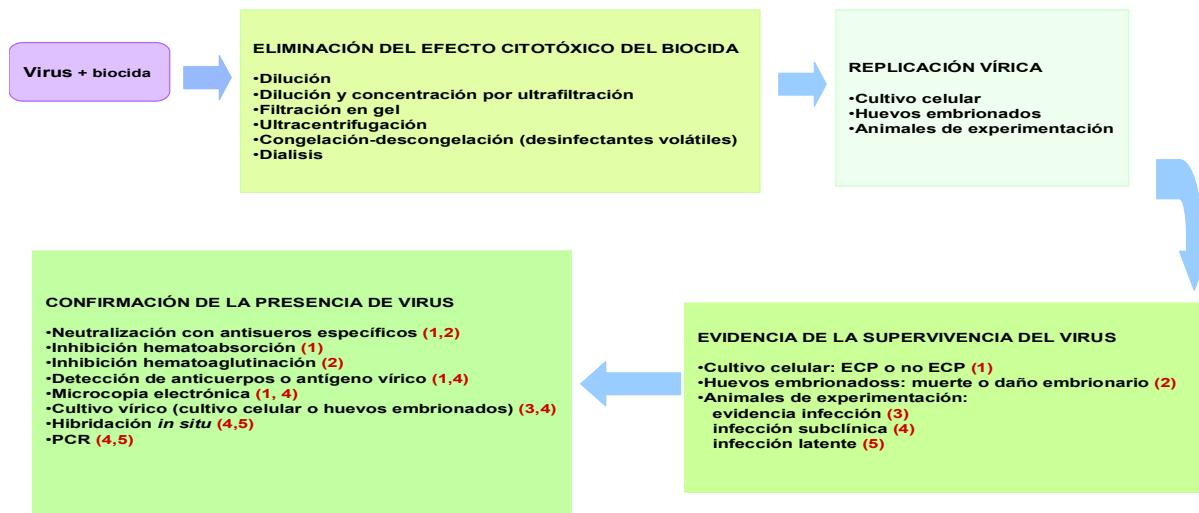
Virus	Virus alternativo
VHB	Virus de la hepatitis B del pato de Pekín (VHBP)
VHC	Virus de la diarrea bovina (VDB)
Norovirus	Calicivirus felino (VCF)
Virus SARS	Coronavirus bovino o virus de la bronquitis infecciosa aviar (VBI)

VHB: virus hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; SARS: virus del síndrome respiratorio agudo.

En la figura 9 se detallan los procedimientos para la evaluación de virucidas, incluyendo los métodos apropiados para confirmar la supervivencia de los virus. Antes de determinar la

cantidad de virus supervivientes, el biocida debe ser eliminado, diluyéndolo a niveles no tóxicos o neutralizándolo. Otras formas de eliminar el biocida son la filtración molecular en gel y diálisis. La evidencia de virus supervivientes o su inactivación por el tratamiento del biocida requiere la inoculación en cultivos celulares, huevos embrionados o animales susceptibles. Cuando se utilizan animales se debe tener en cuenta que éstos deben ser susceptibles de ser infectados por el virus, deben ser *naïves* desde el punto de vista inmunológico y deben tener una edad o estado fisiológico apropiado para evidenciar los signos clínicos o de replicación del virus.

Figura 9: Procedimientos de evaluación de productos químicos con actividad virucida



ECP: efecto citopático

Generalmente, los estudios de actividad virucida más empleados son los estudios de infectividad (cultivo celular). Las condiciones que se deben dar para estos ensayos son: a) utilización de partículas infecciosas completas; b) replicación del virus infeccioso a concentraciones elevadas, c) disponibilidad de células o líneas celulares sensibles al virus, para medir la infectividad residual; d) posibilidad de cuantificar la infección; e) obtención de títulos virales reproducibles; y f) ensayos prácticos para medir la infectividad residual.

La gran heterogeneidad de los virus patógenos para el hombre dificulta la selección de los virus utilizados para evaluar la actividad virucida de los biocidas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos deben ser representativos de las diversas familias de virus patógenos para el hombre, incluyendo virus con y sin envuelta. Además han de ser virus estables y que posean

una cierta uniformidad genética en el tiempo. Los virus más utilizados en los ensayos de actividad virucida son: poliovirus tipo 1 cepa Sabin (virus RNA sin envuelta); *Orthopoxvirus* vacunal (virus DNA con envuelta); y adenovirus tipo 2 i 5 (virus DNA sin envuelta),... No obstante, se ha descrito una mayor sensibilidad de la cepa Sabin LS-c 2ab de poliovirus, cepa atenuada de referencia, que la de las cepas clínicas frente a glutaraldehído alcalino al 2%. Por ello, Cambon et al.⁹³ cuestionan el hecho de que esta cepa de poliovirus, sea la más adecuada para la realización de los estudios de actividad virucida.

En Europa, las normativas sobre actividad virucida de la *Federal Health Agency and German Association against Virus Diseases* (BGA/DVV) en Alemania⁹⁴ y AFNOR en Francia⁹⁵ únicamente empleaban ensayos de suspensión. Actualmente, el CTN 216 tiene en fase de desarrollo ensayos cuantitativos de suspensión y de portagérmenes⁶². Los virus escogidos en este caso son el poliovirus tipo 1 y adenovirus tipo 5, aunque se puede utilizar el parvovirus bovino en la evaluación de los procedimientos de desinfección de instrumental. Por el contrario, en EEUU, la AOAC no ha publicado ningún método para evaluar la actividad virucida. En cambio, la EPA/ASTM requiere la utilización de ensayos con una gran variedad de virus, entre los que se encuentran los causantes de infecciones nosocomiales⁹⁶.

Los hipocloritos son uno de los grupos de desinfectantes más utilizados y activos frente a un gran número de virus con y sin envuelta. Se recomiendan concentraciones de 1.000 ppm para la desinfección general y de 5.000 ppm para las salpicaduras de sangre o cuando hay materia orgánica presente⁹⁶. Respecto a los alcoholes existen ciertas contradicciones. Sin embargo, se considera que los alcoholes inactivan los virus con envuelta.

1.10.3.1. Virus de las hepatitis

1.10.3.1.1. Virus de la hepatitis B

El VHB representa un importante problema sanitario, debido a que los portadores crónicos pueden desarrollar cirrosis y carcinoma hepático. Las infecciones nosocomiales debidas al VHB han sido descritas de paciente a paciente o del personal sanitario a los pacientes, durante el periodo de hospitalización y en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento^{97, 98}. Sin embargo, la mayor parte de la información de la que se dispone actualmente sobre

la inactivación del VHB por biocidas se basa en datos empíricos y en observaciones clínicas retrospectivas.

Hasta hace poco, el efecto virucida del VHB solo se podía determinar *in vivo* en modelos de infección animal en el chimpancé⁹⁹⁻¹⁰¹. Actualmente, se han descrito otros virus de esta familia y modelos animales con aves¹⁰² y más recientemente con roedores^{103, 104}. De todos los modelos animales descritos, el del virus de la hepatitis del pato de Pekín doméstico (VHBP) es el más utilizado para estudios *in vivo*, para la evaluación pre-clínica de fármacos para el tratamiento de la infección crónica, de productos sanguíneos y en estudios de desinfectantes. La titulación vírica y grado de infectividad para la concentración de biocida efectiva se determina mediante hibridación por *Southern blot* en sueros de pato. Ello requiere el uso de radioisótopos^{105, 106}. Actualmente, se están desarrollando protocolos que utilizan hepatocitos embrionarios de pato de Pekín y detección de la infección mediante PCR y PCR en tiempo real, siendo éstas más sensibles para detectar el DNA de VHBP^{106, 107}.

Los métodos *in vitro* para determinar la actividad virucida frente a VHB, bien por ensayos de tipo directo o indirecto, son: a) reactividad antigénica de las partículas virales del VHB o de sus antígenos estructurales (HBsAg, HBcAg y HBeAg) mediante la utilización de EIAs. Es un método sencillo de medir de forma indirecta la eficacia virucida, pero puede detectarse tanto en partículas infectivas (partículas Dane) como defectivas¹⁰⁸; b) actividad enzimática de la DNA polimerasa (DNA-P) del VHB. Algunos autores señalan que este marcador no se correlaciona plenamente con la ausencia o presencia de viriones infectivos^{102, 109}; c) alteración morfológica e integridad física de las partículas virales infecciosas de VHB. Estos ensayos miden los cambios o alteraciones estructurales o morfológicos de los virus mediante microscopía electrónica cuando entran en contacto con un producto biocida¹⁰¹.

Generalmente, los métodos de cultivo celular son los más apropiados para determinar *in vitro* la infectividad vírica. En el caso del VHB únicamente se ha logrado multiplicar el virus en la línea celular de hepatoma humano HEPG2¹¹⁰⁻¹¹². Payan et al.^{111, 112} han conseguido, a diferencia del estudio de Bchini et al.¹¹⁰, un ensayo reproducible y con títulos

virales altos, y describiendo el primer trabajo de evaluación de desinfectantes frente al VHB utilizando un modelo de infectividad con plasma humano y una línea celular.

1.10.3.1.2. Virus de la hepatitis C

El VHC se ha relacionado repetidamente con infecciones nosocomiales que se han puesto de manifiesto mediante técnicas de biología molecular ⁹² y en las que el uso de endoscopios puede ser el principal riesgo ^{19, 113, 114}.

En los últimos años, se ha comunicado la posibilidad de replicación del VHC en cultivo primario de hígado, y más recientemente, su replicación en líneas celulares continuas. Hasta ahora, ninguno de los modelos celulares para la infección de las células con VHC ha sido ampliamente aceptado por problemas de reproductibilidad. Sin embargo, se ha introducido el empleo de células Vero, por la habilidad de éstas para unirse a los receptores de la superficie celular del VHC ¹¹⁵ para la evaluación de desinfectantes que contienen fenol y cloro ¹¹⁶. Por otro lado, se ha sugerido la utilización de la cuantificación del RNA vírico mediante PCR como método de evaluación indirecta de la inhibición del VHC para los ensayos de actividad biocida ¹¹⁷ y alternativa a los métodos tradicionales. Al contrario que en el caso del VHB, no existe un modelo animal para el VHC.

El virus de la diarrea bovina (VDB) se ha escogido como virus alternativo del VHC por ser un flavovirus, al igual que el VHC, y poseer además una estructura genómica y un modo de replicación similar. No obstante, no se dispone de datos sobre la inactivación del VDB en estudios de suspensión cuantitativos para biocidas.

1.10.3.2. Virus de la inmunodeficiencia humana

La desinfección de superficies medioambientales y fomites en el medio hospitalario es generalmente considerada de poca importancia para prevenir la transmisión del VIH, pero la capacidad del virus a sobrevivir en superficies ambientales, líquidos y fomites, en diferentes condiciones y permanecer infeccioso durante varios días ¹¹⁸⁻¹²⁰ no excluye un posible riesgo. Sin embargo, la desinfección de dispositivos médicos como endoscopios se considera crítica, aunque de momento no se conocen casos de transmisión de la infección por VIH por esta vía.

La supervivencia del VIH o pérdida de infectividad puede ser medida mediante ensayos de suspensión o de portagérmenes, aunque los más empleados son los primeros, utilizando virus asociado o no a células (*In vivo*, el VIH esta en forma de virión libre en el plasma o asociado a células)^{118, 120, 121}. La cuantificación de la supervivencia del virus no asociado a células en el medio ambiente puede indicar fragilidad vírica en situaciones reales. Por el contrario, el VIH asociado a células esta protegido por las células o las membranas celulares de éstas.

La evaluación de la actividad virucida de los biocidas frente al VIH presenta varias dificultades de tipo técnico, las cuales difieren de otros virus^{122, 123}. El VIH es un virus de crecimiento lento, que alcanza títulos víricos moderados en cultivo celular y su inactivación por inhibición del ECP en células MT-2 (formación de sincitios) no siempre es definitiva. Para los estudios de infectividad y confirmar la pérdida de la misma por acción de los biocidas, inicialmente se utilizó la actividad de la transcriptasa inversa y posteriormente la detección del antígeno p24 por su mayor sensibilidad^{118, 124}. La presencia de proteínas en el medio de cultivo contribuye a aportar protección al virus e influye en los resultados experimentales¹²⁵.

1.10.4. Actividad micobactericida

Durante años se consideró que el glutaraldehído alcalino al 2% era micobactericida en 10 min. de exposición. Sin embargo, varios estudios demostraron que esto no era cierto. Ello se debe al método empleado para determinar dicha actividad. En EEUU, el método de la AOAC ha sido muy criticado respecto a la cepa y especie de micobacteria empleada, el medio de recuperación de los microorganismos supervivientes y el portagérmenes utilizado¹²⁶⁻¹²⁹. Por ello, la EPA propuso un ensayo de suspensión cuantitativo basándose en los trabajos de Ascenzi et al.^{128, 130}.

Varias y diferentes cepas de micobacterias se han sugerido para los estudios de evaluación de la actividad tuberculicida y micobactericida de los biocidas. *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria muy resistente a los desinfectantes y de gran importancia clínica, pero se tiende a evitar su utilización por su capacidad patógena, su lento crecimiento y la tendencia a formar agregados. Por ello se seleccionan cepas no patógenas y de actividad similar a

M.tuberculosis frente a los biocidas. Las tres micobacterias descritas, hasta el momento, como posible alternativa a *M.tuberculosis* son *M.bovis* BCG, *M.smegmatis* y *M.terrae*^{70, 79}.

Aunque *M.smegmatis* se utiliza en muchos casos en los ensayos de cribaje, varios investigadores coinciden en señalar que este microorganismo no es un buen modelo por ser más sensible a los biocidas que otras micobacterias no tuberculosas como *M.terrae* y que *M.tuberculosis*⁶⁹⁻⁷¹. Los estándares europeos, actualmente en desarrollo, especifican la utilización de distintos tipos de cepas para determinar la actividad micobactericida (*M.terrae* ATCC 15755 y *Mycobacterium avium* ATCC 15769) y la actividad tuberculicida (*M.terrae* ATCC 15755)^{34, 131}, mientras que los de EEUU utilizan *M.smegmatis* y posterior confirmación con *M.bovis* BCG.

Según diversos ensayos, *M.tuberculosis* H37Rv es más resistente a los biocidas que *M.tuberculosis* H37Ra y que *M.bovis* BCG. En estos estudios también se constata la elevada resistencia a los desinfectantes de *Mycobacterium avium- Mycobacterium intracellulare* (MAI) en comparación con *M.terrae* o *M.tuberculosis*^{69, 132-134}. No se aconseja, por tanto, utilizar desinfectantes que sean activos frente a *M.terrae* y no frente a MAI. Por otro lado, el glutaraldehído alcalino al 2% es efectivo frente a *M.tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M.fortuitum* y *M.terrae*^{69,70}, aunque MAI presenta una resistencia al glutaraldehído mayor que *M.tuberculosis*¹³²⁻¹³⁴. Algunas cepas de *M.chelonae* subespecie *abscessus* obtenidas a partir del circuito de agua de máquinas lavadoras para endoscopios son resistentes al glutaraldehído¹³⁵, pero sensibles a la acción del ácido peracético¹³⁶.

1.10.5.- Actividad frente a priones

Los priones o proteínas priónicas (PrP) son los agentes causales de las neuropatías infecciosas crónicas, actualmente conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) tanto en el ser humano (enfermedad clásica de Creutzfeldt-Jakod, síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, enfermedad del insomnio familiar fatal y kuru) como en animales (escrapi, encefalopatía espongiforme bovina o mal de las vacas locas y encefalopatía espongiforme felina). Las EET son desordenes neurológicos degenerativos caracterizados por la acumulación de la proteína priónica celular (PrP^c) o de una forma isomérica anormal de esta proteína (PrP^{sc}).

A partir de lo ocurrido en el Reino Unido en 1996 con la variante de Creutzfeldt-Jakod (vCJ) asociada a la encefalopatía espongiforme bovina, así como la constatación de la transmisión de la infección a través de transfusiones sanguíneas, utilización de material quirúrgico de neurología y electrodos contaminados y el empleo de hormona del crecimiento obtenida a partir de tejido contaminado hizo que se tomaran medidas de prevención ¹³⁷. Aunque, la exposición al hidróxido sódico o la esterilización convencional en autoclave a 121°C durante 20 min. no son completamente efectivas para inactivar los priones, la combinación de los dos procesos sí consigue dicha inactivación. Por ello se recomienda la inmersión del instrumento en hidróxido sódico durante 1 hora seguido de esterilización por calor húmedo a 134°C durante 18 min. En cambio, los compuestos clorados si son activos frente a los priones y se ha aconsejado utilizar soluciones de hipoclorito sódico con 20.000 ppm de cloro libre durante periodos de 1 hora.

Actualmente, existen modelos experimentales del escrapie en ratones y hámsters, que han posibilitado los conocimientos biológicos actuales sobre las EET y los estudios de descontaminación. La infectividad de los priones solo se puede demostrar con bioensayos en animales de laboratorio y el único marcador indiscutible para demostrarla es la proteína PrP27-30 que puede ser detectada post-mortem en tejidos mediante inmunohistoquímica. No existe todavía ningún método de evaluación *in vitro* de los productos biocidas frente a estos agentes, aunque recientemente Fichet et al. ¹³⁸ han publicado un protocolo de contaminación de superficies.

Sin duda, existirá un antes y un después del descubrimiento de los priones en el desarrollo de nuevas metodologías para la evaluación de los biocidas. Ahora, por ejemplo un producto esterilizante es aquel que elimina las esporas bacterianas y los priones, mientras que en la era pre-prionica solo nos referíamos a la destrucción de las esporas bacterianas.

1.11. Resistencia a los biocidas

El término resistencia en el contexto relacionado con antibióticos está claramente definido y relacionado con la CMI. Sin embargo, aunque la CMI posibilita un punto de partida, en el campo de los biocidas es menos relevante. En el caso de los antisépticos las CMI sirven, en primer lugar, para evaluar la actividad antimicrobiana intrínseca de un producto en

comparación con otros; en segundo lugar, para confirmar desde el punto de vista epidemiológico la sensibilidad esperada de las especies microbianas; y por último, para vigilar y evaluar la resistencia de las bacterias a los antisépticos ¹³⁹. En este contexto, el término resistencia a antisépticos y desinfectantes designa a un aislamiento microbiano que no es sensible a la concentración de biocida usada o que no es inactivado (o a veces inhibido) por concentraciones que inhiben o inactivan la mayoría de las cepas de ese microorganismo.

1.11.1.- Mecanismos de resistencia bacteriana

Podemos considerar que, en general, existen dos mecanismos de resistencia a los biocidas. Uno, considerado como un mecanismo de “insensibilidad” intrínseco, cuando el desinfectante es incapaz de alcanzar su diana de acción en concentraciones suficientemente elevadas para producir un efecto letal. Así por ejemplo, las esporas bacterianas, las micobacterias y las bacterias gramnegativas como *P.aeruginosa*, o las del género *Proteus* y *Providencia* son intrínsecamente resistentes a muchos desinfectantes (tabla 14). Esta resistencia, está asociada en gran medida a impermeabilidad celular, aunque también puede ser causada por la existencia de enzimas de tipo degradativo. Una situación especial, es aquella que acontece en las bacterias que integran los *biofilms*, presentan resistencia intrínseca debido a mecanismos resultantes de la adaptación fisiológica o fenotípica de las células.

El otro mecanismo es la resistencia adquirida, ésta puede aparecer como consecuencia de una mutación, o por la adquisición de elementos genéticos externos (plásmidos o transposones). Este tipo de resistencia no se ha asociado a esporas ni a micobacterias, pero sí a bacterias gramnegativas y a estafilococos.

Tabla 14: Mecanismos de resistencia intrínseca bacteriana a antisépticos y desinfectantes

Tipo de resistencia	Ejemplo	Mecanismo de resistencia
Impermeabilidad		
Bacterias gramnegativas	QACs, triclosan, diaminas	Membrana externa actúa de barrera
Micobacterias	Clorhexidina, QACs, glutaraldehído	Pared celular
Esporas bacterianas	Clorhexidina, QACs, fenoles	Cubiertas de la spora y córtex
Bacterias grampositivas	Clorhexidina	Glicocálix/mucoexopolisacárido puede asociarse con difusión reducida del antiséptico
Inactivación (mediada cromosómicamente)	Clorhexidina	Rotura de la molécula de clorhexidina

1.11.1.1.- Mecanismos de resistencia intrínseca bacteriana

1.11.1.1.1. Mecanismos de resistencia para bacterias grampositivas

La pared celular de los estafilococos está compuesta esencialmente por peptidoglicano y ácidos teicoicos, que no impiden la penetración de los biocidas. Las moléculas de elevado peso molecular como la clorhexidina y los QACs atraviesan dicha barrera en el caso de los estafilococos y *Bacillus* spp., lo que explica la sensibilidad de estos microorganismos a la clorhexidina y a los QACs¹⁴⁰.

En la naturaleza, *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus* pueden existir en forma de cepas mucoides, rodeadas de una capa denominada *slime*. En los hospitales, las cepas de *Staphylococcus* productoras de *slime* están frecuentemente implicadas en infecciones relacionadas con la instrumentación de los pacientes, principalmente en las infecciones asociadas a la utilización de catéteres intravasculares (colonización del catéter, flebitis y bacteriemias). El *slime* protege a las bacterias de la acción de los anticuerpos y leucocitos del paciente, y de los antibióticos. Además, el *slime* se une a otros componentes bacterianos y a las proteínas del huésped (albúmina, fibrinogeno, fibronectina y colágeno, entre otras) para constituir un *biofilm* que integre a múltiples microorganismos.

Respecto a los biocidas, las cepas de *Staphylococcus* no-mucoides son más sensibles al cloroxilenol, la cetrimida y la clorhexidina, pero hay poca diferencia en cuanto a los fenoles. La eliminación del *slime* mediante lavado, devuelve la sensibilidad a las cepas mucoides. Por tanto, el *slime*, tiene un papel protector, ya como barrera física a la penetración de los biocidas, ya interaccionando o absorbiendo los biocidas ¹⁴¹.

No hay evidencia de que los ERV con alto grado de resistencia a aminoglicósidos, sean más resistentes a los biocidas que las cepas sensibles a estos antimicrobianos. Sin embargo, los enterococos son generalmente menos sensibles a los biocidas que los estafilococos, y se han encontrado diferencias en las concentraciones bactericidas e inhibitorias entre especies de enterococos ¹⁴².

1.11.1.1.2. Resistencia intrínseca de las bacterias gramnegativas

Las bacterias gramnegativas son más resistentes a los biocidas que las bacterias grampositivas no esporuladas. Existe una marcada diferencia entre la CMI de *S.aureus* y de *E.coli* a los QACs, hexaclorofeno, diamidinas y triclosan, pero poca en cuanto a la clorhexidina. Entre las bacterias gramnegativas *P.aeruginosa* y *Proteus* spp. son las especies más resistentes a estos agentes, incluida la clorhexidina ¹⁴³.

La membrana externa de *P.aeruginosa* es la responsable de su elevada resistencia, con diferencias en su composición lipopolisacárida, así como en el contenido de cationes ¹⁴³. El elevado contenido en Mg^{+2} , provoca una fuerte unión entre LPSs, que unido al pequeño tamaño de sus porinas, no permite la difusión a través de la membrana. *Burkholderia cepacia*, posee un elevado contenido en arabinosa que junto a los fosfatos de sus LPSs disminuye la afinidad de la membrana externa por la polimixina y por otras moléculas policatiónicas ¹⁴⁴. En contraste, *Pseudomonas stutzeri*, es muy sensible a muchos biocidas, lo que implica que tales agentes tienen poca dificultad en atravesar su membrana externa ¹⁴². *Providencia stuartii* es particularmente resistente a los QACs, y a la clorhexidina (mostrando resistencia baja, intermedia o elevada según la cepa). Estos datos han permitido conocer que no son las diferencias en la composición de la membrana externa de estas bacterias el mecanismo implicado en su resistencia, sino los cambios en la disposición estructural de la envoltura celular y que la membrana interna no juega ningún papel en dicha resistencia ¹⁴².

La capa de peptidoglicano de las bacterias gramnegativas es mucho más delgada que la de las grampositivas, pero juega un papel en su resistencia intrínseca. Así, las membranas externas de las bacterias gramnegativas crecidas en concentraciones subinhibitorias de penicilina son más permeables que las producidas por la acción de la penicilina y la lisozima-EDTA-tris; y son rápidamente lisados por la clorhexidina.

También la membrana interna o citoplásmica puede considerarse un mecanismo de resistencia intrínseco. Esta membrana está compuesta por lipoproteínas que impedirían el paso por difusión pasiva de moléculas hidrofílicas. Sin embargo, aunque implicada en la resistencia al etanol (por cambios en la composición)¹⁴², la membrana externa no juega ningún papel en la resistencia de *P.stuartii* a clorhexidina¹⁴⁵. Actualmente se desconoce el alcance de su implicación.

1.11.1.1.3. Mecanismos de resistencia intrínsecos de las micobacterias

Las micobacterias son menos sensibles a los desinfectantes que otras bacterias no esporuladas. Como ya hemos apuntado, la razón para esta resistencia es fundamentalmente la impermeabilidad de su pared celular, que limita la penetración de los biocidas en el interior de la célula¹⁴⁶. No existe evidencia de que se produzca degradación enzimática de las moléculas de biocida, ni se ha demostrado la existencia de resistencia mediada por plásmidos o transposones.

La pared celular de las micobacterias es una estructura hidrofóbica con un esqueleto de micoarabinogalactano-péptidoglicano. El péptidoglicano está unido covalentemente a un polisacárido (arabinogalactano) formado por arabinosa y galactosa eterificados a ácidos micólicos. También contiene complejos lipídicos, LPSs y proteínas, incluyendo porinas a través de las cuales difunden las moléculas hidrofílicas al interior de la célula. Esta estructura es similar para todas las micobacterias estudiadas actualmente, aunque la composición de una especie en particular puede estar influida por las condiciones ambientales. Las micobacterias no tuberculosas están más expuestas a sustancias antibióticas naturales que las micobacterias patógenas primarias como *M.tuberculosis*, siendo más resistentes intrínsecamente a las moléculas biocidas¹⁴². Así, MAI es invariablemente más resistente que otras micobacterias, aunque los mecanismos involucrados son aún desconocidos¹⁴⁷.

Se ha relacionado durante mucho tiempo la resistencia de las micobacterias a los QACs con el contenido lipídico de su pared celular. Así, *Mycobacterium phlei*, con un contenido lipídico escaso, es más sensible que *M.tuberculosis*, que presenta un mayor contenido lipídico ¹⁴². También se relaciona dicha resistencia con el contenido en ceras de la pared celular. Debido a la naturaleza hidrófoba de la pared celular, los biocidas hidrofílicos son generalmente incapaces de penetrar a través de ésta en concentración suficientemente elevada para producir un efecto letal. El etambutol, un inhibidor de la síntesis de arabinogalactano y de fosfolípidos, cambia la arquitectura de la pared y puede ser responsable del incremento de la concentración celular de agentes biocidas. Es probablemente éste el mecanismo por el cual la actividad de la clorhexidina y del cloruro de cetilpiridinio, frente a *Mycobacterium avium* y *M.tuberculosis* es potenciada por el etambutol ¹⁴⁸. El arabinogalactano es, probablemente, uno de los componentes celulares que actúan como una barrera impermeable a la clorhexidina y a los QACs.

Recientemente, se han descrito cepas de *M.chelonae* aisladas de endoscopios con elevada resistencia al glutaraldehído ¹³⁵, pero sensibles al ácido peracético ¹³⁶. Esta resistencia se explicaría por un descenso de los monosacáridos que forman los arabinomananos de la pared celular y que reducen la permeabilidad de dicha pared y por tanto la captación de glutaraldehído ¹⁴⁹.

1.11.1.1.4.- Mecanismos de resistencia intrínseca de las esporas bacterianas

Todas las etapas del proceso de esporulación son un punto de acción para los biocidas y también para la aparición de resistencia a los mismos (tabla 15).

Los estudios de Knott et. al. ^{150, 151} con la cepa salvaje *B.subtilis* 168 y su mutante *Spo-* han permitido conocer en que estadios se desarrolla la resistencia. Así, actualmente se conoce que el orden de desarrollo de resistencias desde el comienzo de la esporulación es para el formaldehído, seguido del laurilsulfato sódico, fenol, clorhexidina y glutaraldehído. Las cubiertas y el córtex de la espora tienen un papel fundamental en la resistencia, como barreras a la permeabilidad y están implicadas, aunque parcialmente, en la resistencia a clorhexidina y a QACs ^{151, 152}.

Tabla 15: Mecanismo o lugar de resistencia de las esporas bacterianas a los compuestos químicos

Compuesto	Componente de la spora	Comentario
Álcali	Córtex	--
Lisozima	Cubierta(s)	Altamente sensibles a UDS
Hipocloritos	Cubierta(s)	Altamente sensibles a UDS
Glutaraldehído	Cubierta(s)	Altamente sensibles a UDS
Ioduros	Cubierta(s)	Altamente sensibles a UDS
Peróxido hidrógeno	Cubierta(s)	Varía con la cepa
Clorhexidina	Cubierta(s)	Esporas UDS más sensibles que las "normales"
Óxido de etileno	Cubierta(s)	Relación exacta poco clara
Octanol	Córtex	Mutantes Dap- de <i>B.sphaericus</i> son más sensibles
Xileno	Córtex	Mutantes Dap- de <i>B.sphaericus</i> son más sensibles

Dap: Ácido diaminopimélico; UDS: Tratamiento con urea, ditiotreitól y lauril sulfato de sodio

La aparición de la resistencia al formaldehído durante la esporulación depende de la concentración de formaldehído usado (1-5% v/v). Esta resistencia tiene lugar en estadios precoces de la esporulación, al contrario de lo que ocurre con el glutaraldehído. Al contener ambos grupos aldehído y actuar como agentes alquilantes, sería lógico pensar que su forma de actuar es idéntica y que tienen el mismo mecanismo de resistencia. Sin embargo, en solución acuosa el formaldehído forma un glicol en equilibrio, por lo que el formaldehído actúa más como un desinfectante tipo alcohol que tipo aldehído. En cambio, el glutaraldehído no forma glicoles en solución acuosa, así pues la resistencia al formaldehído parece estar más ligada a la maduración del córtex y la resistencia al glutaraldehído a la formación de las cubiertas¹⁵⁰.

En el caso de la resistencia a peróxido de hidrógeno, Setlow et al. en 1993¹⁵³, demostraron que las proteínas pequeñas, solubles en ácido (SASPs) recubren el DNA en las esporas salvajes de *B. subtilis* y protegen a las esporas del ataque enzimático y de ciertos agentes antimicrobianos. Las esporas deficientes en proteínas α/β SASPs (α -/ β -) son significativamente más sensibles al peróxido de hidrógeno y al hipoclorito. Se deduce por tanto, que las SASPs contribuyen a la resistencia de las esporas al peróxido de hidrógeno y al hipoclorito, pero que no son los únicos factores implicados, ya que las cubiertas y el córtex también juegan un papel¹⁵⁴.

Las cubiertas de la espora actúan como una barrera a la permeabilidad al cloro. El cloro, por sí mismo, elimina las cubiertas y permite a la lisozima iniciar la germinación ¹⁵². El hidróxido sódico incrementa la permeabilidad de las esporas a los agentes germinantes y la potenciación de la acción del hipoclorito por el hidróxido sódico, puede ser el resultado del efecto del álcali sobre las cubiertas de la espora, de la que eliminaría las proteínas SASPs.

Otros dos aspectos importantes con repercusión en la resistencia intrínseca de las esporas a los biocidas son, por un lado, la supervivencia o el *revival* de las esporas afectadas por los biocidas, y por otro, el efecto de dichos biocidas sobre las esporas germinantes. Aunque ninguno de estos mecanismos es verdaderamente un mecanismo de resistencia, ambos pueden proporcionar información útil sobre el lugar y el mecanismo de acción de los agentes esporicidas, así como sobre los mecanismos de resistencia asociados. El *revival* de las esporas tratadas con desinfectantes ha sido poco estudiado, aunque se ha comprobado que el tratamiento con álcali tras la neutralización del glutaraldehído con glicina, reaviva una pequeña proporción de las esporas tratadas con glutaraldehído ¹⁴². Varios agentes inhiben la germinación, entre ellos los alcoholes, aldehídos, fenoles y cresoles. Los efectos de estos inhibidores pueden ser reversibles, sugiriendo que la unión de estos agentes a los lugares de la superficie de la espora son muy débiles, ya que un lavado es suficiente para que no se produzca la acción del inhibidor ¹⁵⁴.

1.11.1.1.5. Adaptación fisiológica (fenotípica) como mecanismo de resistencia intrínseca

La asociación de un microorganismo con una superficie sólida genera un *biofilm* o capa biológica, definible como un acumulo de microorganismos organizados dentro de un exopolímero polisacárido o glicocálix ¹⁵⁵. Los *biofilms* pueden estar formados por monocultivos, es decir por organismos de una sola especie, de varias especies microbianas o por una mezcla de fenotipos de una especie dada. Estos *biofilms* son importantes porque generan: biocorrosión, agua de escasa calidad y sobretodo por ser posibles focos o reservorios para la contaminación nosocomial. Hay varias razones que explican las diferencias en la resistencia bacteriana en un *biofilm*: a) acceso reducido del desinfectante, b) interacción química entre el desinfectante y el propio *biofilm*, c) producción de enzimas degradativas y neutralizantes químicos, y e) intercambio genético entre las células.

Las bacterias gramnegativas son los microorganismos predominantes en los *biofilms* que se desarrollan en el agua. Aunque estos microorganismos no representan un problema sanitario importante para los pacientes inmunocompetentes, ciertas bacterias como *P.aeruginosa*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter cloacae* pueden causar infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos y pueden estar asociados con la contaminación de dispositivos médicos y ser también transferidas a las manos del personal sanitario.

Existe un amplio número de ejemplos de resistencia a biocidas por la formación de *biofilms*. Así, la supervivencia de *S.marcescens* en soluciones de clorhexidina al 2% y de *P.aeruginosa* contaminando antisépticos iodóforos. Algo semejante ocurre con *B.cepacia* en sondas urinarias o *Legionella pneumophila* en las torres de refrigeración y sistemas de distribución de aguas ¹⁴². En algunos microorganismos como *Staphylococcus epidermidis*, la formación del *biofilm* no es el único factor implicado en la resistencia a antimicrobianos y biocidas, sino que las cepas que producen *slime* son más resistentes a estos agentes ^{156, 157}.

Hace unos años se puso en marcha una estrategia para controlar los *biofilms*, basada en la generación de peróxido de hidrógeno en la interfase superficie-*biofilm* ¹⁵⁸. Sin embargo, muchas bacterias aerobias han desarrollado *in vivo* mecanismos de defensa intrínsecos que confieren tolerancia al estrés por peróxidos (en particular al peróxido de hidrógeno). Este estrés oxidativo o respuesta SOS ha sido bien estudiado en *Salmonella*, *E.coli* y *P.aeruginosa* comprobándose la existencia del papel protector de la catalasa también en estas condiciones, por lo que la eficacia del mecanismo de producción de peróxido de hidrógeno para prevenir la contaminación a partir del *biofilm* no está aclarada ^{159, 160}.

1.11.1.2.- Mecanismos de resistencia adquirida

Como en el caso de la resistencia a los antibióticos, los mecanismos de adquisición de resistencia bacteriana pueden ser consecuencia de mutaciones o de adquisición de material genético externo, ya sea mediante plásmidos o transposones. No obstante, a diferencia de lo que ocurre con los antibióticos, un incremento en la CMI frente a un antiséptico, no se correlaciona necesariamente con un fallo terapéutico. Es necesario evaluar en la resistencia a biocidas, no sólo el incremento en la CMI como consecuencia de la adquisición de un mecanismo de resistencia, sino que hay que tener en cuenta también el efecto pleiotrópico

de la mayoría de los biocidas, su actividad microbiocida, las concentraciones del producto usadas, la aplicación directa del producto y los efectos de la formulación.

1.11.1.2.1. Mecanismos de resistencia plasmídica

En general, la resistencia plasmídica a biocidas no se considera un fenómeno importante, aunque se ha implicado en la resistencia a derivados de plata, otros metales y organomercuriales¹⁴². En concreto, la resistencia a compuestos mercuriales es plasmídica, inducible y puede ser transferida por conjugación o transducción. En las cepas clínicas de *S.aureus* que contienen plásmidos productores de penicilinasa es común la resistencia a los compuestos mercuriales¹⁶¹ y también un incremento de la resistencia a la monocloramina¹⁶⁰. Se han descrito plásmidos que confieren resistencia a derivados de plata en *P.sutzeri* y enterobacterias¹⁴².

Kazama et al.¹⁶² hallaron que la distribución de los genes de resistencia *qacE* y *qacE* delta 1 están presentes en un amplio rango de especies bacterianas gramnegativas. Por otro lado, se ha asociado la aparición de cambios en las proteínas de membrana externa y el incremento de la síntesis de formaldehído deshidrogenasa en *E.coli* y *S.marcescens* con la disminución de sensibilidad a formaldehído¹⁶³. Otros ejemplos son la asociación entre el plásmido R124 en *E.coli* (cuya expresión altera la proteína de membrana externa OmpF) y la resistencia a ceftrimida. También se ha descrito esta asociación con los plásmidos TOM, que codifican enzimas que degradan el tolueno y el fenol en cepas de *B.cepacia*¹⁴².

Staphylococcus aureus es la bacteria en la que mejor se han descrito los aspectos genéticos de resistencia a biocidas. Se sabe que esta resistencia está codificada por al menos tres tipos de determinantes que codifican resistencia a varios compuestos. La familia de genes *qacA* y *qacB* codifican proteínas exportadoras dependientes de protones con homología a otros mecanismos de resistencia existentes para tetraciclinas (tabla 16). El gen *qacA* está presente de forma predominante en la familia de plásmidos de multirresistencia *psKI*, pero también se encuentra en el cromosoma de cepas de origen clínico de *S. aureus* como un plásmido integrado. El gen *qacB* se detecta en plásmidos de resistencia a metales pesados mientras que los genes *qacC* y *qacD*, codifican fenotipos idénticos y tienen homología de lugares de restricción, por lo que se cree que el gen *qacD* ha evolucionado a partir del *qacC*. Un 40% de las cepas de estafilococos plasmocoagulasa negativas contienen los genes *qacA* y *qacC*.

Baquero et al.¹³⁹ han señalado que para los antibióticos, la presencia de un mecanismo específico de resistencia frecuentemente contribuye a la selección a largo plazo de variantes resistentes en condiciones *in vivo*. Sin embargo, se desconoce si la resistencia de bajo nivel a antisépticos catiónicos (clorhexidina, QACs) puede tener una ventaja selectiva en los estafilococos portadores del gen *qacA*.

El efecto de las concentraciones inhibitorias submínimas de los biocidas, frecuentemente usadas en el ámbito hospitalario, sobre la conjugación y transducción del plásmido pWG613 en tres cepas de *S.aureus*, fue estudiada por Pearce et al.¹⁶⁴. Este estudio permitió demostrar que la reducción en la eficiencia de transducción está causada por la acción directa del biocida sobre la cepa receptora, más que sobre el fago. Es pues, importante resaltar que determinados biocidas además de su efecto inhibitor sobre determinadas bacterias, son capaces de disminuir las posibilidades de transmisión de plásmidos de resistencia de una cepa bacteriana a otra.

Tabla 16: Genes *qac* y resistencia a antisépticos y desinfectantes

Determinante de resistencia	Localización genética	Resistencia
<i>qacA</i>	Familia pSK1 de plásmidos multirresistentes, β -lactamasa y familia de resistencia a metales pesados	QACs, sales de clorhexidina, diamidinas, acridinas, bromuro de etidio
<i>qacB</i>	β -lactamasa y plásmidos de resistencia a metales pesados	QACs, acridinas, bromuro de etidio
<i>qacC</i>	Plásmidos pequeños (<3kb) o plásmidos grandes conjugativos	Algunos QACs, bromuro de etidio
<i>qacD</i>	Plásmido grande conjugativo (>50kb), plásmidos de multirresistencia	Algunos QACs, bromuro de etidio

1.11.1.2.2.- Resistencia mutacional bacteriana a biocidas

La resistencia adquirida a un desinfectante, y no codificada por plásmidos, puede ser el resultado de la exposición de esa bacteria al agente químico. Ejemplos de este tipo son sobradamente conocidos para *S.marcescens* y resistencia a QACs; y *E.coli*, *P.mirabilis*,

P.aeruginosa a clorhexidina¹⁶⁵. No obstante, este tipo de resistencia adaptativa no-genética es un fenómeno temporal, aunque se ha confirmado el desarrollo de resistencia estable en *P.stutzeri* a clorhexidina o a QACs tras la exposición gradual a concentraciones cada vez mayores¹⁴⁷. Las cepas resistentes a clorhexidina fueron también más resistentes a triclosan y a algunos antibióticos. Esta resistencia adquirida no fue transferible, indicando que el mecanismo de tal resistencia es inespecífico, y que está relacionado con alteraciones en la membrana externa.

1.11.2.-Problemas potenciales asociados a la resistencia bacteriana a biocidas

En el caso de las bacterias gramnegativas multirresistentes (MDR o *multidrug resistance*) los genes involucrados forman parte de la dotación genómica normal de la célula bacteriana. Se considera un serio problema en bacterias gramnegativas, siendo dichos genes activados por inducción o mutación causadas por varias formas de estrés. George et al.¹⁶⁶ y McMurry et al.¹⁶⁷ han comunicado varios ejemplos de MDR, en el que un operon o gen está asociado a cambios de sensibilidad a los biocidas. Así, el aceite de pino selecciona mutantes Mar (*Multiple-antibiotic-resistant*) en *E.coli* con resistencia a múltiples antibióticos y que sobreexpresan el gen *marA*. La delección de este gen o del locus *acrAB* (que codifica una bomba de expulsión de protones) incrementa la sensibilidad al aceite de pino. Además, la delección del *acrAB*, pero no del gen *mar*, aumentaron la sensibilidad de estas cepas de *E.coli* al cloroxilenol y a los detergentes derivados de QACs. Edgar y Bibi en 1997¹⁶⁸, identificaron la proteína *E.coli* MdfA (transportador multidroga), que confiere mayor tolerancia tanto a antibióticos como a QAC (cloruro de benzalconio).

Así pues, estos hallazgos confirman la selección de un desinfectante por bacterias con resistencia cromosómica a antibióticos, con una potencial implicación en la terapia antimicrobiana. En la actualidad, es difícil trasladar estos hallazgos de laboratorio a la práctica clínica diaria. Algunos estudios han demostrado que las bacterias resistentes a antibióticos no son significativamente más resistentes al efecto bactericida de los biocidas que las cepas sensibles^{147, 165, 169}.

En el caso de los antibióticos, la presencia de un mecanismo de resistencia específico ha contribuido a la selección *in vivo* de mutantes resistentes¹³⁹. Así pues, es probable, pero aún no comprobado, que niveles de resistencia a clorhexidina y a cloruro de benzalconio en

estafilococos puedan otorgar una ventaja selectiva a los microorganismos portadores de los genes *qac*. Una cepa de *S.aureus* aislada hace 50 años contenía el gen *qacB*, mientras que la mayoría de las cepas aisladas en los años 80 contienen el gen *qacA*¹⁷⁰. Se ha inferido que el gen *qacA* ha evolucionado a partir del gen *qacB* y que la introducción de la clorhexidina en la práctica clínica ha sido la responsable de la selección de las cepas que contienen el gen *qacA*. También se ha inferido, pero no probado, que el cloruro de benzalconio induce la expresión de ambos genes, *qacA* y *qacB*, y que la aparición cronológica de esos genes en plásmidos de resistencia en cepas clínicas de *S.aureus* coincide con la introducción y uso de biocidas catiónicos (acridinas, QACs y clorhexidina).

1.11.2.1.- Control de bacterias resistentes a los antibióticos

Varios trabajos han intentado esclarecer los efectos de los biocidas sobre bacterias resistentes a antibióticos¹⁷¹⁻¹⁷³. En ninguno de estos estudios se ha encontrado evidencia de la relación entre resistencia antibiótica y la resistencia a biocidas. Sin embargo, un trabajo reciente señala una eficacia limitada de los desinfectantes de manos basados en clorhexidina frente a cepas de SARM¹⁷⁴.

Actualmente, el incremento de la resistencia bacteriana a antisépticos y desinfectantes no constituye un problema clínico, pero se debe clarificar si los bajos niveles de resistencia a estos agentes constituyen un factor de selección de cepas resistentes a antibióticos tanto en el ambiente hospitalario como en el doméstico¹⁷⁵.

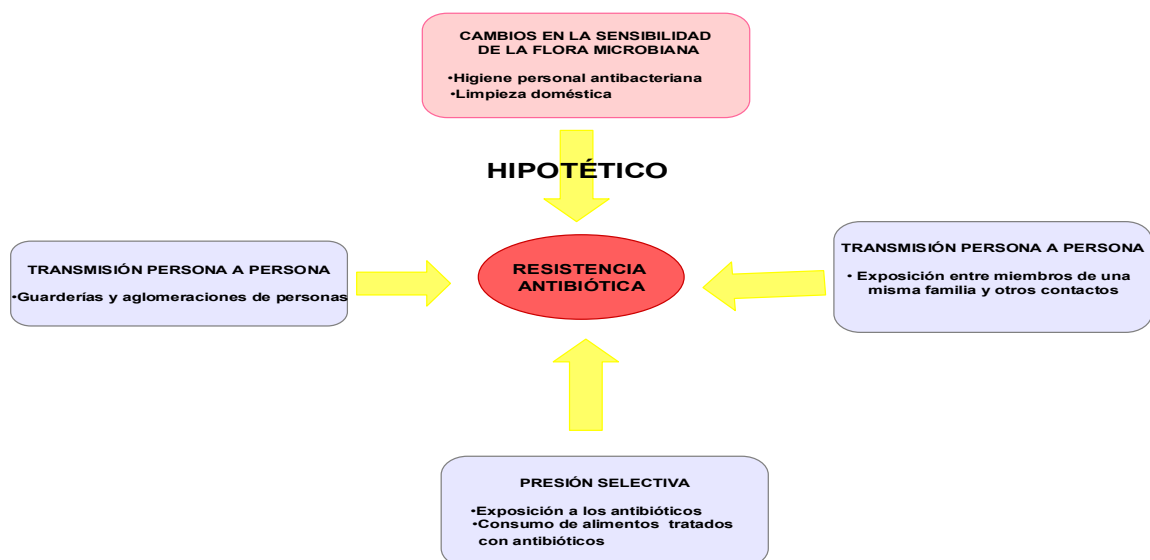
1.11.2.2. Factores de riesgo emergente para la adquisición de resistencia antibiótica bacteriana

Aunque el uso de antibióticos es uno de los factores que afectan más a la tasa de resistencia bacteriana en los hospitales y la comunidad, el uso de productos antibacterianos para la higiene personal y la limpieza doméstica también se ha sugerido como un factor de riesgo para elevar y extender la resistencia a los antimicrobianos. En la actualidad, la resistencia a antibióticos en la comunidad comienza a incrementarse y constituye una amenaza para la salud pública. La vía por la que un individuo puede ser colonizado y posteriormente infectado por microorganismos resistentes a los antibióticos incluye la transmisión persona a persona y la exposición directa a estos microorganismos. Otra vía de transmisión es el uso de antibióticos en la ganadería, que son similares a los antibióticos usados en la práctica clínica y pueden contribuir significativamente al desarrollo de resistencias (figura 10). Una

evidencia de este hecho son las cepas humanas de *Campylobacter* y *Salmonella* resistentes a las fluoroquinolonas que previamente se habían desarrollado en animales ¹⁷⁶.

Generalmente, los antibióticos actúan sobre un lugar específico de la bacteria. Sin embargo, muchos de los productos antibacterianos usados en la limpieza doméstica e higiene personal emplean múltiples dianas de acción para destruir o inhibir el crecimiento bacteriano. Triclosan es un componente ampliamente utilizado en la fabricación de jabones, desodorantes, geles corporales, dentríficos, detergentes para el lavado de la ropa, así como ingrediente de los antisépticos utilizados para el lavado de manos. Aunque el mecanismo de acción de triclosan es inespecífico, también actúa sobre una enoil reductasa implicada en la síntesis de ácidos grasos bacterianos, de forma similar a la de algunos antibióticos, dando lugar a resistencias cruzadas en bacterias como *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* y el gen *InhA* para la isoniacina de *M.smegmatis* y *M.tuberculosis* ¹⁷⁷⁻¹⁸¹. Además, triclosan actúa como sustrato de la bomba de expulsión de *P.aeruginosa*, ocasionando resistencia cruzada con ciprofloxacino, un antibiótico de gran importancia clínica ¹⁸¹. Por todo ello, triclosan y los productos que lo contienen podrían estar implicados en la emergente aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos en la comunidad (figura 10).

Figura 10. Factores que contribuyen a la resistencia antibiótica en la comunidad



1.11.3.- Mecanismos de resistencia fúngica

Se conoce muy poco sobre los mecanismos de resistencia fúngica a antisépticos y desinfectantes en comparación con los de las bacterias. En general, como en el caso de las bacterias, podemos distinguir dos mecanismos de resistencia: intrínseca y adquirida (tabla 17).

Tabla 17: Posibles mecanismos de resistencia fúngica a biocidas

Tipo de resistencia	Posible mecanismo	Ejemplo(s)
Intrínseca	Exclusión	Clorhexidina
	Inactivación enzimática	Formaldehído
	Modulación fenotípica	Etanol
	Bomba de expulsión	No demostrado
Adquirida	Mutación	Algunas sustancias preservantes
	Bomba de expulsión inducible	Algunas sustancias preservantes
	Plásmidos	No demostrado

En el caso de la resistencia intrínseca, el glucano de la pared celular de los hongos, su grosor y el grado de porosidad de la misma están implicados en dicha resistencia. Además, la pared celular de las células en estado estacionario (cultivos viejos) es más resistente a la clorhexidina que las células en fase de crecimiento logarítmico (cultivos jóvenes), habiéndose observado que las primeras captan mucho menos gluconato de clorhexidina ¹⁸².

En cuanto al papel de la membrana plasmática de las levaduras en la resistencia a biocidas, se ha observado que éstas tienen niveles variables de sensibilidad al etanol dependiendo de las condiciones de crecimiento y de la composición de la membrana plasmática. Así, las levaduras con una membrana rica en ácido linoleico son más resistentes al etanol que las enriquecidas con ácido oleico, hecho que permite inferir que la mayor fluidez de la membrana plasmática tiene cierta implicación en dicha resistencia ¹⁴². Respecto a la resistencia adquirida, no hay evidencia hasta la fecha de la existencia de un mecanismo de expulsión, ni de mutaciones, ni de mecanismos mediados por plásmidos.

Existen muy pocos estudios con hongos filamentosos, conociéndose únicamente que son considerablemente más resistentes a la acción de los biocidas que las levaduras, incluso más que las bacterias vegetativas pero menos que las esporas bacterianas. Podría especularse que

la composición de la pared celular de estos hongos les otorga un mecanismo de resistencia intrínseco ¹⁴².

1.11.4- Mecanismos de resistencia vírica

La clasificación clásica de los virus se basa en sus propiedades químicas y físicas, y en su estructura. Sin embargo, cuando se considera su sensibilidad a los biocidas, se pueden distinguir tres grupos de virus (categorías de Klein-de Forest): 1) virus con envuelta, más sensibles a la desinfección química (por ejemplo, VIH); 2) virus sin envuelta de gran tamaño (por ejemplo, adenovirus); y 3) virus sin envuelta de pequeño tamaño (por ejemplo, picornavirus y parvovirus) que son los virus más resistentes a los procedimientos de desinfección (tabla 18).

Los mecanismos de resistencia vírica a los biocidas pueden agruparse en: 1) agregación vírica; 2) adaptación de los virus; adquisición de resistencia o cambios de estado conformacional; y 3) por reactivación de multiplicidad.

Tabla 18: Clasificación de los virus con relación a su sensibilidad frente a los biocidas

Tipo de virus	Categorías de Klein-de Forest	Sensibilidad	Estructura	Familia
Lipídicos (con envuelta)	A	Alta	Ácido nucleico, cápside y envuelta	Herpesvirus <ul style="list-style-type: none"> • Herpes simple • Epstein Barr • Citomegalovirus Retrovirus VIH Paramixovirus <ul style="list-style-type: none"> • Virus respiratorio sincitial Poxvirus <ul style="list-style-type: none"> • Virus vacunal Togavirus <ul style="list-style-type: none"> • VHC Hepadnavirus <ul style="list-style-type: none"> • VHB
No lipídicos (sin envuelta)	C	Moderada	Ácido nucléico	Adenovirus Reovirus <ul style="list-style-type: none"> • Rotavirus
No lipídicos (sin envuelta)	B	Baja	Ácido nucléico y cápside	Picornavirus Enterovirus <ul style="list-style-type: none"> • Virus hepatitis A

La agregación vírica, típica de los virus sin envuelta y frecuente en fluidos corporales y superficies contaminadas hace que los virus localizados en el centro de los *clumps* sean inaccesibles para los biocidas. Este mecanismo explicaría la resistencia del virus de Norwalk a la cloración y la persistencia de infectividad de los poliovirus tratados con formaldehído ¹⁴². De igual forma, en el caso del virus vacunal, rotavirus y enterovirus el número y frecuencia de agregados se correlacionó con el descenso y estado de la curva de supervivencia ¹⁸³. El tamaño de los agregados virales es importante para el desarrollo de resistencias. Así, los *clumps* de reovirus que contienen 16 o más partículas virales probablemente muestran alguna resistencia a los biocidas. Los agregados pueden ser eliminados por sonicación o filtración.

Los virus pueden adaptarse a las condiciones medio-ambientales. Por ello, las concentraciones residuales de un biocida después de la desinfección pueden actuar como fuerza selectiva para la adaptación de los virus (resistencia adquirida), alterando las proteínas de la cápside e implicando cambios en el lugar de acción de los biocidas. Es el caso de los poliovirus y virus ECHO frente a glutaraldehído ¹⁸³.

Los cambios conformacionales en la estructura vírica influyen en la sensibilidad de los virus a la desinfección. Por ejemplo, los virus ECHO poseen tres estados conformacionales dependiendo del pH medio-ambiental, y estos se caracterizan por presentar distinta sensibilidad a la cloración; mientras que el poliovirus tipo 1 posee dos estados conformacionales, A y B, asociados a dos puntos isoeléctricos ¹⁸³.

La reactivación de multiplicidad explicaría el incremento del título vírico de los poliovirus después de la inactivación con hipocloritos. Este fenómeno se debería a una reconstrucción de partículas víricas infecciosas a partir de fragmentos proteicos de la envuelta y de la cápside vírica y ácidos nucleicos no infecciosos ¹⁸³.

2. ARTÍCULOS EN LOS QUE ESTÁ BASADA LA TESIS

“Cuéntame algo, lo olvidaré; muéstramelo, podré recordarlo; implicame en ello y lo comprenderé”.

Proverbio chino

2. ARTÍCULOS EN LOS QUE ESTÁ BASADA LA TESIS

2.1. Artículos preceptivos de reciente publicación

Artículo 1

A Hernández, E Martró, L Matas and V Ausina. In-vitro evaluation of Perasafe[®] compared with 2% alkaline glutaraldehyde against *Mycobacterium* spp. J Hosp Infect 2003; 54: 52-56.

Artículo 2

A Hernández, E Martró, C Puzo, L Matas, C Burgués, N Vázquez, J Castella and V Ausina. In-use evaluation of Perasafe[®] compared with Cidex[®] in fiberoptic bronchoscope disinfection. J Hosp Infect 2003; 54: 46-51.

Artículo 3

A Hernández, E Martró, L Matas, A Jiménez and V Ausina. Mycobactericidal and tuberculocidal activity of Korsorex[®] AF, an amine detergent/ disinfectant product. J Hosp Infect 2005; 59: 62-66.

Artículo 4

E Martró, **A Hernández**, J Ariza, MA Domínguez, L Matas, MJ Argerich, R Martín and V Ausina. Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. J Hosp Infect 2003; 55: 39-46.

2.2. Artículos relacionados con la misma línea de investigación publicados entre los años 1996-2000.

Artículo 5

A Hernández, E Martró, L Matas, M Martín and V Ausina. Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon[®] against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. J Hosp Infect 2000; 46: 203-209.

Artículo 6

A Hernández, FJ Belda, J Domínguez, L Matas, M Giménez, M Caraballo, C Ramil and V Ausina. Evaluation of the disinfectant effect of Solprogel[®] against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). J Hosp Infect 1996; 34: 223-228.

Artículo 7

A Hernández, FJ Belda, J Domínguez, L Matas, M Giménez, M Caraballo, C Ramil and V Ausina. Inactivation of hepatitis B virus: evaluation of the efficacy of the disinfectant Solprogel[®] using a DNA-polymerase activity assay. J Hosp Infect 1997; 36: 305-312.

3. JUSTIFICACIÓN

“Si uno no tiene cualidades para ser un artista, ¿qué otra cosa puede ser sino investigador?”

Max Dellbrück

3. JUSTIFICACIÓN

La desinfección hospitalaria, tanto de instrumentos y superficies como de manos, es un tema de preocupación creciente en la política de prevención de las infecciones nosocomiales. El interés por el tema objeto de la presente Tesis se incrementó considerablemente a raíz de la pandemia del sida, del aumento del número de casos de infecciones por VHB y VHC, y en los últimos años por los casos de vCJ relacionados con la encefalopatía espongiiforme bovina, así como por el aumento de infecciones nosocomiales de tipo epidémico causadas por SARM, enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, ERV, *Acinetobacter baumannii* multirresistente y otras bacterias gramnegativas (*P.aeruginosa*) resistentes a múltiples antibióticos.

En nuestro país, muchos de los responsables hospitalarios, encargados de la compra o del uso de los biocidas, frecuentemente no están especializados en este tema y tienen escasos conocimientos microbiológicos. Por ello, se dejan aconsejar por los fabricantes de los productos y este consejo se basa usualmente en resultados de laboratorio, no siempre completos, y en muchos casos no específicos para las necesidades de los centros sanitarios.

La transmisión de microorganismos infecciosos exógenos puede ser causada por la contaminación de los dispositivos médicos (endoscopios, broncofibroscopios,...) como consecuencia de una inadecuada limpieza y desinfección. También pueden ser debidos a la utilización de un desinfectante con un espectro de acción inadecuado, al uso de concentraciones menores de las requeridas y a fallos en los tiempos de desinfección aplicados, entre otros factores. Estos hechos se pueden evitar en parte si se utilizan desinfectantes que en diferentes estudios *in vitro* y “en uso” práctico demuestren su eficacia.

Otro tipo de transmisión es la relacionada con la contaminación microbiana de las superficies ambientales. Ha sido demostrada la transmisión a las manos a partir de las superficies inanimadas, pero es difícil implicar, aunque existen consistentes sospechas, a este tipo de transmisión como causa de infecciones en el hombre. Probablemente este tipo de adquisición de infección este sobreestimado, pero no cabe duda de que la limpieza y desinfección de superficies (suelo, paredes,...) contribuye a eliminar la carga microbiana y por tanto a reducir el posible riesgo de transmisión nosocomial.

En los últimos años se han cuestionado reiteradamente los métodos de desinfección y los desinfectantes utilizados en los hospitales. Ello ha sido motivado por diversas causas: 1) los efectos tóxicos de muchos desinfectantes para el personal que los manipula, y en especial el glutaraldehído alcalino al 2%; 2) la aparición de nuevos casos de infección cruzada y de pseudoinfección debidos a una incorrecta limpieza y desinfección del instrumental médico y quirúrgico, así como de los BFs; 3) al gran aumento experimentado en la demanda de exploraciones endoscópicas en pacientes inmunodeprimidos.

El empleo rutinario de desinfectantes del grupo de los aldehídos (glutaraldehído alcalino al 2% y glutaraldehído fenolato 1:16 y 1:8, entre otros) ha provocado problemas alérgicos de tipo respiratorio y cutáneo en muchos de los trabajadores que se dedican a la desinfección de instrumental o equipos médicos y ello ha generado el desarrollo de medidas para reducir los niveles de exposición. Este hecho ha contribuido a que muchos fabricantes busquen activamente nuevos desinfectantes químicos que sustituyan a los aldehídos.

Las críticas recibidas por algunos métodos de evaluación *in vitro* de los biocidas, motivados por: 1) la falta de reproductibilidad de algunos ensayos, 2) el tipo de microorganismos utilizados y 3) la falta de estandarización, ha hecho que se revisen muchos métodos de evaluación y protocolos de desinfección. La incorporación de nuestro país a la CEE y la aprobación de directivas comunitarias específicas sobre este tema hará posible en unos pocos años que los biocidas fabricados o distribuidos en Europa cumplan unos requisitos de eficacia contrastados e idénticos en todos los países. También será posible disponer de listados de principios activos o productos comercializados que cumplan la normativa europea y que puedan ser consultados por los usuarios de forma rápida y eficaz. Son de esperar también la elaboración de guías o de protocolos por organismos o entidades europeas que se basen en productos que cumplan la legislación europea vigente. Actualmente, en muchos hospitales y centros de salud españoles se siguen las recomendaciones de los CDC y las guías de la APIC sobre el uso de antisépticos y desinfectantes; éstas se basan en normativas americanas muy diferentes a las europeas y cuyos criterios de interpretación tampoco coinciden mayoritariamente con los europeos. Un ejemplo ilustrativo es el caso del OPA; en EEUU se recomienda como desinfectante para la desinfección de alto nivel en 12 min. de contacto, en Canadá y Australia en 10 min., mientras que en Europa, Asia y Latinoamérica en 5 min.

Otro motivo de preocupación en las últimas décadas es la aparición de brotes nosocomiales debidos a microorganismos multirresistentes difíciles de erradicar, fundamentalmente bacilos gramnegativos, en ciertas unidades de hospitalización y que incluso han obligado al cierre de algunas de estas áreas. En estos casos la desinfección de las superficies es importante, pero también lo es la desinfección de las manos del personal sanitario que trabaja en estas unidades. La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un fenómeno muy extendido debido al uso indiscriminado de antibióticos en humanos y animales, pero existe la posibilidad teórica de que la amplia utilización de antisépticos y desinfectantes en los hospitales pueda contribuir también a la selección de bacterias resistentes a los antibióticos.

La presente Tesis se inscribe dentro de este cuestionamiento general sobre los biocidas, antisépticos y desinfectantes, ya que pretende profundizar en el conocimiento de la actividad antimicrobiana y el espectro de acción de algunos desinfectantes comercializados, unos ampliamente utilizados y otros de aparición más reciente o en fase de desarrollo, para la desinfección de material semicrítico y superficies. Asimismo, también se incluye el estudio de la actividad antimicrobiana *in vitro* de antisépticos usuales en la práctica clínica.

4. OBJETIVOS

“¡No os dejéis contagiar por un escepticismo estéril y negativo! ¡No desanimaros por la tristeza de ciertas horas que caen sobre las naciones! Vivid en la paz serena de los laboratorios y de las bibliotecas. Preguntaros, ante todo: ¿Qué he hecho yo por instruirme?, y después, según vayáis avanzando gradualmente: ¿Qué he hecho yo por mi patria? Hasta que llegue un día en que alcancéis la inmensa felicidad de pensar que habéis contribuido de algún modo al progreso y a la dicha de la humanidad...”

Louis Pasteur

4. OBJETIVOS

El marco conceptual y experimental de la presente Tesis se enmarca en la evaluación de la eficacia de diferentes desinfectantes comercializados y empleados en la desinfección en frío de materiales semicríticos y superficies, así como de antisépticos frente a diversos microorganismos de acuerdo a los siguientes objetivos:

1. Evaluar mediante estudios *in vitro* y “de uso” la eficacia de nuevos desinfectantes de alto nivel frente a *M. tuberculosis* y otras especies del género *Mycobacterium*.
 - 1.1. Realizar estudios comparativos de evaluación *in vitro* (ensayos de suspensión y de portagérmenes) frente a diferentes especies del género *Mycobacterium* del ácido peracético al 0.26% y del glutaraldehído alcalino al 2%.
 - 1.2. Evaluar los mismos desinfectantes en estudios de “uso simulado” con BFs contaminados artificialmente con *M.tuberculosis* y MAI.
 - 1.3. Evaluar *in vitro* (estudios de suspensión cuantitativos y de portagérmenes) un nuevo desinfectante del grupo de las aminas (dodecil propileno triamina y lauril propileno diamina) frente a diferentes especies del género *Mycobacterium*, incluyendo *M.tuberculosis* y MAI. Realizar estos estudios en presencia y ausencia de materia orgánica.

2. Evaluar mediante estudios *in vitro* (estudios de suspensión cuantitativos de acuerdo con el *European Standard* EN 1040) diferentes antisépticos y desinfectantes frente a cepas de *A.baumannii* multirresistentes a los antibióticos. Las cepas estudiadas son representativas de cuatro clones (A, B, D y E) aislados del medio ambiente y de diferentes tipos de muestras clínicas en el transcurso de un brote epidémico, prolongado en el tiempo, que afectó a pacientes de la *Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge*. Los clones A y B, predominantes entre 1992 y 1996, eran sensibles a las carbapenemas y al sulbactam. El clon E apareció en 1996 y presentaba una sensibilidad disminuida al imipenem. Finalmente, en 1997, apareció el clon E que era resistente a todos los betalactámicos y solo conservaba su sensibilidad a colistina.

A parte del interés conceptual de poder estudiar la susceptibilidad *in vitro* frente a diferentes sustancias biocidas de una bacteria multirresistente de importancia creciente como patógeno nosocomial, existía el interés adicional de poder comprobar si la adquisición progresiva de resistencia a antibióticos betalactámicos se acompañaba también de adquisición de resistencia a determinados biocidas.

3. Estudiar *in vitro* (ensayos de suspensión cuantitativos y de portagérmenes) la actividad bactericida, micobactericida, esporicida, fungicida y virucida, siguiendo las normativas AFNOR, de un desinfectante comercializado a base de ácido peroxigénico (Virkon[®]). Este tipo de estudios pueden considerarse representativos de las pruebas preliminares exigibles para poder catalogar un nuevo producto desinfectante como de alto nivel, de nivel intermedio o de bajo nivel.
4. Finalmente, realizar estudios para evaluar la eficacia de algunos biocidas frente a virus con envoltura, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) y el virus de la hepatitis B (VHB).
 - 4.1. En el primero de estos estudios se evaluó la actividad del dicloroisocianurato sódico, a diferentes concentraciones y tiempos de contacto, frente al VIH-1 utilizando una prueba de suspensión cuantitativa.
 - 4.2. En el segundo, se evaluó la actividad del mismo compuesto frente al VHB. La evaluación de los desinfectantes frente a estos virus se realizaba clásicamente mediante estudios *in vivo* en chimpancés con infección experimental con los inconvenientes y elevados costes que este tipo de estudios comportan. En este estudio se evaluó la eficacia de un producto desinfectante frente al VHB midiendo la inhibición de la actividad de la DNA polimerasa del virus por acción del desinfectante. Se trata de una nueva aproximación práctica para evaluar, de una manera sencilla y reproducible, la eficacia de los biocidas frente al VHB.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”

Miguel de Cervantes

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se dividen en 4 partes:

1. Evaluación mediante ensayos *in vitro* de la actividad biocida de los desinfectantes utilizados o indicados para la desinfección de alto nivel.
2. Eficacia de los desinfectantes de alto nivel empleados con dispositivos médicos mediante ensayos de “uso simulado” (contaminación experimental de BFs).
3. Evaluación *in vitro* de productos biocidas utilizados en la desinfección higiénica de manos y de superficies con microorganismos multirresistentes a antibióticos implicados en brotes nosocomiales.
4. Ensayos de inactivación de virus implicados en la adquisición de infecciones nosocomiales.

En primer lugar se demostró la actividad antimicrobiana de algunos desinfectantes comercializados, libres de aldehídos y empleados o recomendados por sus fabricantes para la desinfección de alto nivel de los dispositivos médicos. Se determinó la actividad micobactericida y tuberculocida. Inicialmente se optimizaron los ensayos de suspensión cuantitativa y actividad básica y posteriormente se realizaron ensayos con sustancias interferentes para detectar el descenso de la actividad antimicrobiana. Por último se determinó la actividad biocida con métodos cuantitativos con portagérmenes.

A continuación se realizaron ensayos de “uso simulado”, con dispositivos médicos y condiciones semejantes a los que se encontraran los desinfectantes de alto nivel que pasaron los ensayos *in vitro*.

También, se buscó una posible correlación entre la resistencia a los antibióticos y el empleo de biocidas en cepas de bacterias gramnegativas implicadas en un brote nosocomial, analizando la actividad biocida básica para desinfectantes de superficies y antisépticos con o sin base alcohólica.

Posteriormente, se estableció el espectro de actividad del ácido peroxigénico. Para ello se necesitó poner a punto cada una de las metodologías estandarizadas descritas en las normativas AFNOR.

Finalmente, se demostró la capacidad de inactivación o pérdida de infectividad vírica de los desinfectantes que contienen cloro y su eficacia en la desinfección de superficies. Para ello se incluyeron patógenos de gran impacto económico y social como el VIH y el VHB. Es esencial la selección de virucidas apropiados y de aplicación efectiva para reducir la transmisión nosocomial de estas enfermedades víricas.

Se ha intentado unificar la expresión de los resultados de los diferentes estudios, de acuerdo a las recomendaciones establecidas en cada una de las normativas. En caso de que no existiera normativa, a la expresión más sencilla e inteligible posible.

5.1. Evaluación de la actividad biocida de los desinfectantes utilizados para la desinfección de alto nivel

6.1.1. Actividad micobactericida de los biocidas utilizados en la desinfección de alto nivel

El resurgimiento de la tuberculosis en los países industrializados y en vías de desarrollo fue descrito a principios de la década de los 90^{184, 185}. Esta reaparición se consideró asociada a la ineficacia de los programas de vacunación, a la falta de efectividad de los fármacos, a la infección por VIH y a la enfermedad relacionada con la emigración. Sin embargo, *M.tuberculosis* no es la especie de micobacteria más frecuentemente implicada en las infecciones hospitalarias. Especies ampliamente distribuidas en el medio ambiente como MAI, *M.fortuitum* y *M.chelonae* pueden infectar a pacientes debilitados o inmunodeprimidos y han sido identificadas como causa de infecciones nosocomiales. La transmisión de infecciones por micobacterias asociadas a dispositivos médicos y atribuidas a una inadecuada descontaminación ha sido descrita, y son el resultado de una inadecuada limpieza en los procedimientos de desinfección de alto nivel^{1, 2, 186-188}. Las micobacterias, como ya se ha mencionado, son más resistentes a la desinfección química que las bacterias vegetativas y los virus, pero son más sensibles que las esporas bacterianas¹⁴⁶. Por su composición estructural, que incluye los ácidos micólicos y lípidos complejos, la pared celular de las micobacterias actúa de barrera impermeable que limita el paso de los biocidas dentro de la célula a niveles más bajos de los requeridos para producir un efecto letal. Sin embargo, las micobacterias no tuberculosas frecuentemente muestran una resistencia significativa a los desinfectantes^{52, 146}.

La actividad micobactericida y tuberculocida se considera un marcador para seleccionar los desinfectantes de nivel intermedio o de alto nivel que se utilizan con dispositivos médicos termosensibles como los endoscopios¹⁸⁹. La metodología utilizada en los estudios *in vitro* presentados se basa en los trabajos descritos previamente por Best et al.^{71, 190} y en nuestra propia experiencia, debido a la no existencia de normativas europeas para la evaluación de la actividad micobactericida básica (fase 1) y específica (fase 2) disponibles en el momento de realización del estudio y a las innumerables críticas que han recibido los ensayos americanos de la AOAC^{127, 130}. Sin embargo, recientemente se ha publicado un borrador europeo para la fase 2/ etapa 1 y desinfectantes que se utilicen en la desinfección de dispositivos médicos tanto para ensayos de suspensión como de portagérmenes^{34, 37, 131}. Estas normativas utilizan cepas de micobacterias no tuberculosas de referencia como *M.terrae* (alternativa de *M.tuberculosis*) y *M.avium*. En cambio, nosotros evaluamos la actividad micobactericida usando *M.tuberculosis*, *M.fortuitum*, *M.kansasii*, *M.chelonae* y MAI, debido al incremento del número de aislamientos de estas especies asociadas a pacientes con sida, infecciones nosocomiales, endoscopia y dispositivos médicos. El criterio para cumplir el ensayo europeo requiere una reducción de 5 y de 4 log₁₀ para el ensayo de suspensión y de portagérmenes cuantitativos, respectivamente. En nuestro caso, el criterio establecido fue similar para la prueba de suspensión, pero fue más riguroso para la de portagérmenes (reducción de 5 log₁₀).

5.1.1.1. Estudio *in vitro* de evaluación comparativa de Perasafe[®] con glutaraldehído alcalino al 2% frente a *Mycobacterium* spp (artículo 1)

El ácido peracético ha sido recomendado por la FDA como desinfectante de alto nivel, por su amplio espectro de actividad, escasa inactivación en presencia de materia orgánica y reducida toxicidad⁴⁹. Es soluble en agua y lípidos, y su descomposición da lugar a productos no tóxicos. Es un compuesto oxidante y puede ser corrosivo, aunque las formulaciones contienen aditivos o se utilizan en máquinas lavadoras-desinfectadoras para mitigar este problema.

Perasafe[®] es una formulación mixta definida por el fabricante como un sistema de peroxígeno que genera iones peracetil a pH 8 equivalentes a un 0.26% de ácido peracético. La solución también contiene peróxido de hidrógeno y ácido acético. El producto esta

indicado para usarse a temperatura ambiente y para la desinfección manual de los dispositivos médicos, pudiendo ser una alternativa barata al glutaraldehído alcalino.

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad micobactericida y tuberculicida de Perasafe[®] en ensayos cuantitativos de suspensión y portagérmenes, y comparar esta actividad con la del glutaraldehído alcalino al 2%.

De los desinfectantes utilizados Perasafe[®] y Cidex[®], únicamente el primero requirió dilución. Se diluyó en agua destilada estéril para los ensayos de suspensión y con agua de dureza estándar (200 ppm de Ca₂CO₃) en los de portagérmenes. Para los ensayos de suspensión, el producto se preparó un 10% más concentrado, para alcanzar así la dilución de uso después de añadir el inóculo. Cidex[®] fue activado para incrementar el pH de la solución utilizando el activador proporcionado por el fabricante y evaluado a partir de la dilución de uso.

Las micobacterias empleadas en el estudio fueron: *M.tuberculosis* H37 Rv (ATCC 9360), *M.chelonae* (ATCC 35752) y aislamientos clínicos de MAI (ref. 104) y *M.fortuitum*. Una vez crecidos los cultivos, las colonias se recogieron y depositaron en tubos estériles para su homogenización con perlas de vidrio. Posteriormente, se añadió 10 ml de diluyente, solución de Ringer ¼, y se ajustó la suspensión espectrofotométricamente a 620 nm: 0.70 para *M.tuberculosis* y 0.35 para MAI, *M.fortuitum* y *M.chelonae* para obtener de 10⁷-10⁸ ufc/ml.

Antes de la realización del ensayo de actividad antimicrobiana se buscó el neutralizante más apropiado; éste fue una solución de Ringer ¼ que contenía Tween 80 al 0.05% y tiosulfato sódico al 0.5%, para ambos desinfectantes. Las concentraciones bacterianas de los inóculos iniciales estuvieron comprendidas entre 1.05x10⁷-1.72x10⁸ ufc/ml. El método de dilución-neutralización y el neutralizante empleado fueron efectivos para inhibir la actividad residual del desinfectante y no afectar al crecimiento de las micobacterias para el método de suspensión y de portagérmenes (tablas 19 y 20).

Tabla 19: Método de dilución-neutralización. Ensayo de suspensión cuantitativo

Microorganismo	Perasafe®			Cidex®		
	N	n	n'	N	n	n'
MAI	4.60x10 ⁸	5.08x10 ⁸	4.17x10 ⁸	5.9x10 ⁸	1.95x10 ⁸	2.01x10 ⁸

N: inóculo inicial (ufc/ml); n: contaje supervivientes del procedimiento de dilución-neutralización (ufc/ml); n': contaje supervivientes tras contacto neutralizante (ufc/ml).

Tabla 20: Método de dilución-neutralización. Ensayo de portagérmenes cuantitativo

Microorganismo	Perasafe®			Cidex®		
	N	n	n'	N	n	n'
<i>M.fortuitum</i>	1.2x10 ⁹	1x10 ⁹	7.25x10 ⁸	1.27x10 ⁹	1.63x10 ⁹	1.16x10 ⁹

N: inóculo inicial (ufc/ml); n: contaje superviviente procedimiento de portagérmenes (ufc/ml); n': contaje supervivientes tras contacto neutralizante (ufc/ml).

En el ensayo de suspensión la actividad micobactericida y tuberculocida se determinó por comparación del crecimiento de la suspensión control y de las micobacterias supervivientes a la acción del desinfectante, expresados como factor de reducción logarítmico del número de ufc/ml para cada tiempo de contacto. En el ensayo de portagérmenes se expresó como factor de reducción logarítmico del número de ufc por portagérmen. Se consideró que un desinfectante fue micobactericida o tuberculocida cuando consiguió un factor de reducción $\geq 5 \log_{10}$ respecto al inóculo inicial.

Los resultados de actividad micobactericida y tuberculocida del ensayo de suspensión se muestran en las tablas 21 y 22. Perasafe® fue micobactericida para las 4 especies de micobacterias estudiadas en 5-10 min. en ausencia de materia orgánica, y de 5-20 min. en presencia de ésta. El aislamiento clínico de MAI requirió tiempos de exposición superiores a 30 min. para conseguir el mismo factor de reducción logarítmico, siendo por tanto el microorganismo más resistente. Cidex® consiguió un factor de reducción $>5 \log_{10}$ en ausencia de materia orgánica, pero la actividad micobactericida y tuberculocida se vió sustancialmente reducida en presencia de ésta, por lo que fue necesario incrementar los tiempos de exposición a más de 30 min., excepto en el caso de *M.fortuitum*.

Tabla 21: Actividad micobactericida y tuberculocida de Perasafe® en ensayos de suspensión.

Micobacteria	Carga orgánica	Tiempo de contacto (min.)	Contaje inicial (Log ₁₀)	Nº supervivientes	Reducción log ₁₀
MAI	-	5	8.16	NC	> 5
	CTF	20	7.88	NC	> 5
<i>M.tuberculosis</i> H 37 Rv	-	10	7.20	NC	> 5
	CTF	10	7.02	NC	> 5
<i>M.fortuitum</i>	-	10	8.17	5x10 ²	> 5
	CTF	10	8.17	1x10 ²	> 5
<i>M.chelonae</i>	-	5	7.95	NC	> 5
	CTF	5	7.95	NC	> 5

CTF: caldo triptosa fosfato (7.6 g/l); NC: no detección de crecimiento (límite de detección <50 ufc/ml).

Tabla 22: Actividad micobactericida y tuberculocida de Cidex® en ensayos de suspensión

Micobacteria	Materia orgánica	Tiempo de contacto (min.)	Contaje inicial (Log ₁₀)	Nº supervivientes	Reducción log ₁₀
MAI	-	5	8.24	NC	> 5
	CTF	30	8.13	1.5x10 ³	4.96
<i>M.tuberculosis</i> H 37 Rv	-	10	7.00	NC	> 5
	CTF	30	6.96	NC	> 5
<i>M.fortuitum</i>	-	5	8.00	NC	> 5
	CTF	5	7.91	1x10 ²	> 5
<i>M.chelonae</i>	-	5	8.20	NC	> 5
	CTF	30	8.00	NC	> 5

CTF: caldo triptosa fosfato (7.6 g/l); NC: no detección de crecimiento (límite de detección <50 ufc/ml).

En las tablas 23 y 24 se indican los resultados obtenidos para los ensayos con portagérmenes con los dos desinfectantes. Perasafe® demostró un factor de reducción superior a 5 log₁₀ frente a MAI, *M.tuberculosis* y *M.chelonae* en 5 min. sin caldo triptosa fosfato, y de 5-10 min. en presencia de éste. No obstante, se requirieron 20 min. de exposición para conseguir este factor de reducción con *M.fortuitum* sin materia orgánica y 4.83 log₁₀ en 30 min. de contacto en su presencia. Cidex® fue micobactericida y tuberculocida con y sin materia orgánica en 5-10 min.

Tabla 23: Actividad micobactericida y tuberculocida de Perasafe® en ensayos de portagérmenes.

Micobacteria	Materia orgánica	Tiempo de contacto (min.)	Contaje inicial (Log ₁₀)	Nº supervivientes	Reducción log ₁₀
MAI	-	5	7.13	NC	> 5
	CTF	10	7.21	NC	> 5
M.tuberculosis H 37 Rv	-	5	6.32	NC	> 5
	CTF	10	6.02	NC	> 5
M.fortuitum	-	20	7.10	NC	> 5
	CTF	30	7.04	1.60x10 ²	4,83
M.chelonae	-	5	7.06	NC	> 5
	CTF	5	7.00	NC	> 5

CTF: caldo triptosa fosfato (7.6 g/l); NC: no detección de crecimiento (límite de detección <1.5 ufc/portagérmen).

Tabla 24: Actividad micobactericida y tuberculocida de Cidex® en ensayos de portagérmenes

Micobacteria	Materia orgánica	Tiempo de contacto (min.)	Contaje inicial (Log ₁₀)	Nº supervivientes	Reducción log ₁₀
MAI	-	5	6.96	NC	> 5
	CTF	10	6.92	NC	> 5
M.tuberculosis H 37 Rv	-	5	5.78	NC	> 5
	CTF	5	6.74	NC	> 5
M.fortuitum	-	5	7.06	NC	> 5
	CTF	5	7.01	NC	> 5
M.chelonae	-	5	7.00	NC	> 5
	CTF	10	7.01	NC	> 5

CTF: caldo triptosa fosfato (7.6 g/l); NC: no detección de crecimiento (límite de detección <1.5 ufc/portagérmen).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que Perasafe® es micobactericida y tuberculocida en 20 min. de contacto frente a todas las especies de micobacterias estudiadas. Sin embargo, Cidex® solo fue efectivo en 30 min.

En general, los resultados obtenidos en el ensayo de suspensión son similares a los de otros autores, aunque existen pocas publicaciones sobre la actividad micobactericida y tuberculocida del ácido peracético y las publicaciones existentes están realizadas con diferentes métodos y cepas, dificultando la comparación de los resultados. Lyman et al.¹³⁶ informaron que Nu-Cidex® (ácido peracético al 0.35% y peróxido de hidrógeno al 0.96%)

tiene una acción más rápida que el glutaraldehído alcalino al 2% frente a varias especies de micobacterias. Otros autores confirman estos resultados para *M.tuberculosis* (incluyendo cepas multirresistentes) y MAI después de 4-5 min.^{69, 134}. Cidex PA[®], un producto que contiene una mezcla de 0.07% de ácido peracético y 1% de hidróxido sódico consiguió un factor de reducción de 6 frente a cepas de *M.chelonae* (incluyendo *M.chelonae* var. *abscessus*, cepa resistente a glutaraldehído) después de 20 min.¹⁹¹. Por el contrario, Perasafe[®] que contiene un 0.26% de ácido peracético demostró actividad micobactericida y tuberculocida, pero esta actividad no fue tan rápida como en el caso de Nu-Cidex[®] y Cidex PA[®].

Varios estudios han demostrado que el glutaraldehído alcalino al 2% es efectivo frente a *M.tuberculosis* y *M.fortuitum*. Griffiths et al.¹⁹² comprobaron que este desinfectante destruye *M.tuberculosis* en 10 min., mientras que otros autores^{133, 134} comunican tiempos de 20-30 min. En el presente estudio se requirieron 5-10 min. de contacto para reducir las células supervivientes de *M.tuberculosis* y obtener un factor de reducción de 5 log₁₀ a temperatura ambiente. MAI fue mucho más resistente a la acción del glutaraldehído, hallazgo descrito previamente en otras publicaciones^{69, 133, 134, 191, 193}. En este estudio la cepa de *M.fortuitum* empleada fue muy sensible, siendo micobactericida en 5 min. con y sin presencia de materia orgánica. El aislamiento de *M.chelonae* utilizado en el estudio era sensible al glutaraldehído alcalino, pero requirió un tiempo de exposición elevado. Contrariamente, Griffith et al.¹⁹⁴ señalan que 1 min. de contacto es suficiente para *M.chelonae*.

En conclusión, Perasafe[®] puede ser un producto alternativo al glutaraldehído alcalino al 2% para la eliminación de micobacterias. No obstante, se requieren futuros estudios de “uso simulado” de desinfección de alto nivel para evaluar su eficacia y compatibilidad con los dispositivos médicos.

5.1.1.2. Estudio *in use* de evaluación de Perasafe[®] comparado con Cidex[®] en la desinfección de BFs (artículo 2)

El BF es un instrumento de fibra óptica que permite la visualización y la toma de muestras del árbol traqueobronquial. Desde su aparición a finales de la década de los sesenta ha representado un importante avance para la neumología, por sus numerosas indicaciones

diagnósticas y terapéuticas. Es un objeto semicrítico termosensible, que requiere una desinfección de alto nivel, es decir, se debe conseguir la completa eliminación de bacterias, virus, hongos y micobacterias⁴⁹.

La broncoscopia es una prueba que en la actualidad apenas tiene complicaciones. Las complicaciones infecciosas post-broncoscopia son raras, pero suelen ser causadas por la transmisión de microorganismos de un paciente a otro a través de un BF contaminado^{1, 54, 186, 187, 195, 196}. En muchos casos esto es debido al elevado índice de rotación de los equipos de broncoscopia, que hace que los tiempos entre uso y uso deban ser cada vez más cortos y que este hecho repercuta en el tiempo de inmersión del BF en el desinfectante, en el proceso de limpieza o en otros aspectos del procedimiento de desinfección. La realización de broncoscopias con BFs contaminados, puede ocasionar también la contaminación de las muestras tomadas para estudios microbiológicos, con la consiguiente obtención de resultados falsos positivos, lo que se conoce como pseudoinfección⁴⁹. La pseudoinfección conduce a diagnósticos erróneos y a tratamientos innecesarios. También puede dar lugar a una pseudoepidemia hospitalaria cuando afecta a varios pacientes y suponen una inversión de tiempo y un elevado coste económico para la detección y erradicación de la causa de la misma.

Las infecciones cruzadas por micobacterias son muy difíciles de demostrar por los largos periodos de incubación que requieren. No obstante, diferentes casos de infección cruzada por *M.tuberculosis*^{2, 186, 196}, MAI⁴⁹, *M.gordonae*¹⁹⁷ y *M.chelonae*⁵⁴ han sido publicados.

La principal causa de pseudoinfección y pseudoepidemias en broncoscopia es la colonización del BF por microorganismos, generalmente bacterias, que se adhieren y crecen en la superficie interna de los canales de teflón y PVC del endoscopio constituyendo *biofilms* de difícil erradicación. Dicha colonización es debida a una desinfección incorrecta, una limpieza insuficiente o a la utilización de un desinfectante inadecuado. Un 40% de las instituciones sanitarias no siguen las recomendaciones de limpieza y desinfección de los dispositivos médicos^{198, 199}. El aclarado del BF con agua corriente²⁰⁰ y la utilización de máquinas automáticas para la desinfección²⁰¹⁻²⁰³ también han sido identificadas como causas de contaminación de los BFs.

El diseño estructural de los BFs hace que la desinfección de los mismos sea un proceso complejo, que no depende únicamente del producto utilizado, sino de un procedimiento que permita el acceso del producto desinfectante a todos los canales. Por ello, es importante que la desinfección de los BFs sea realizada por personal con experiencia y familiarizada con estos equipos y que el protocolo de desinfección de los BFs se base en una guía elaborada por expertos, en la que se indique la importancia de los pasos a realizar, los desinfectantes y concentraciones que se recomiendan y los tiempos de exposición más adecuados.

Por estas razones, los ensayos prácticos que evalúan los desinfectantes en las condiciones en que se utilizarán, son de gran importancia en este campo. Diversos autores han publicado estudios de eficacia, en ocasiones comparativos para varios desinfectantes, mediante ensayos de “uso simulado”, con BFs contaminados artificialmente para la evaluación de la actividad micobactericida y tuberculocida^{54,55}.

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de Perasafe[®] en comparación con Cidex[®] en la desinfección de BFs contaminados experimentalmente con micobacterias, una vez demostrada su actividad micobactericida y tuberculocida *in vitro*.

Actualmente, no existe estandarización para este tipo de ensayos por lo que la desinfección se basó en el método descrito previamente por Rodríguez-Frojan et al.⁵³. Básicamente, consistió en contaminar uno o más canales del BF (Modelo Olympus BF-P10) con un determinado inóculo microbiano, en presencia de secreciones respiratorias (esputos, sin presencia de micobacterias) como materia orgánica, dejando secar el inóculo por aspiración de aire durante 2 min., limpiando el equipo manualmente con una solución de detergente neutro, desinfectando el mismo por inmersión durante 10 y 20 min. de exposición, cuidando siempre que los canales quedasen llenos de desinfectante, aclarando y tomando finalmente muestras del canal del BF para el recuento de microorganismos supervivientes. Se utilizó la técnica de *flushin* para el muestreo microbiológico de dichos canales por ser éste un método más reproducible para la cuantificación de microorganismos que el método del cepillado⁴⁹. Para el *flushin* se inyectó por el interior de los canales a muestrear un volumen de 250 ml de agua destilada estéril o medio de cultivo líquido (caldo tripticasa de soja) que se recogió en un recipiente estéril en el extremo distal del canal y se procesó para estudio microbiológico cuantitativo. El BF fue muestreado para detectar la presencia de micobacterias viables en las siguientes etapas: después de la contaminación (S1), después

del lavado (S2), después de 10 min. (S3) y 20 min. (S4) de desinfección. Las muestras obtenidas fueron descontaminadas y se sembraron alícuotas de 0.5 y 1 ml, por duplicado, en medios sólidos de L-J y 7H11, respectivamente. Se consideró que el procedimiento de desinfección fue efectivo cuando no se detectó crecimiento bacteriano o bien se consiguió una reducción $\geq 5 \log_{10}$ en los pasos S3 y S4.

Las suspensiones utilizadas para inocular los esputos con micobacterias tuvieron una concentración media de 8.57×10^7 ufc/ml ($7.93 \log_{10}$) para *M.tuberculosis* y de 1.44×10^9 ufc/ml ($9.16 \log_{10}$) para MAI. Sin embargo, la contaminación del BF fue de 1.03×10^5 ufc/ml ($5.01 \log_{10}$) para *M.tuberculosis* y 2.51×10^6 ufc/ml ($6.40 \log_{10}$) para MAI.

El procedimiento de limpieza del BF es de suma importancia, dado que muchos desinfectantes ven reducida su eficacia en contacto con la materia orgánica presente en estos dispositivos médicos en la práctica clínica. Nosotros consideramos que el esputo es la materia orgánica más apropiada para este tipo de estudios, en contraposición a otros autores²⁰⁴, por su presencia en el BF tras su uso clínico. La limpieza elimina gran cantidad de microorganismos²⁰⁵. El factor de reducción logarítmico conseguido por la limpieza en este estudio fue de 3.27 ± 0.67 para los BFs contaminados con MAI y de 2.42 ± 1.04 para los contaminados con *M.tuberculosis*. El resultado para *M.tuberculosis* fue un poco inferior al descrito por Hanson et al.²⁰⁶ ($3.5 \log_{10}$). Los valores de los contajes de micobacterias recuperadas se detallan en la columna S2 de las tablas 25-28.

Tabla 25: Desinfección con Perasafe[®] de BFs contaminados con *M. tuberculosis*

Inóculo en el esputo	S1	S2	S3	S4
$1.13 \cdot 10^8$	$5.00 \cdot 10^3$	$3.50 \cdot 10^2$	NC	NC
$1.13 \cdot 10^8$	$5.00 \cdot 10^3$	$1.93 \cdot 10^2$	NC	NC
$1.13 \cdot 10^8$	$3.50 \cdot 10^4$	18	NC	NC
$1.13 \cdot 10^8$	Inc	32.5	NC	NC
$1.13 \cdot 10^8$	$1.50 \cdot 10^4$	73.5	NC	NC

Resultados en ufc/ml. S1: crecimiento después de la contaminación del BF, S2: crecimiento después de la limpieza, S3: crecimiento después de 10 min. de desinfección, S4: crecimiento después de 20 min. de desinfección. Inc: incontables. NC: no detección de crecimiento (< 0.5 ufc/ml).

Tabla 26: Desinfección con Perasafe® de BFs contaminados con MAI

Inoculo del esputo	S1	S2	S3	Reducción log ₁₀	S4	Reducción log ₁₀
1.67 · 10 ⁹	3.90 · 10 ⁶	1.56 · 10 ⁴	2.42 · 10 ²	4.21	39	5
1.67 · 10 ⁹	5.80 · 10 ⁶	1.85 · 10 ³	3	> 5	21	> 5
1.67 · 10 ⁹	3.60 · 10 ⁶	2.13 · 10 ²	3	> 5	0.5	> 5
1.67 · 10 ⁹	3.30 · 10 ⁶	1.61 · 10 ⁴	NC	> 5	3.5	> 5
1.67 · 10 ⁹	1.28 · 10 ⁶	1.39 · 10 ³	3.5	> 5	2.5	> 5

Resultados en ufc/ml. S1: crecimiento después de la contaminación del FB, S2: crecimiento después de la limpieza, S3: crecimiento después de 10 min. de desinfección, S4: crecimiento después de 20 min. de desinfección. NC: no detección de crecimiento (< 0.5 ufc/ml).

Después de la limpieza y de 10 min. de desinfección con Perasafe® al 0.26% los cultivos para las 5 experiencias realizadas con *M.tuberculosis* H37Rv (ATCC 9360) fueron negativos (tabla 25). Sin embargo, se detectó crecimiento para MAI en el mismo tiempo de exposición, consiguiéndose una reducción $\geq 5 \log_{10}$ (incluyendo la limpieza) en 4 de las 5 experiencias y en todas las experiencias con 20 min. de desinfección (tabla 26).

En el caso de Cidex® no se recuperó ninguna colonia de *M.tuberculosis* a los 10 y 20 min. de desinfección (tablas 27). Para MAI se detectó crecimiento en 4 de las 5 experiencias, consiguiendo una reducción $\geq 5 \log_{10}$ en 10 min. de desinfección y cultivo negativo en 20 min. de exposición (tabla 28).

Tabla 27: Desinfección con Cidex® de BFs contaminados con *M. tuberculosis*

Inóculo del esputo	S1	S2	S3	S4
5.83 · 10 ⁷	5.00 · 10 ³	4.00 · 10 ²	NC	NC
5.83 · 10 ⁷	8.00 · 10 ⁴	4.04 · 10 ²	NC	NC
5.83 · 10 ⁷	2.30 · 10 ⁵	70	NC	NC
5.83 · 10 ⁷	2.05 · 10 ⁵	3.30 · 10 ²	NC	NC
5.83 · 10 ⁷	3.43 · 10 ⁵	45.67	NC	NC

Resultados en ufc/ml. S1: crecimiento después de la contaminación del BF, S2: crecimiento después de la limpieza, S3: crecimiento después de 10 min. de desinfección, S4: crecimiento después de 20 min. de desinfección. NC: no detección de crecimiento (< 0.5 ufc/ml).

Tabla 28: Desinfección con Cidex[®] de BFs contaminados con MAI

Inoculo del esputo	S1	S2	S3	Reducción log ₁₀	S4	Reducción log ₁₀
1.20 · 10 ⁹	1.31 · 10 ⁶	1.15 · 10 ³	0.5	> 5	NC	> 5
1.20 · 10 ⁹	4.12 · 10 ⁵	1.54 · 10 ²	34.5	4.08	NC	> 5
1.20 · 10 ⁹	5.07 · 10 ⁵	2.50 · 10 ²	NC	> 5	NC	> 5
1.20 · 10 ⁹	1.02 · 10 ⁶	7.00 · 10 ²	1.5	> 5	NC	> 5
1.20 · 10 ⁹	4.00 · 10 ⁶	1.65 · 10 ²	1	> 5	NC	> 5

Resultados en ufc/ml. S1: crecimiento después de la contaminación del BF, S2: crecimiento después de la limpieza, S3: crecimiento después de 10 min. de desinfección, S4: crecimiento después de 20 min. de desinfección. NC: no detección de crecimiento (< 0.5 ufc/ml).

La eficacia de Perasafe[®] y de Cidex[®] se demostró por la ausencia de crecimiento de *M.tuberculosis* tras 10 min. de contacto a partir de una contaminación media de 1.03 x 10⁵ ufc/ ml (5.01 log₁₀). Ambos desinfectantes consiguieron un factor de reducción logarítmico ≥ 5 para MAI en 20 min., con una media de contaminación microbiana de los BFs de 2.51 x 10⁵ ufc/ ml (6.40 log₁₀). Para MAI, tanto Perasafe[®] como Cidex[®] requirieron un tiempo de contacto más prolongado, por ser una micobacteria más resistente a los desinfectantes que *M.tuberculosis*^{69, 133, 134, 191} y porque el número de micobacterias viables halladas tras la contaminación del BF también fue mayor. Ambos desinfectantes consiguieron un factor de reducción logarítmico ≥ 5 , aunque con Cidex[®] no se recuperaron micobacterias viables (cultivos negativos) y con Perasafe[®] se obtuvo un número reducido de colonias de micobacterias supervivientes después del proceso de desinfección. Esta diferencia entre Perasafe[®] y Cidex[®] pudo ser debida a la elevada contaminación inicial de las experiencias realizadas con Perasafe[®], lo que refleja las dificultades de estandarización del inóculo y a la variante viscosidad del esputo que puede proteger a las micobacterias de la acción de los biocidas.

Nuestro criterio de eficacia de los desinfectantes de alto nivel para endoscopios coincide con las recomendaciones del *British Department of Health*²⁰⁴ que requiere una reducción >5 log₁₀ en el número de microorganismos supervivientes, y entre estos microorganismos se incluye a las micobacterias. Por el contrario, la FDA exige la eliminación total de micobacterias de los dispositivos médicos, mientras que algunos autores americanos²⁰⁷ sugieren una reducción de al menos 8 log₁₀ para *M.tuberculosis*; según éstos autores, la

limpieza conseguiría reducir 4 log₁₀ y otros 4 debe lograrlos el desinfectante durante un tiempo de exposición de 20 min. a 20°C.

Los resultados hallados en este estudio con Cidex[®] para *M.tuberculosis* son similares a los descritos por Hanson et al.²⁰⁶, quienes obtuvieron la negativización de los cultivos tras 10 min. de desinfección. Estos autores usaron un inóculo inicial de contaminación inferior al nuestro (8 x10³ ufc/ ml), por ello la limpieza por si sola y/o el proceso pudo eliminar un gran número de microorganismos. Sin embargo, en un estudio realizado por Nicholson et al.²⁰⁸ se recuperó *M.tuberculosis* en 5 de los 10 BF's y MAI en las 10 experiencias realizadas después de un periodo de desinfección de 60 min., con una limitada reducción de microorganismos (2.38 log₁₀). Esta escasa eficacia de Cidex[®] hallada por Nicholson et al.²⁰⁸ pudo ser debida a la ausencia de limpieza manual previa de los BF's y al hecho de que en todos los procedimientos de desinfección mecánica se reutilizó la misma solución desinfectante. Además, los autores obtuvieron una elevada contaminación de los BF's (8.20 log₁₀) y utilizaron el medio líquido BACTEC 460 para la recuperación de micobacterias viables. Este medio de cultivo es más sensible para la detección de crecimiento de micobacterias que los medios sólidos de L-J y 7H11 utilizados por nosotros, pero no ha sido recomendado para la recuperación de microorganismos supervivientes en los ensayos de biocidas.

Por el contrario, la eficacia del ácido peracético al 0.26% frente a *M.tuberculosis* demostrada en este trabajo es semejante a la de otros estudios realizados con máquinas lavadoras. Así, Middleton et al.⁵⁵ hallan que el ácido peracético al 0.35% (Nu- Cidex[®]) fue efectivo en 5 min., no recuperándose micobacterias supervivientes en ninguno de los BF's contaminados con esputos que contenían cepas clínicas de *M.tuberculosis*. Con respecto a MAI los resultados del presente estudio contrastan con los de Middleton et al.⁵⁵, quienes hallan que 5 min. son suficientes para obtener cultivos negativos. El uso de un detergente enzimático para la limpieza pudo contribuir a la obtención de una mejor eficacia de Nu- Cidex[®]. Por su parte, Seballos et al.²⁰⁹ tampoco recuperaron micobacterias cuando usaron el sistema Steris System que utiliza ácido peracético al 0.2%. Sin embargo, contaminaron los BF's con solución salina que contenía *M.avium*, muy diferente al esputo utilizado por nosotros, y además únicamente realizaron 2 experiencias.

El desinfectante evaluado, Perasafe[®], mediante la utilización de un procedimiento de “uso simulado” para la desinfección de alto nivel que incluye la limpieza, es un producto efectivo para micobacterias y constituye una posible alternativa al glutaraldehído alcalino en la desinfección de BFs.

5.1.1.3. Evaluación de la actividad micobactericida y tuberculocida de Korsolex[®], un detergente-desinfectante (artículo 3)

Para la limpieza y pre-desinfección de endoscopios, instrumental quirúrgico y otro tipo de dispositivos médicos se emplea un amplio número de detergentes-desinfectantes alcalinos que contienen aldehídos, fenoles, QACs y poliamidas. No obstante, los aldehídos y fenoles se asocian frecuentemente a efectos adversos como la fijación de proteínas y su inactivación por materia orgánica. Los biocidas que contienen aminos son ampliamente utilizados para la pre-desinfección de instrumental quirúrgico y dispositivos médicos, y constituyen una posible alternativa a los productos que contienen aldehídos. Sin embargo, la actividad micobactericida y tuberculocida de estos compuestos apenas ha sido estudiada. Korsolex[®] AF, es un desinfectante para instrumental que no contiene aldehídos en su composición y que está compuesto por dos aminas grasas alifáticas de cadena larga, obtenidas a partir del aceite de coco.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biocida de Korsolex[®] AF (presentaciones del 1, 2 y 3%) frente a varias especies del género *Mycobacterium*, utilizando ensayos de suspensión y de portagérmenes. Se estudió además, el efecto de la materia orgánica y del agua de dureza estándar, las cuales pueden interferir en la actividad del desinfectante en la práctica clínica.

El producto se preparó en agua destilada y en agua de dureza estándar (200 ppm de Ca₂CO₃) para el ensayo de suspensión y el de portagérmenes, respectivamente. Para el ensayo de suspensión el desinfectante se preparó 1.11 veces más concentrado para alcanzar la dilución de uso al añadir el inóculo. Las cepas utilizadas fueron *M.tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618), *M.kansasii* (ATCC 12478), *M.chelonae* (ATCC 35752) y una cepa de origen clínico de MAI (ref.104).

La concentración bacteriana del inóculo fue de 7.45×10^7 - 9.60×10^8 ufc/ml (7.87 - $8.98 \log_{10}$) para el ensayo de suspensión y de 1.26 - 6.80×10^8 ufc/ml (8.10 - $8.83 \log_{10}$) para el ensayo de portagérmenes. El método de dilución-neutralización y el neutralizante utilizado (caldo de Engley & Dey) fueron efectivos, a pesar de que el neutralizante contenía tiosulfato sódico y polisorbato 80. Inicialmente, se procedió a la validación del proceso de neutralización de Korsolex[®] AF con todas las cepas de micobacterias empleadas en el estudio de suspensión, y no observándose actividad residual ni inhibición del crecimiento bacteriano (tabla 29). Dado que el proceso de neutralización y el neutralizante empleado para el ensayo de portagérmenes fue idéntico al del ensayo de suspensión, únicamente se realizó la validación de la técnica para MAI y *M.chelonae* (tabla 30).

Tabla 29: Método de dilución-neutralización. Ensayo de suspensión

Microorganismo	N	n	n'
<i>M.tuberculosis</i>	1.73×10^7	1.95×10^7	1.84×10^7
MAI	5.30×10^7	4.90×10^7	4.49×10^7
<i>M.kansasii</i>	3.40×10^7	1.90×10^7	1.65×10^7
<i>M.chelonae</i>	4.80×10^7	3.80×10^7	3.54×10^7

N: inóculo inicial (ufc/ ml); n: conteo de supervivientes del procedimiento de dilución-neutralización (ufc/ml); n': conteo de supervivientes tras el contacto con el neutralizante (ufc/ml).

Tabla 30: Método de dilución-neutralización. Ensayo de portagérmenes

Microorganismo	N	n	n'
MAI	8.40×10^6	3.36×10^6	2.13×10^6
<i>M.chelonae</i>	8.15×10^6	2.18×10^6	1.95×10^6

N: inóculo inicial (ufc/ml); n: conteo de supervivientes del procedimiento de portagérmenes (ufc/ml); n': conteo de supervivientes tras el contacto con el neutralizante (ufc/ml).

Los resultados de la actividad de Korsolex[®] AF frente a micobacterias en el ensayo de suspensión se detallan en la tabla 31. Todas las concentraciones del desinfectante evaluadas

mostraron buena actividad frente a todas las micobacterias ensayadas en ausencia y en presencia de materia orgánica y en todos los tiempos de contacto evaluados.

Tabla 31: Actividad micobactericida y tuberculocida de Korsolex® AF en ensayos de suspensión

Micobacteria	Materia orgánica	Contaje inicial (Log ₁₀)*	Concentración del desinfectante y tiempo de contacto					
			3% - 15 min		2% - 30 min		1% - 60 min	
			S	D	S	D	S	D
<i>M.tuberculosis</i>	-	7.29	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
	CTF	6.86	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
MAI	-	7.69	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
	CTF	7.65	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
<i>M.kansasii</i>	-	7.28	2.30	4.98	NC	>5	NC	>5
	CTF	6.87	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
<i>M.chelonae</i>	-	7.58	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
	CTF	7.82	NC	> 5	NC	>5	NC	>5

*: log₁₀ (ufc/ml) para C2 (control procedimiento); S: número de supervivientes tras de la desinfección (log₁₀); D: reducción conseguida por el desinfectante (log₁₀); NC: no detección de crecimiento (límite de detección <50 ufc/ml). CTF: caldo triptosa fosfato, 7.6 g/l.

Tabla 32: Actividad micobactericida y tuberculocida de Korsolex® AF en ensayos de portagérmenes

Micobacteria	Materia orgánica	Contaje inicial (Log ₁₀)*	Concentración del desinfectante y tiempo de contacto					
			3% - 15 min		2% - 30 min		1% - 60 min	
			S	D	S	D	S	D
<i>M.tuberculosis</i>	-	5.92	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
	CTF	5.78	1.50	4.29	NC	>5	NC	>5
MAI	-	6.55	1.99	4.56	0.48	>5	NC	>5
	CTF	6.50	2.41	4.09	1.90	4.60	NC	>5
<i>M.kansasii</i>	-	6.24	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
	CTF	6.03	1.26	4.78	NC	>5	NC	>5
<i>M.chelonae</i>	-	6.60	NC	> 5	NC	>5	NC	>5
	CTF	6.56	NC	>5	NC	>5	NC	>5

*: log₁₀ (ufc/ml) para C2 (control procedimiento); S: número de supervivientes tras de la desinfección (log₁₀); D: reducción conseguida por el desinfectante (log₁₀); NC: no detección de crecimiento (límite de detección <1.5 ufc/ portagérmen). CTF: caldo triptosa fosfato, 7.6 g/l.

En la tabla 32 se muestra la actividad micobactericida y tuberculocida del desinfectante para el ensayo de portagérmenes. Korsolex[®] AF al 1% fue eficaz frente a todas las micobacterias ensayadas en 60 min. de contacto, en presencia o ausencia de materia orgánica. La solución del 2% consiguió una reducción $>5 \log_{10}$ en todos los ensayos, excepto para MAI (4.60 \log_{10}) en 30 min. de exposición y en presencia de caldo triptosa fosfato. Por último, Korsolex[®] AF al 3% demostró una reducción $>5 \log_{10}$ frente a *M.tuberculosis*, *M.kansasii* y *M.chelonae* en 15 min. de contacto y en ausencia de materia orgánica, pero no fue efectiva en presencia de ésta para *M.tuberculosis*, MAI y *M.kansasii*.

Se pudo demostrar que Korsolex[®] AF, producto comercializado para la pre-desinfección de dispositivos médicos, mostró una excelente actividad micobactericida y tuberculocida a alta y baja concentración. La concentración del 3% consiguió una reducción de 5 y 4 \log_{10} para *M.tuberculosis*, MAI, *M.kansasii* y *M.chelonae* en 15 min. de contacto en ensayos cuantitativos de suspensión y de portagérmenes, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron para las concentraciones del 1 y 2% Korsolex[®] AF en 60 y 30 min. de exposición. En general, las micobacterias secadas sobre la superficie del portagérmenes fueron menos sensibles a la acción del biocida que en el ensayo de suspensión. El caldo triptosa fosfato añadido al inóculo inicial como materia orgánica para simular las condiciones clínicas no interfirió en la actividad de Korsolex[®] AF frente a las cuatro micobacterias evaluadas en suspensión, pero incrementó el tiempo de exposición requerido en el caso del ensayo de portagérmenes.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos de actividad micobactericida dependen de los microorganismos ensayados. Así, MAI es la micobacteria más resistente a los biocidas, aunque el mecanismo de acción es todavía desconocido ^{69, 133, 134, 146, 191, 195}. Nuestros resultados confirman este hecho al ser *M.chelonae*, *M.kansasii* y *M.tuberculosis* más sensibles a Korsolex[®] AF que MAI. También Kneiflora et al. ²¹⁰ apoyan este hallazgo al observar que Lautericide[®] al 5%, producto que contiene acetato de amina obtenido a partir de aceite de coco, es activo frente a *M.tuberculosis* en 10 min. de contacto, pero requiere una concentración del 10% y 60 min. de exposición frente a MAI.

En conclusión, Korsolex[®] AF demostró una aceptable eficacia frente a varias especies de micobacterias en estudios cuantitativos de suspensión y portagérmenes. Por tanto, los desinfectantes que contienen aminas podrían ser útiles en la desinfección intermedia y de

alto nivel de los dispositivos médicos. Además, como producto pre-desinfectante, puede contribuir a reducir el riesgo de infección y de exposición a agentes tóxicos a los trabajadores de los centros sanitarios. Sin embargo, sería preciso realizar futuras evaluaciones con los ensayos de actividad micobactericida europeos en fase 2/ etapa 1, actualmente en fase de estandarización, y otros en “uso simulado” para confirmar la eficacia de Korsolex[®] AF.

5.2. Sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes de *A. baumannii* (artículo 4)

A.baumannii es un importante patógeno nosocomial emergente y la causa de numerosas epidemias hospitalarias, afectando especialmente a pacientes críticos ingresados en las UVI y quemados^{6, 7, 211-213}. El control de estas epidemias resulta extremadamente difícil debido a la elevada capacidad de este microorganismo para colonizar prácticamente cualquier superficie medio-ambiental y distintas localizaciones corporales de los pacientes (al ser flora exógena, debe colonizar a los pacientes previamente a producir infección), actuando ambos de reservorios de este tipo de infecciones. Posee una gran facilidad para adquirir multirresistencia a los antimicrobianos²¹⁴, lo que complica enormemente el tratamiento y empeora el pronóstico del paciente. El fármaco de elección de las infecciones causadas por cepas de *A.baumannii* multirresistentes es el imipenem, aunque se ha descrito un aumento progresivo de aislamientos resistentes a las carbapenemas²¹⁵⁻²¹⁷, reduciéndose así las opciones terapéuticas a sulbactam^{218, 219} o a compuestos con los que existe escasa experiencia clínica como polimixinas, nuevas fluoroquinolonas, doxiciclina y rifampicina^{220, 221}. Por todo ello, es habitual que los brotes epidémicos deriven hacia situaciones endémicas si no se toman las medidas de control eficaces para evitar la diseminación de este microorganismo en el ambiente hospitalario y entre el resto de pacientes ingresados.

La transmisión cruzada a través de las manos del personal sanitario es el principal mecanismo de transmisión de *A.baumannii* en los hospitales y en las UVI en particular, a partir de los reservorios ambientales o desde los enfermos colonizados o infectados, durante las múltiples maniobras que se realizan para el tratamiento y atención de los pacientes críticos²²². Por tanto, es de extrema importancia reforzar las medidas preventivas como el lavado y/o la desinfección de manos, sin olvidar la limpieza de suelos, equipos, camas, ropa,... También se puede dar un mecanismo directo por contacto con material de uso

clínico contaminado como termómetros, manguitos de presión,... a partir de los cuales se constituirían reservorios permanentes en piel y mucosa²²³, así como en el tubo digestivo²²⁴ de los pacientes.

Aunque las superficies no críticas no están directamente implicadas en la transmisión cruzada de enfermedades, potencialmente contribuyen a la extensión de los brotes epidémicos o endémicos cuando las manos del personal sanitario entran en contacto con superficies contaminadas, con pacientes que han estado en contacto con superficies contaminadas o con la superficie de dispositivos médicos contaminados. Por otro lado, patógenos como SARM, ERV y *A.baumannii* pueden sobrevivir en las superficies medio-ambientales durante largos periodos de tiempo^{7, 225}. Por estas razones el material y las superficies consideradas no críticas como el suelo, mesillas, camas, paredes,... deberían ser desinfectados regularmente con un desinfectante de bajo nivel. No obstante, el uso rutinario de desinfectantes para desinfectar los suelos y otras superficies hospitalarias, es todavía hoy en día controvertido.

El hecho de que la antisepsia de la piel, tanto del personal sanitario como de los pacientes, y la desinfección medio-ambiental no permitiera erradicar un brote epidémico, de carácter endémico, de *A.baumannii* en la UVI de la *Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge* (CSUB), sugirió la posibilidad de que los microorganismos implicados fueran resistentes a los biocidas utilizados. Por otro lado, la mayoría de los aislamientos de *A.baumannii* presentaban diferentes perfiles de sensibilidad a los antibióticos, con predominio de multirresistencias, por lo que podría existir una relación entre la resistencia a los antibióticos y a los biocidas. En este trabajo se evaluó la sensibilidad a diferentes antisépticos y desinfectantes de las cepas de *A.baumannii* de origen clínico y ambiental multirresistentes involucradas en dicho brote nosocomial y la posible relación entre resistencia antimicrobiana a antibióticos betalactámicos y biocidas.

La actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes se evaluó en 9 de las cepas de *A.baumannii* obtenidas de aislamientos clínicos y ambientales en la UVI de la CSUB durante el brote endémico^{217, 223}. Los aislamientos de *A.baumannii* fueron identificados mediante reacciones bioquímicas y por su capacidad de crecer a 37, 41 y 44°C. La confirmación de la identificación fue realizada por análisis de restricción de los genes

ribosomales 16S-13S y secuencia intergénicas²²⁶ mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Servicio de Microbiología de la CSUB. La susceptibilidad de los microorganismos a gentamicina, amikacina, ciprofloxacino, imipenem, sulbactam y ceftazidima, fue valorada mediante un método de microdilución y en el caso de imipenem la resistencia fue confirmada por E-test. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo los criterios establecidos por la NCCLS^{226, 227}.

Los 4 tipos de clones identificados por PFGE y los diferentes patrones de resistencia antibiótica de las cepas clínicas y ambientales del brote nosocomial endémico causado por diferentes cepas de *A.baumannii* se muestran en la tabla 33. Desde 1992 a 1996, los clones prevalentes fueron el A y el B, los cuales fueron uniformemente sensibles a carbapenemas y sulbactam. En 1996, apareció el clon D, con descenso de la sensibilidad a imipenem. Finalmente, en 1997, surgió el clon E, sensible solo a colistina y con elevada resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo carbapenemas y sulbactam, aminoglucósidos y fluoroquinolonas.

Tabla 33: Caracterización de los aislamientos de *A. baumannii*

Cepas	Fecha aislamiento	Origen	Clon*	Gent (mg/L)	Amk (mg/L)	Cip (mg/L)	Imp (mg/L)	Caz (mg/L)	Sulbactam (mg/L)
94/151101	Nov-94	Sangre	B	R (>128)	R (>128)	S (≤ 2)	S (≤1)	S (≤4)	S (≤4)
95/12230	Feb-95	LCR	A	R (>128)	R (>128)	R (>32)	S (≤1)	R (>16)	S (2)
96/305535	Nov-96	Espuito	A	S (4)	R (>128)	R (>32)	S (≤1)	S (≤4)	S (2)
96/320139	Dec-96	Frotis rectal	D	R (>128)	R (>128)	R (>32)	S (8)	R (>16)	S (4)
97/100477	Jun-97	Ambiental	D	R (>128)	R (>128)	R (>32)	S (8)	R (>16)	S (4)
97/200271	Dec-97	Ambiental	E	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	R (>64)
97/34087	Feb-97	Orina	E	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	R (>64)
99/266014	Nov-99	Sangre	-	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	R (>64)
99/267387	Nov-99	Aspirado traqueal	-	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	I (8)

* Genotipo por PGFE. Gent: gentamicina, Amk: amikacina, Cip: ciprofloxacino, Imp: imipenem, Caz: ceftazidima, S: sensible, R: resistente, I: intermedia. -: no realizado. LCR: líquido cefalorraquídeo.

A continuación se procedió a la realización de los ensayos con biocidas. Para la evaluación se utilizaron cepas representativas aisladas en diferentes momentos del brote nosocomial,

para observar la evolución de la sensibilidad de los biocidas en el tiempo y examinar la influencia de los biocidas en la evolución del brote endémico. Además, se analizó la relación entre sensibilidad a los biocidas, antisépticos y desinfectantes, con los antibióticos mediante los antibiogramas obtenidos a lo largo de este periodo.

Los productos antisépticos de manos que se utilizan en los hospitales para prevenir la transmisión cruzada en los brotes epidémicos nosocomiales se comercializan en tres formas de aplicación: 1) jabones líquidos y sólidos que deben ser utilizados con agua (lavado higiénico de manos); 2) desinfectantes de manos con base alcohólica que contienen etanol y/o n-propanol y/o isopropanol. Estos productos se utilizan frotando las manos y sin el uso de agua (tratamiento higiénico de manos); 3) geles alcohólicos, de reciente aparición, y que se usan también por frotación de las manos y sin el empleo de agua. En el presente trabajo se estudiaron compuestos incluidos dentro de estas tres categorías de productos. Los antisépticos evaluados, su composición, su indicación y el ensayo antimicrobiano realizado, se detallan en la tabla 34.

Tabla 34: Antisépticos evaluados

Producto	Composición	Ensayo	Indicación	Tiempo	Reducción requerida (log ₁₀)
Sterillium®	Etilsulfato de mecetronium, n-propanol e isopropanol	PrEN 12054	Tratamiento higiénico y quirúrgico de manos	30 s	5
GAM	Etanol, cloruro de dodecildimetil amonio	PrEN 12054	Tratamiento higiénico y quirúrgico de manos	30 s	5
SAM	Propanol, isopropanol y o-fenil-fenol	PrEN 12054	Tratamiento higiénico y quirúrgico de manos	30 s	5
Hibiscrub®	Glucanato de clorhexidina al 4%	PrEN 12054	Lavado higiénico y quirúrgico de manos	1 min.	3
Clorina®	Tosilcloramida sódico	PrEN 12054	Lavado higiénico y quirúrgico de manos	3 min.	3
Lifosit®	Jabón líquido	PrEN 12054	Lavado ordinario de manos	1 min.	3

GAM: Gel antiséptico de manos; SAM: solución antiséptica de manos.

Los desinfectantes empleados en la desinfección de superficies en el medio hospitalario incluyen los hipocloritos, QACs y aldehídos. Las características de los desinfectantes evaluados, junto con su composición y ensayo realizado se indican en la tabla 35.

Tabla 35: Desinfectantes evaluados

Producto	Composición	Ensayo	Tiempo de contacto	Reducción requerida (\log_{10})
Virkon [®]	Sales de nonopersulfato potasico, ácido sulfámico y alquil benceno sulfonato sódico	UNE-EN 1040	5 min.	>5
Instrunet Superficies [®]	Glutaraldehído, formol, glioxal y cloruro de dimetil amonio	UNE-EN 1040	5 min.	>5

Los antisépticos utilizados para el tratamiento higiénico y quirúrgico de manos por frotación no se diluyeron, mientras que los de lavado de manos se prepararon a una dilución del 55% en agua de dureza estándar (300 ppm de Ca_2CO_3) tal y como se indica en la PrEN 12054⁶⁰. Los desinfectantes estudiados se prepararon en agua destilada estéril a una concentración de 1.25, tal como se recomienda en la UNE-EN 1040²⁰. Seguidamente, se procedió a la preparación de suspensiones bacterianas para obtener $1-3 \times 10^8$ ufc/ml. Esto se obtuvo por ajuste espectrofotométrico a 620 nm de la suspensión, siendo éste de 0.17.

Tabla 36: Neutralizantes empleados para los antisépticos, jabón y desinfectantes evaluados

Producto	Neutralizante
Sterillium [®]	Diluyente de Bereens
GAM	Tween 80 (3%), lecitina (0.3%), histidina (0.1%), peptona (1%), ClNa (0.43%) y Na_2HPO_4 (0.75%)
SAM	Tween 80 (3%), lecitina (0.3%) e histidina (0.1%)
Hibiscrub [®] y Lifosit [®]	Tween 80 (15%), lecitina (1.5%) e histidina (1.5%)
Clorina [®]	Tiosulfato sódico (0.5%)
Virkon [®]	Tiosulfato sódico (1%), suero bovino fetal (10%)
Instrunet Superficies [®]	Histidina (1%), lecitina (3%), Tween 80 (10%)

GAM: Gel antiséptico de manos; SAM: solución antiséptica de manos.

Los neutralizantes empleados para cada uno de los productos biocidas (tabla 36) fueron efectivos y no mostraron toxicidad para los microorganismos según los criterios

establecidos para antisépticos en el PrEN 12054 (tablas 37-42) y UNE-EN 1040 para desinfectantes (tablas 43 y 44).

Tabla 37: Validación proceso de neutralización para Sterillium®

Aislamiento	N	N'	n'
96/305535	289	225	223
97/100477	324	342	361
97/200271	261	270	269
99/266014	285	276	228

N: ufc/ml del inóculo inicial; N': ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; n': ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización.

Tabla 38: Validación proceso de neutralización para GAM

Aislamiento	N	N'	n'
95/12230	188	192	164
96/305535	131	103	95
97/100477	240	261	234
97/34087	117	126	134
99/266014	129	110	55

N: ufc/ml del inóculo inicial; N': ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; n': ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización.

Tabla 39: Validación proceso de neutralización para SAM

Aislamiento	N	N'	n'
95/12230	196	180	186
97/200271	298	246	202
97/100477	191	170	142
99/266014	176	145	154

N: ufc/ml del inóculo inicial; N': ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; n': ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización.

Tabla 40: Validación proceso de neutralización para Hibiscrub®

Aislamiento	N	N'	n'	A
97/100477	160	147	100	150
97/200271	341	339	194	342
99/266014	167	175	88	149
99/267387	265	277	250	271

N: ufc/ml del inóculo inicial; N': ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; n': ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización; A: ufc/ml supervivientes tras exposición con agua de dureza estándar (300 ppm de Ca₂CO₃).

Tabla 41: Validación proceso de neutralización para Clorina®

Aislamiento	N	N'	n'	A
94/151101	208	198	223	197
97/34087	290	380	293	258
99/267387	159	170	175	193

N: ufc/ml del inóculo inicial; N': ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; n': ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización; A: ufc/ml supervivientes tras exposición con agua de dureza estándar (300 ppm de Ca₂CO₃).

Tabla 42: Validación proceso de neutralización para Lifosit®

Aislamiento	N	N'	n'	A
94/151101	263	253	262	268
97/34087	250	206	244	258
99/267387	291	232	267	261

N: ufc/ml del inóculo inicial; N': ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; n': ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización; A: ufc/ml supervivientes tras exposición con agua de dureza estándar (300 ppm de Ca₂CO₃).

Tabla 43: Validación proceso de neutralización para Virkon®

Aislamiento	N	Nx	Ny
94/151101	1.22x10 ⁸	1.17x10 ³	-
95/12230	1.56x10 ⁸	1.43x10 ³	-
96/305535	1.42x10 ⁸	1.21x10 ³	-
96/320139	1.28x10 ⁸	1.45x10 ³	-
97/100477	2.54x10 ⁸	2.55x10 ³	-
97/200271	2.75x10 ⁸	2.67x10 ³	-
97/34087	2.96x10 ⁸	2.79x10 ³	-
99/266014	1.91x10 ⁷	1.90x10 ³	2.04x10 ³
99/267387	1.81x10 ⁸	1.10x10 ³	2.07x10 ³

N: ufc/ml del inóculo inicial; Nx: ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; Ny: ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización.

Tabla 44: Validación proceso de neutralización para Instrunet Superficies®

Aislamiento	N	Nx	Ny
94/151101	1.46x10 ⁸	1.57x10 ³	-
95/12230	2.58x10 ⁸	2.27x10 ³	-
96/305535	2.42x10 ⁸	1.98x10 ³	-
96/320139	2.20x10 ⁸	2.38x10 ³	-
97/100477	3.07x10 ⁸	2.92x10 ³	-
97/200271	3.655x10 ⁸	2.47x10 ³	-
97/34087	2.78x10 ⁸	2.09x10 ³	-
99/266014	3.14x10 ⁷	2.29x10 ³	3.14x10 ³
99/267387	3.55x10 ⁸	3.00x10 ³	2.25x10 ³

N: ufc/ml del inóculo inicial; Nx: ufc/ml supervivientes tras el contacto con el neutralizante; Ny: ufc/ml después del procedimiento de dilución-neutralización.

Todos los antisépticos evaluados demostraron actividad bactericida frente a las 9 cepas de *A.baumannii* (tablas 45 y 46). Sterillium®, GAM y SAM dieron cultivos negativos con 30 s

de contacto a 20°C. Resultados similares se obtuvieron con Hibiscrub® en 1 min. y con Clorina® en 3 min. Por el contrario, y como era de esperar por carecer de acción antimicrobiana, el jabón líquido Lifosit® no mostró actividad bactericida alguna.

Tabla 45: Actividad bactericida de antisépticos para tratamiento higiénico y quirúrgico de manos por frotación frente a cepas de *A. baumannii*

Cepas	Sterillium®			SAM			GAM		
	Reducción			Reducción			Reducción		
	N	n	log ₁₀	N	n	log ₁₀	N	n	log ₁₀
94/151101	2.69x10 ⁷	NC	>4.95	1.85x10 ⁷	NC	>4.79	2.98x10 ⁷	NC	>5
95/12230	1.80x10 ⁷	NC	>4.78	1.97x10 ⁷	NC	>4.82	1.89x10 ⁷	NC	>4.80
96/305535	2.89x10 ⁷	NC	>4.99	1.40x10 ⁷	NC	>4.67	1.31x10 ⁷	NC	>4.64
96/320139	1.57x10 ⁷	NC	>4.72	3.02x10 ⁷	NC	>5.01	2.17x10 ⁷	NC	>4.86
97/100477	3.24x10 ⁷	NC	>5.04	1.92x10 ⁷	NC	>4.81	2.41x10 ⁷	NC	>4.91
97/200271	2.61x10 ⁷	NC	>4.94	2.98x10 ⁷	NC	>5	1.30x10 ⁷	NC	>4.64
97/34087	2.46x10 ⁷	NC	>4.92	1.90x10 ⁷	NC	>4.80	1.18x10 ⁷	NC	>4.60
99/266014	2.85x10 ⁷	NC	>4.98	1.77x10 ⁷	NC	>4.77	1.29x10 ⁷	NC	>4.64
99/267387	2.95x10 ⁷	NC	>4.99	2.62x10 ⁷	NC	>4.94	1.98x10 ⁷	NC	>4.82

Resultados en ufc/ml; N: media del conteo de microorganismos viables en el control del ensayo de suspensión; n: media del conteo de microorganismos viables después del procedimiento de ensayo; NC: cultivo negativo (<3x10² ufc/ml).

Tabla 46: Actividad bactericida de antisépticos utilizados para lavado higiénico y quirúrgico de manos (Hibiscrub® y Clorina®) para *A. baumannii* vs jabón líquido (Lifosit®).

Cepas	Hibiscrub®			Clorina®			Lifosit®		
	N	n	Reducción log ₁₀	N	n	Reducción log ₁₀	N	n	Reducción log ₁₀
94/151101	1.23x10 ⁷	NC	>3.08	2.01x10 ⁷	NC	>3.30	2.63x10 ⁷	2.51x10 ⁷	0.02
95/12230	2.76x10 ⁷	NC	>3.44	1.09x10 ⁷	NC	>3.03	1.83x10 ⁷	1.75x10 ⁷	0.02
96/305535	1.53x10 ⁷	NC	>3.18	1.06x10 ⁷	NC	>3.02	2.62x10 ⁷	2.27x10 ⁷	0.06
96/320139	1.86x10 ⁷	NC	>3.26	1.78x10 ⁷	NC	>3.25	2.66x10 ⁷	2.10x10 ⁷	0.10
97/100477	1.61x10 ⁷	NC	>3.20	1.08x10 ⁷	NC	>3.03	2.87x10 ⁷	2.50x10 ⁷	0.06
97/200271	3.41x10 ⁷	NC	>3.53	2.45x10 ⁷	NC	>3.38	2.51x10 ⁷	2.42x10 ⁷	0.01
97/34087	1.83x10 ⁷	NC	>3.26	2.91x10 ⁷	NC	>3.46	2.51x10 ⁷	2.49x10 ⁷	0
99/266014	1.67x10 ⁷	NC	>3.22	1.59x10 ⁷	NC	>3.20	2.29x10 ⁷	2.10x10 ⁷	0.03
99/267387	2.66x10 ⁷	NC	>3.42	1.60x10 ⁷	NC	>3.20	2.92x10 ⁷	2.62x10 ⁷	0.05

Resultados en ufc/ml; N: media del conteo de microorganismos viables en el control del ensayo de suspensión; n: media del conteo de microorganismos viables después del procedimiento de ensayo, NC: cultivo negativo ($< 1 \times 10^4$ ufc/ml).

Virkon[®] al 1% e Instrunet Superficies[®] fueron bactericidas, con un factor de reducción $>5 \log_{10}$ en el conteo de células supervivientes de las 9 cepas de *A.baumannii* en 5 min. de contacto (tabla 47).

Como se ha comentado con anterioridad, el control de los brotes epidémicos causados por especies de *A.baumannii* presenta dificultades por la persistencia de este microorganismo en el medio ambiente hospitalario y la continua contaminación de los pacientes y del personal sanitario. Se precisa una desinfección de superficies medioambientales y de manos correcta para evitar esta problemática. Varios estudios han señalado el incremento de aislamientos de este género resistentes a los antibióticos y solo unos pocos sugieren la posibilidad de aparición de microorganismos resistentes a los antisépticos y desinfectantes como resultado de brotes epidémicos de *A.baumannii*.

Tabla 47: Actividad bactericida básica de los desinfectantes frente *A. baumannii*

Cepa	Virkon [®]			Instrunet superficies [®]		
	N	Na	Reducción \log_{10}	N	Na	Reducción \log_{10}
94/151101	1.22x10 ⁸	NC	5.91	1.46x10 ⁸	NC	5.99
95/12230	1.56x10 ⁸	NC	6.02	2.58x10 ⁸	NC	6.24
96/305535	1.42x10 ⁸	NC	5.98	2.42x10 ⁸	NC	6.21
96/320139	1.28x10 ⁸	NC	5.93	2.20x10 ⁸	NC	6.17
97/100477	2.54x10 ⁸	NC	6.23	3.07x10 ⁸	NC	6.31
97/200271	2.75x10 ⁸	NC	6.26	3.05x10 ⁸	NC	6.31
97/34087	2.96x10 ⁸	NC	6.30	2.78x10 ⁸	NC	6.27
99/266014	1.91x10 ⁸	NC	6.11	3.14x10 ⁸	NC	6.32
99/267387	1.81x10 ⁸	NC	6.08	3.55x10 ⁸	NC	6.38

Resultados en ufc/ml; N: media del conteo de microorganismos viables en el control del ensayo de suspensión; Na: media del conteo de microorganismos viables después del procedimiento de ensayo, NC: cultivo negativo ($< 1.5 \times 10^2$ ufc/ml).

La continua exposición de los microorganismos patógenos a los antibióticos puede conducir a la resistencia a los biocidas, pero también el contacto con los biocidas puede dar lugar a una posible resistencia a los antisépticos y desinfectantes. De hecho, el incremento estable de la CMI de la clorhexidina fue descrito para *P.aeruginosa* después de su exposición a concentraciones sub-inhedoras que simulaban niveles residuales de este antiséptico en el medio ambiente²²⁸. Sin embargo, la relación entre uso de clorhexidina e incremento de la prevalencia de aislamientos de bacterias gramnegativas con incrementos de la CMI ha sido publicado, en concreto cepas de *P.aeruginosa* y *Proteus* spp. aisladas de infecciones del tracto urinario de pacientes parapléjicos muestran resistencia a los amonios cuaternarios y a la clorhexidina^{165, 229}.

La actividad antibacteriana *in vitro* de los productos biocidas raramente se evalúa frente a bacterias nosocomiales que presenten resistencia a los antibióticos como *A.baumannii*, por lo que es difícil comparar los resultados obtenidos. En el presente trabajo, todas las cepas aisladas a lo largo del brote epidémico fueron sensibles a todos los antisépticos y desinfectantes ensayados, incluyendo alcoholes, fenoles, QACs y clorhexidina al 4%. En cambio, Rochon-Edouard et al.²³⁰ en un estudio realizado con cepas de *A.baumannii* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, únicamente hallan una reducción de 3.19 y 0.28 log₁₀ con una dilución 1/10 de Sterillium® y un gel hidroalcohólico, respectivamente. Para clorhexidina los resultados fueron similares a los nuestros, aunque estos autores emplearon clorhexidina con base alcohólica.

Los antisépticos con una buena actividad *in vitro* pueden mostrar una amplia variación en su eficacia clínica para eliminar *A.baumannii* de manos muy contaminadas. Así, el alcohol etílico al 70% y la povidona-yodada al 10% son más eficaces que la clorhexidina o el jabón²²². Esto puede explicar, en parte, la propagación de *A.baumannii* entre los pacientes de la UVI de la CSUB, al incluir en los protocolos de lavado de manos del personal sanitario y en la higiene de la piel de los pacientes durante el brote nosocomial el uso de la clorhexidina. Estudios epidemiológicos recientes y las últimas recomendaciones de expertos aconsejan el uso de productos que contengan alcoholes para el tratamiento de manos por frotación, frente al lavado de manos tradicional o al lavado higiénico de manos porque contribuyen a mejorar el cumplimiento del lavado de manos por parte del personal sanitario y reducen el número de infecciones nosocomiales, incluidas las debidas a SARM^{59, 231, 232}. Otras ventajas de

estos productos son su rápida acción, óptimo espectro antimicrobiano (activo frente a todas las bacterias vegetativas, los virus de mayor importancia clínica, levaduras y algunos hongos), facilidad de uso, pueden ser utilizados a “pie de cama”, y la incorporación de emolientes permite la protección de la piel de los usuarios ²³². Se ha propuesto la presentación de los productos alcohólicos en forma de geles para evitar o mitigar la irritación que produce sobre la piel la evaporación de los alcoholes. Aunque en nuestro estudio *in vitro*, el GAM mostró una excelente actividad frente a *A.baumannii*, estudios *in vivo* no recomiendan el uso de geles alcohólicos ^{233, 234}.

Los cambios de permeabilidad de la membrana externa y las bombas de expulsión son mecanismos de resistencia bacteriana intrínsecos y adquiridos de los antibióticos. La escasa permeabilidad natural de *A.baumannii* es la principal causa de su disponibilidad para desarrollar resistencia a varias familias de antibióticos. Además, los cambios en su membrana externa también pueden causar un descenso de la sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes. No obstante, la resistencia a los antibióticos de *A.baumannii* no afecta a su sensibilidad para el glucanato de clorhexidina o la povidona yodada ¹⁶⁹, ni para los QACs y fenoles, en el caso de *P.aeruginosa* ²³⁵. Por el contrario, otros estudios han encontrado asociación entre resistencia a los antibióticos y sensibilidad a la clorhexidina ²³⁶. La resistencia a múltiples antibióticos parece estar asociada al incremento de la resistencia a la clorhexidina en bacterias gramnegativas ²³⁷ como en el caso de *Proteus mirabilis*, *P.aeruginosa*, *P.stutzeri*, *Providencia stuartii* y *Serratia marcescens* ^{165, 238}. En este estudio, todas las cepas de *A.baumannii* ensayadas demostraron diferentes patrones de resistencia a los antibióticos betalactámicos, pero fueron igualmente sensibles para la dilución de uso de los antisépticos y desinfectantes ensayados *in vitro*, por lo que no hubo evidencia alguna de asociación entre resistencia a los antibióticos betalactámicos y resistencia a los biocidas.

Generalmente, las publicaciones sobre sensibilidad de los biocidas se basan en la determinación de la CMI, y la resistencia se mide en términos de aumento de éstas CMIs. Aunque este método es apropiado para evaluar la sensibilidad de los antibióticos, en el caso de los biocidas proporciona información básica sobre la actividad antimicrobiana de las formulaciones, pero se requieren otros ensayos *in vitro* para demostrar esta resistencia ¹⁴⁷.

En conclusión, no existe evidencia alguna *in vitro* de la resistencia de *A.baumannii* a los antisépticos y desinfectantes evaluados. No se observó desarrollo de resistencia en el tiempo, factor que podría haber contribuido a la persistencia del brote epidémico, ni cambios de sensibilidad asociados entre los diferentes patrones de resistencia antibióticos. Así, las alteraciones de la pared celular o del transporte asociado con resistencia a múltiples antibióticos betalactámicos en *A.baumannii* no interfiere en la actividad de los antisépticos y desinfectantes, y de su penetración al interior de las bacterias bajo las condiciones usadas en el estudio. Sin embargo, los reservorios medioambientales y el personal sanitario juegan un papel importante en la transmisión de este microorganismo de un paciente a otro. Los estudios con portagérmenes para la desinfección de superficies e *in vivo* para la desinfección de manos contaminadas artificialmente podrían proporcionar información adicional sobre la eficacia de los antisépticos y desinfectantes en condiciones prácticas frente a *A.baumannii*.

5.3. Evaluación *in vitro* de la eficacia de Virkon® al 1% frente a bacterias, hongos, virus y esporas mediante normativas AFNOR (artículo 5)

Virkon® es un desinfectante que contiene ácido peroxigénico en su composición y que fue comercializado inicialmente en el sector veterinario y posteriormente introducido en la década de los 90 en el campo de la sanidad humana. El fabricante recomendaba este producto como desinfectante de alto nivel para la desinfección de dispositivos médicos semicríticos y también de superficies a una concentración del 1% y un tiempo de exposición de 10 min.

Aunque los compuestos peroxigénicos son efectivos frente a una amplia variedad de microorganismos⁵², algunos autores describen que Virkon® al 1% posee escasa actividad frente a micobacterias^{52, 239}, poliovirus²⁴⁰ y VIH¹²³. La información disponible sobre la actividad biocida de este desinfectante se basa en una amplia variedad de métodos que dificulta la comparación de los resultados y contribuye a mantener la controversia generada sobre su actividad antimicrobiana real.

El objetivo de este estudio fue evaluar el espectro de actividad antimicrobiana de Virkon® al 1% frente a diferentes microorganismos mediante normativas estandarizadas, por ser éstas ensayos precisos, reproducibles y sensibles.

Virkon[®] es un producto granulado compuesto principalmente por sales de sulfato (tabla 48). El producto se preparó en agua destilada estéril a doble concentración para obtener una concentración final del 1% (pH 2.6) en la mezcla de reacción, tal y como se indica en las normativas AFNOR de suspensión. En los ensayos con portagérmenes el producto se preparó en agua de dureza estándar (0.442 g/l de CaCl₂·2H₂O).

Tabla 48: Composición de Virkon[®]

Compuesto	%
• Sales de sulfato	
Monoperoxisulfato potásico	
Sulfato potásico	49.4
Sulfato hidrógeno potásico	
• Hexano fosfato sódico	18
• Dodecil benceno sulfonado sódico (surfactante)	15
• Ácido málico	10
• Ácido sulfámico	5

Para la evaluación de la actividad biocida de Virkon[®] y determinación de su espectro antimicrobiano se utilizaron las normativas AFNOR porque en el momento de realización del estudio únicamente estaban disponibles las normativas europeas de actividad bactericida y fungicida básicas^{20, 22}. Además el presente estudio quería comparar los resultados de actividad bactericida y fungicida en ensayos de suspensión y portagérmenes realizados con criterios similares para demostrar la actividad biocida real de Virkon[®] al 1%. A continuación se indican las actividades biocidas evaluadas, los microorganismos utilizados y las normativas AFNOR empleadas para los ensayos de suspensión (tabla 49) y los de portagérmenes (tabla 50) para la realización de este estudio.

Con el fin de establecer la actividad bactericida, tuberculocida, fungicida, esporicida y virucida de Virkon[®], se evaluó primero la eficacia del ensayo de dilución-neutralización con el neutralizante escogido (tiosulfato sódico al 1% y suero bovino fetal al 10%) y su posible efecto sobre las cepas bacterianas que se utilizarían en cada uno de los ensayos de evaluación, dado que el tiosulfato sódico puede afectar a la recuperación de los microorganismos^{75, 80}.

Tabla 49: Actividad biocida, microorganismos y ensayos de suspensión evaluados

Tipo de actividad	Microorganismo	Ensayo
• Bactericida	<i>P.aeruginosa</i> CIP A22 <i>E.coli</i> CIP 54 127 <i>S.aureus</i> CIP 53 154 <i>Enterococcus hirae</i> CIP 5855 <i>M.smegmatis</i> CIP 7326	NF T72-150 ²⁴¹
• Fungicida	<i>C.albicans</i> IP 1180-79 <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> IP 123-80 <i>Absidia corymbifera</i> IP 1129-75	NF T72-200 ⁸⁷
• Esporicida	<i>Bacillus cereus</i> CIP 7803	NF T72-230 ²⁴²
• Virucida	Poliovirus 1, cepa Sabin (LSc 2ab)	NF T72-180 ⁹⁵

CIP: Colección Instituto Pasteur. IP: Instituto Pasteur.

Tabla 50: Actividad biocida, microorganismos y ensayos con portagérmenes evaluados

Tipo de actividad	Microorganismo	Ensayo
• Bactericida	<i>P.aeruginosa</i> CIP A22 <i>E.coli</i> CIP 54 127 <i>S.aureus</i> CIP 53 154 <i>E. hirae</i> CIP 5855 <i>M.smegmatis</i> CIP 7326	NF T72-190 ²⁷
• Fungicida	<i>C.albicans</i> IP 1180-79	NF T72-200 ⁸⁷

CIP: Colección Instituto Pasteur. IP: Instituto Pasteur.

Para que el neutralizante y el proceso de dilución con éste fuera eficaz en las pruebas de suspensión debía cumplirse que $n' \geq N'/2$ y que a la vez el neutralizante fuera inocuo para las bacterias (N y N' fueran equivalentes). Siendo N' las ufc supervivientes frente al neutralizante y n' las ufc supervivientes después de la neutralización del producto. N es el número de ufc del inóculo inicial. El neutralizante fue efectivo para todas las cepas bacterianas ensayadas en NF T72 150 (tabla 51), NF T72 200 y 230 (tabla 52) porque al menos el 50% de las bacterias vegetativas, hongos y esporas fueron protegidos de la acción del desinfectante.

Tabla 51: Validación proceso de dilución-neutralización, ensayo NF T72 150

Microorganismo	N	N'	n'
<i>P.aeruginosa</i>	257	363	354
<i>E.coli</i>	211	184	193
<i>S.aureus</i>	207	162	174
<i>E. hirae</i>	302	283	249
<i>M.smegmatis</i>	292	+	+

+: más de 300 ufc. N: inóculo inicial (ufc/ml) ; N': número de colonias supervivientes tras contacto con el neutralizante (ufc/ml) ; n': número de colonias supervivientes después de la neutralización (ufc/ml)

Tabla 52: Validación proceso de dilución-neutralización, ensayo NF T72 200 y 230

Microorganismo	N	N'	n'
<i>C.albicans</i>	55	56	52
<i>P.verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	59	54	47
<i>A.corymbifera</i>	64	80	77
<i>B. cereus</i>	73	47	59

N: inóculo inicial (ufc/ml); N': número de colonias supervivientes tras contacto con el neutralizante (ufc/ml) ; n': número de colonias supervivientes después de la neutralización (ufc/ml)

Una vez realizados los ensayos preliminares para determinar el método de eliminación del efecto residual del desinfectante y en su caso la efectividad del neutralizante, se procedió a realizar los ensayos de actividad biocida. En el caso de la actividad bactericida los resultados mostrados en la tabla 53 indican que Virkon[®] al 1% es bactericida tras 5 min. de exposición con *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus*, *E.hirae* y también actividad con *M.smegmatis* (actividad bactericida de espectro 5) según la normativa NF T72 150 para ensayos de suspensión con una reducción del 99.999% del inóculo bacteriano inicial (> 5 log₁₀). En la tabla 53 también se demuestra que Virkon[®] consigue un factor de reducción logarítmico de 4 frente a *C.albicans* en 15 min. de contacto, pero no tiene actividad frente a las conidias de los hongos filamentosos estudiados. Por ello, y según el criterio de la normativa NF T72 200, Virkon[®] al 1% no puede considerarse un producto fungicida. Tampoco es un producto esporicida, según normativa NF T72 230, dado que no demuestra actividad frente a las esporas de *B.cereus* en 60 min. de contacto.

Tabla 53: Actividad bactericida, fungicida y esporicida de Virkon® al 1% en ensayos cuantitativos de suspensión

Microorganismo	Tiempo de contacto (min.)	N	N'	n'	n	Reducción log ₁₀
<i>P.aeruginosa</i>	5	257	+	+	0	>5
<i>E.coli</i>	5	211	184	193	0	>5
<i>S.aureus</i>	5	207	162	174	0	>5
<i>E. hirae</i>	5	+	283	249	0	>5
<i>M.smegmatis</i>	5	292	+	+	0	>5
<i>C.albicans</i>	15	74	82	77	0	>4
<i>P.verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	15	56	56	52	+	<4
<i>A.corymbifera</i>	15	30	30	47	+	<4
<i>B. cereus</i>	60	65	47	59	+	<4

+: más de 300 ufc; N: ufc/ml en una dilución del inóculo; N': ufc/ml supervivientes después de 10 min. de contacto con el neutralizante; n': ufc/ml supervivientes después de poner en contacto el desinfectante neutralizado durante 5 min. para bacterias, 15 min. para hongos y 60 min. para esporas; n: ufc/ml supervivientes después de contacto con el desinfectante y posterior neutralización.

De acuerdo con los resultados obtenidos se procedió a la realización de los ensayos cuantitativos con portagérmenes (NF T72 190)²⁷, únicamente para aquellos microorganismos que superaron el ensayo de suspensión cuantitativo. Para ello previamente se procedió a validar el procedimiento del ensayo y la neutralización del desinfectante con las cepas bacterianas y fúngicas que se evaluarían. Para que el ensayo sea válido debe cumplirse que $n_1 \geq N_1/2$, siendo N_1 el número de ufc en la dilución 10^{-7} del inóculo y n_1 las ufc hallada en la membrana que ha estado en contacto con Virkon® al 1%. Este método sí eliminó, mediante 3 lavados con agua estéril (volumen de 50 ml/ lavado), el efecto residual bacteriostático de Virkon® al 1% en todas las cepas evaluadas (tabla 54). Las membranas empleadas eran de ésteres de acetato de celulosa.

Tabla 54: Validación ensayo NF T72 190

Microorganismo	N ₁	T	n ₁
<i>P.aeruginosa</i>	208	3.4 x10 ⁷	173
<i>E.coli</i>	148	5.6 x10 ⁷	193
<i>S.aureus</i>	+	1.7 x10 ⁷	+
<i>E. hirae</i>	265	1 x10 ⁶	240
<i>M.smegmatis</i>	268	>10 ⁶	229

+: más de 300 ufc; N₁: ufc en la dilución 10⁻⁷ del inóculo; T: media (n=2) del total de ufc/ portagérmen; n₁: ufc hallada en la membrana;

Como se observa en la tabla 55 el desinfectante demuestra actividad bactericida en 5 min. de contacto en los estudios con portagérmenes frente a *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus* y *E.hirae*, pero no frente a *M.smegmatis*. Tiempos de exposición mayores, máximo 60 min., tampoco consiguieron que Virkon[®] al 1% eliminara *M.smegmatis* de los portagérmenes. Por tanto, el espectro de actividad bactericida para el desinfectante fue de 4. Respecto a la actividad fungicida, únicamente se evaluó el efecto antimicrobiano sobre *C.albicans*, pero tras un periodo de exposición de 15 min., Virkon[®] al 1% tampoco superó el ensayo por lo que se debe concluir que no presenta actividad fungicida.

Tabla 55: Actividad bactericida y fungicida de Virkon[®] al 1% en ensayos cuantitativos de portagérmenes

Microorganism	Tiempo de		N	n' ₁	n' ₂	T	d
	contacto (min.)	o					
<i>P.aeruginosa</i>	5		298	0	0	3.4 x10 ⁶	>5
<i>E.coli</i>	5		+	0	0	4.7 x10 ⁶	>5
<i>S.aureus</i>	5		295	2	0	1.7 x10 ⁷	>5
<i>E. hirae</i>	5		265	171	2	2 x10 ⁷	>5
<i>M.smegmatis</i>	5		190	31	+	>10 ⁶	<5
	10		196	+	+	>10 ⁶	<5
	15		196	+	30	>10 ⁶	<5
	30		186	+	+	>10 ⁶	<5
<i>C.albicans</i>	15		19	+	1	9x 10 ⁴	<4

+: más de 300 ufc; N: ufc/ml en una dilución del inóculo; n₁: ufc/portagérmenes supervivientes en 100 ml del medio de recuperación; n₂: ufc/ portagérmenes (media 3) supervivientes adheridos al portagérmen después del procedimiento de recuperación por inclusión de éste en medio de cultivo microbiológico sólido; d: factor de reducción logarítmico producido por el desinfectante respecto al inóculo inicial; T: media (n=2) del total de ufc/portagérmen.

Antes de realizar los ensayos de actividad virucida fue preciso realizar una serie de ensayos preliminares. El título vírico del stock vírico que se emplearía en el estudio fue 3.4×10^7 UI/ml ($7.53 \log_{10}$). La dilución subcitotóxica de Virkon[®] fue 10^{-3} , esta es la concentración más alta de desinfectante a la cual se observó intacta la monocapa de células Vero empleadas ($\pm 10\%$ respecto a las células Vero utilizadas como control). A continuación, se determinó el poder infectivo del stock vírico en células Vero tratadas con el desinfectante para comprobar que la dilución subcitotóxica escogida no afectaba a las células y su capacidad de desarrollar infección vírica. Éste se estableció en 1.43×10^7 UI/ml ($7.53 \log_{10}$). Por último, se determinó la dilución de parada (D) del efecto virucida del desinfectante. Para ello, la dilución D no debe disminuir el título vírico respecto al control y las diferencias entre el título de la dilución D y el del control han de ser $\leq 0.5 \log_{10}$. A la vista de los resultados, se escogió 10^{-2} como dilución D. El contenido de proteínas en el inóculo vírico y en el medio de cultivo fue de 0.9 y 1 g/l, respectivamente.

Virkon[®] al 1% produjo un factor de reducción logarítmico de 7.02 frente a poliovirus tipo 1 en 15 min. de contacto, demostrando que posee actividad virucida. Las concentraciones del 0.05 y 0.1 % no fueron virucidas (tabla 56).

Tabla 56: Actividad virucida de Virkon[®] en ensayo de suspensión cuantitativo

Solución desinfectante	T UI/ml (\log_{10})	R15 UI/ml (\log_{10})	R30 UI/ml (\log_{10})	R60 UI/ml (\log_{10})	Reducción (\log_{10})
1 %	1.05×10^7 (7.02)	0	0	0	7.02
0.1 %	1.05×10^7 (7.02)	6.8×10^7 (6.83)	1.28×10^7 (7.10)	1.28×10^7 (7.10)	<0.19
0.05 %	1.05×10^7 (7.02)	8.1×10^6 (6.90)	1.06×10^7 (7.02)	1.06×10^7 (7.02)	<0.12

T: Título vírico del tubo de control positivo (suspensión vírica); R: título vírico de los tubos de reacción (suspensión viral y desinfectante) después un tiempo de contacto de 15 (R15), 30 (R30) y 60 (R60) min.

Los resultados hallados demuestran que Virkon[®] al 1% posee actividad bactericida frente a bacterias vegetativas, grampositivas y gramnegativas, en 5 min. de exposición en ensayos cuantitativos de suspensión y de portagérmenes. Estos resultados son similares a los

publicados por otros autores ^{243, 244}, aunque algunos trabajos describen un tiempo de exposición de 1 min. en ensayos de suspensión ^{245, 246}. Coates et al. ²⁴⁷ demostraron, además, una rápida y fuerte actividad bactericida del producto para la desinfección de superficies salpicadas o manchadas con fluidos contaminados. El uso de agua de dureza estándar como diluyente del producto y la incorporación de leche bacteriológica como materia orgánica en los ensayos de portagérmenes influyó y modificó la actividad bactericida de Virkon[®] al 1% únicamente en el caso de *M.smegmatis*. Aunque el producto fue activo frente a *M.smegmatis* en el ensayo de suspensión en 5 min. de contacto, no lo fue en el ensayo de portagérmenes en un periodo de exposición máximo de 30 min. Savino et al. ²⁴⁸ tampoco lograron eliminar este microorganismo en 60 min. de contacto, utilizando un inóculo de 10² ufc/ml, mucho más reducido que el utilizado en el presente estudio (10⁷ ufc/ml). Trabajos realizados con cepas de *M.tuberculosis* y MAI de origen clínico, y concentraciones de Virkon[®] al 1, 2, 3 y 4% han demostrado que este producto no posee actividad biocida frente a micobacterias con tiempos de exposición de 60 y 120 min. ^{134, 190, 239}. Por el contrario, un estudio realizado con técnicas de PCR y una concentración del 3% destruyó *M.tuberculosis* en 10 min. ²⁴⁹.

La rápida actividad biocida hallada frente a *C.albicans* en los ensayos de suspensión coincide con la descrita por otros autores ^{245, 248}. Sin embargo, el desinfectante evaluado no fue fungicida para los hongos filamentosos estudiados, no existiendo otros trabajos con los que comparar los resultados. No obstante, Virkon[®] al 4% destruye *Aspergillus fumigatus* en 15 min. de exposición ¹³⁴.

Tampoco en el presente trabajo se pudo demostrar que Virkon[®] al 1% tuviera actividad esporicida frente a *B.cereus* en 60 min. de contacto, aunque Braga et al. ²⁴⁹ describen la destrucción de endosporas en 5-10 min. de exposición. Esta discrepancia en los resultados puede ser debida a factores técnicos, como por ejemplo el método de neutralización empleado, la temperatura y la concentración del inóculo. Por otra parte, estos resultados confirman el bajo nivel de actividad del producto frente a las esporas bacterianas publicados con anterioridad ²⁵⁰.

Virkon[®] al 1% es virucida frente a poliovirus, virus sin envuelta de pequeño tamaño y más resistentes a los biocidas que los virus con envuelta. Nuestros resultados contrastan con los de Tyler et al. ²⁴⁰ con una reducción de 2.6 log₁₀ después de 5 min. de contacto con Virkon[®]

al 3%. Otros trabajos con ensayos de portagérmenes establecen factores de reducción $>4 \log_{10}$ en 1 min. de exposición con el producto al 1% ²⁰⁴ y de $3.5 \log_{10}$ en 5 min. de exposición con Virkon[®] al 3% ²⁴⁰. Estas diferencias pueden ser atribuidas al procedimiento de ensayo, como la presencia de 5% ¹⁹⁰ y 10% ²⁴⁰ de suero bovino fetal en el medio de cultivo durante el desarrollo del estudio frente al 2% utilizado en el ensayo NF T72 180.

En conclusión, Virkon[®] al 1% es un desinfectante de bajo nivel por ser un biocida con efecto antimicrobiano rápido frente a bacterias vegetativas (gramnegativas y grampositivas), levaduras, virus y micobacterias no tuberculosas en ensayos de suspensión, pero únicamente bactericida en los ensayos con portagérmenes. Por el contrario, es incapaz de destruir endosporas bacterianas en un periodo de desinfección práctico. El desinfectante posee un limitado espectro de acción y potencial corrosividad, por lo que no puede considerarse un producto alternativo al glutaraldehído alcalino en la desinfección de alto nivel. Este trabajo apoya la recomendación de la *British Society of Gastroenterology* de no aconsejar el uso de Virkon[®] como producto para la desinfección de alto nivel de endoscopios flexibles ²⁴⁶. Sin embargo, su espectro de actividad biocida junto a su biodegradación y escasa toxicidad lo hace un desinfectante adecuado para las superficies medioambientales.

5.4. Ensayos de inactivación de virus implicados en la adquisición de infecciones nosocomiales

5.4.1. Estudio *in vitro* de la actividad virucida de Solprogel[®] frente al VIH (artículo 6)

El VIH es un virus potencialmente peligroso para el personal sanitario que atiende a los pacientes infectados por dicho virus cuando manipulan fluidos biológicos que lo contiene o bien cuando entran en contacto con superficies o dispositivos médicos contaminados con el VIH. Por ello, se precisa información sobre la eficacia de los procedimientos de desinfección química frente al VIH debido a que la pandemia de sida requiere repetidas hospitalizaciones de los enfermos y consecuentemente, un incremento del riesgo potencial para el personal sanitario y para la contaminación de superficies ambientales y de los dispositivos médicos.

El uso de hipocloritos como desinfectantes esta ampliamente extendido y recomendado en los hospitales y centros sanitarios, sobre todo en las áreas de laboratorio ¹²⁵. Algunos estudios han demostrado que el VIH es extremadamente sensible a los compuestos clorados como el hipoclorito sódico (NaOCl) y el NaDCC ^{123, 251, 252}, siendo el componente activo de ambos compuestos el ácido hipocloroso (HOCl). El Solprogel[®] es un producto sólido, en forma granulada, que posee un polímero biodegradable de ácido acrílico que al entrar en contacto con un líquido hace que solidifique y se convierta en un gel. Solprogel[®] contiene en su composición NaDCC, y según el fabricante 10 g/l de producto contiene 120 ppm de cloro disponible.

El objetivo de este trabajo fue el de determinar la concentración mínima de NaDCC y el tiempo de contacto mínimo de NaDCC y Solprogel[®] para inactivar el VIH-1.

Para el estudio se utilizó un ensayo de suspensión con la cepa HIV-1_{III}B y la línea celular MT-2 para la replicación, titulación e infectividad vírica y así determinar la actividad virucida del producto desinfectante. La infectividad se determinó de forma directa mediante la observación del ECP en células MT-2 (formación de sincitios) y de forma indirecta mediante detección de antígeno p24 por técnica de EIA.

Un factor importante en la evaluación de actividad virucida es la determinación del título vírico. Los resultados de infectividad se suelen expresar como detectable o no detectable, por lo que la posible pérdida de viriones puede falsear los resultados. La pérdida de estos viriones puede deberse a factores presentes en el procedimiento experimental y no achacables al desinfectante. Nuestro protocolo incluyó una serie de controles para todas las etapas del proceso, sin la presencia del producto a evaluar (tabla 57). El método empleado para eliminar la citotoxicidad del desinfectante fue la dilución en medio de cultivo celular. Las trazas de Solprogel[®] no fueron tóxicas para las células (viabilidad >85%). El título vírico de la suspensión estocó fue de 3.2×10^6 TCID₅₀ y teniendo en cuenta las condiciones experimentales de 6.8×10^5 TCID₅₀.

Tabla 57: Titulación vírica de las condiciones experimentales

Muestra	Dilución	ECP	Antígeno p24	Titulación vírica (pg/ml)
PS1	10 ⁻⁶	-	N	3.2 x 10 ⁶
	10 ⁻⁵	+	>400	
PS2	10 ⁻⁵	-	N	6.8 x 10 ⁵
	10 ⁻⁴	+	>400	
PS3	10 ⁻⁵	-	N	6.8 x 10 ⁵
	10 ⁻⁴	+	>400	
PS4	10 ⁻⁵	-	N	6.8 x 10 ⁵
	10 ⁻⁴	+	>400	
PS5	10 ⁻⁵	-	N	6.8 x 10 ⁵
	10 ⁻⁴	+	>400	

PS1: VIH congelado a -80°C; PS2: VIH congelado a -80°C, diluido a 10⁻¹ en medio de cultivo y tratado bajo las condiciones experimentales; PS3: VIH congelado a -80°C, diluido a 10⁻¹ en medio de cultivo, incubado 5 min. a temperatura ambiente y tratado bajo las condiciones experimentales; PS4: VIH congelado a -80°C, diluido a 10⁻¹ en medio de cultivo, incubado 15 min. a temperatura ambiente y tratado bajo las condiciones experimentales; PS5: VIH congelado a -80°C, diluido a 10⁻¹ en medio de cultivo, incubado 60 min. a temperatura ambiente y tratado bajo las condiciones experimentales; +: formación de sincitios; -: no formación de sincitios; N: ausencia de antígeno p24.

Tabla 58: Efecto del tratamiento del VIH-1 con NaDCC y Solprogel®

Muestra	Cloro disponible (ppm)	Tiempo de contacto (min.)	Dilución	ECP	Antígeno p24	Titulación vírica (pg/ml)
NaDCC	10.000	5	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		15	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		60	10 ⁻²	-	N	<10 ²
NaDCC	1.000	5	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		15	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		60	10 ⁻²	-	N	<10 ²
NaDCC	100	5	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		15	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		60	10 ⁻²	-	N	<10 ²
Solprogel®	120	5	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		15	10 ⁻²	-	N	<10 ²
		60	10 ⁻²	-	N	<10 ²

-: no formación de sincitios; N: ausencia de antígeno p24.

Los viriones infecciosos se detectaron en todas las muestras no tratadas, pero no se detectó en ninguna de las tratadas con NaDCC y Solprogel®. La presencia o ausencia del ECP del

VIH-1 coincidió con un valor positivo o negativo para el antígeno p24. En cambio, el título vírico para el virus tratado con NaDCC y Solprogel[®] fue $<10^2$ (tabla 58). El NaDCC y Solprogel[®] a una concentración de 100 y 120 ppm de cloro disponible, consiguieron una reducción del título vírico $>3 \log_{10}$ en 5 min. de contacto. Según Sattar y Sprinthorpe⁹⁶ una reducción del título vírico de al menos $3 \log_{10}$ es suficiente para demostrar eficacia virucida frente a VIH-1.

La replicación del VIH depende de la posibilidad de infección del virus en las células y de que estas crezcan adecuadamente. La existencia de trazas del biocida o citotoxicidad puede ser una importante fuente de error e interpretarla como inactivación vírica o capacidad virucida del biocida²⁵³. En nuestro estudio no se observaron restos del desinfectante evaluado o efecto tóxico sobre las células MT-2.

Se consideró que los viriones eran infecciosos cuando se observó la presencia de sincitios en las células MT-2 y/o antígeno p24 en el sobrenadante celular. Spickett et al.²⁵⁴ demostraron que la transcriptasa inversa no se correlacionaba necesariamente con la infectividad vírica, pero que la correlación entre formación de sincitios e infectividad en la línea celular C8166 era absoluta cuando esta infectividad se media después de varios días de cultivo y utilizando sistemas de detección de antígeno. En nuestro estudio utilizamos la línea celular MT-2, y también hallamos que la formación de sincitios coincidió plenamente con la detección de antígeno p24.

Estos resultados indican que la desinfección fue satisfactoria para NaDCC y Solprogel[®] a concentraciones de 100 y 120 ppm de cloro disponible, respectivamente y que esta desinfección fue suficiente para prevenir la detección de virus superviviente después de 5 min. de contacto y en ausencia de materia orgánica. Estos resultados son coincidentes con trabajos anteriores respecto al NaDCC¹²⁵, aunque Bloomfield et al.²⁵⁵ aseguran que 50 ppm de cloro disponible son suficientes para conseguir una reducción de $3-4 \log_{10}$ para inactivar el VIH en 2 min. de exposición.

En definitiva, Solprogel[®] inactiva el VIH-1 *in vitro*, formando un polímero sólido lo que hace que sea un desinfectante útil para usarlo sobre fluidos y tejidos contaminados con el virus.

5.4.2. Evaluación de la eficacia de Solprogel[®] frente al VHB (artículo 7)

Como se ha comentado con anterioridad no existe un ensayo universalmente aceptado para la determinación de la capacidad de inactivación de los biocidas frente a VHB. No obstante, Tsiquaye et al.¹⁰² demostraron *in vitro* que la inhibición de la actividad de la DNA-P de los virus de la familia *Hepadnavirae* por desinfectantes químicos era un buen predictor de la infectividad *in vivo* y sugirieron el uso del ensayo de actividad enzimática de la DNA-P como indicador de la inactivación del VHB.

El objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* la actividad enzimática de la DNA-P del VHB para establecer las condiciones óptimas de la desinfección con Solprogel[®] comparándola con NaDCC. Para ello, se estudió la inactivación del VHB asociado a la actividad DNA-P en un rango de concentraciones de NaDCC y 3 formulaciones de Solprogel[®] para determinar la mínima concentración efectiva frente al virus.

El método de detección de la DNA-P empleado en nuestro estudio fue el descrito previamente por Kaplan et al.²⁵⁶ y el de las técnicas de detección radiométricas las utilizadas anteriormente por Tsiquaye et al.²⁵⁷ y Nath et al.¹⁰⁹.

En la figura 11 se muestra la curva de dosis-respuesta para la inactivación del VHB por NaDCC y en la figura 12 el efecto del tiempo de exposición del biocida sobre la actividad enzimática de la DNA-P. El descenso de la actividad enzimática de la DNA-P dependió de la cantidad de cloro disponible. La concentración mínima efectiva de cloro disponible que inactivó la actividad de la DNA-P del VHB después de 2 min. de contacto fue de 1.000 ppm, siendo la proporción de actividad de 1.28.

En la figura 13 se detalla el efecto dosis-respuesta de las concentraciones de Solprogel[®] evaluadas y en la figura 12 el efecto del tiempo de exposición sobre la actividad de la DNA-P del VHB con 960 ppm de cloro disponible correspondientes a Solprogel[®] al 16%.

Figura 11: Efecto dosis-respuesta del NaDCC sobre la DNA-P del VHB

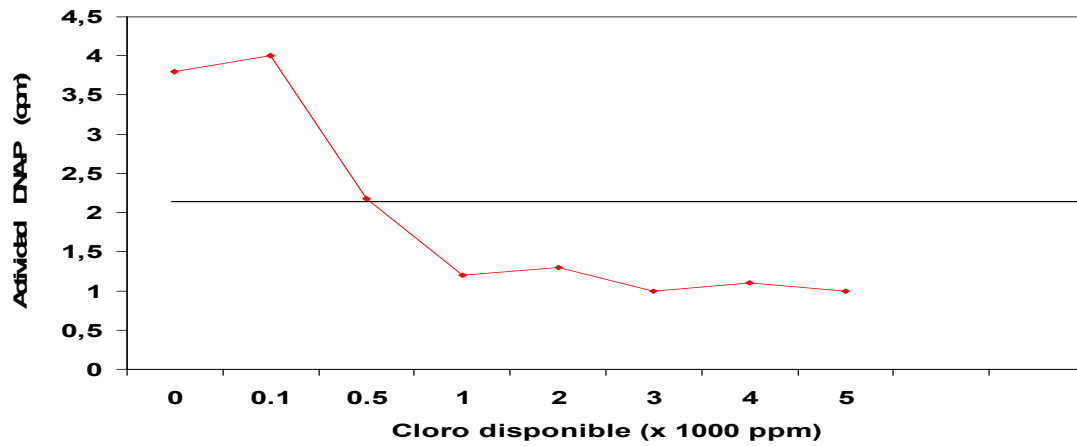


Figura 12: Efecto del tiempo de contacto sobre la actividad DNA-P de VHB.

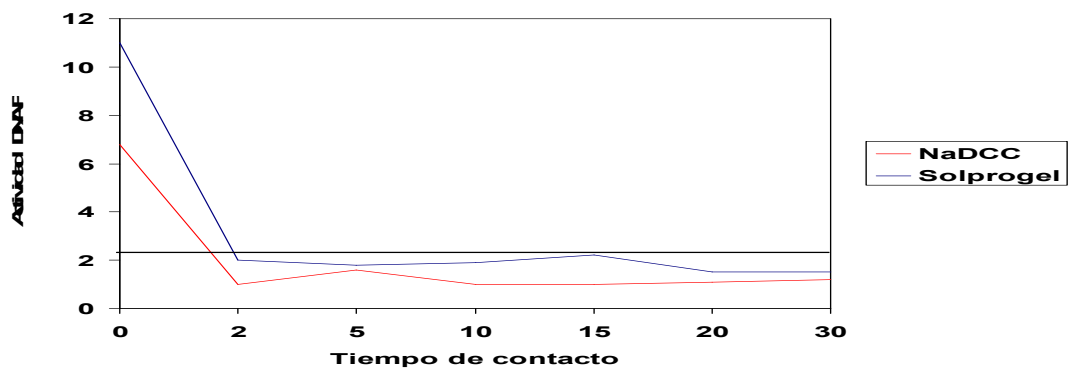
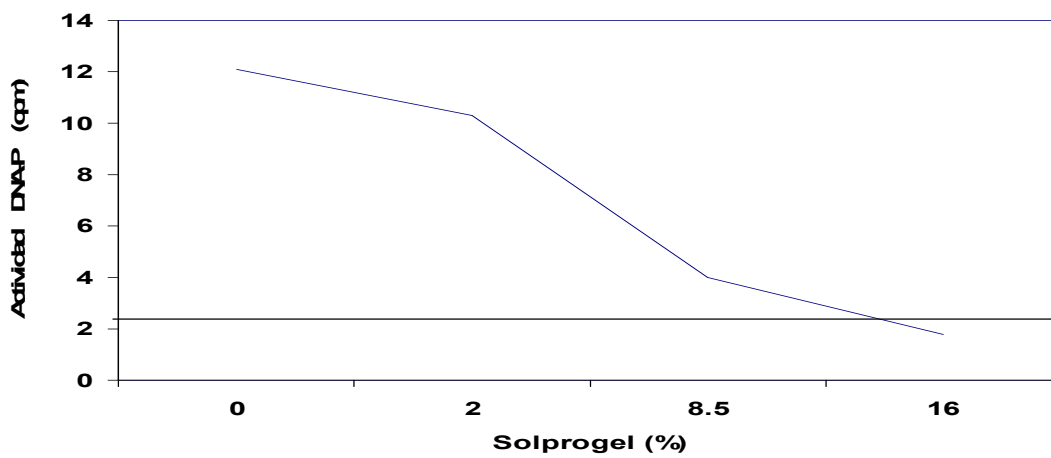


Figura 13: Efecto dosis-respuesta de distintas formulaciones de Solprogel® (2, 8.5 y 16%) sobre la DNA-P del VHB



Estudios previos ^{102, 109} han demostrado que la actividad del enzima en una reacción endógena es sensible a la inhibición por HOCl y NaDCC mediante estudios de dosis-respuesta, siendo independiente de la duración del tiempo de exposición. No obstante, Sherertz et al. ¹⁹¹ comentan que la actividad enzimática de la DNA-P no se correlaciona con la infectividad, ya que hallan partículas de VHB completas (partículas Dane) confirmadas por microscopía electrónica, pero con actividad DNA-P negativa. Así, otros autores ²⁵⁹ señalan que la DNA-P no es un marcador de infectividad, dado que es posible infectar a chimpancés con DNA del VHB sin actividad DNA-P.

El estock vírico empleado en este estudio fue preparado a partir de suero humano positivo para VHB (HBsAg y HBeAg positivos). Sueros y plasmas de estas características han sido utilizados previamente en otros estudios de inactivación vírica ^{102, 109}. Aunque Weber et al. ²⁶⁰ han demostrado que la actividad biocida del NaOCl puede ser bloqueada por las proteínas séricas, en nuestro caso no se investigó el efecto de las proteínas o materia orgánica sobre la inactivación enzimática de la DNA-P del VHB.

Nuestros datos demuestran que el enzima fue sensible a la inhibición de desinfectantes que contienen NaDCC. La concentración mínima de NaDCC necesaria para inactivar la DNA-P de VHB fue de 1.000 ppm de cloro disponible en un tiempo de contacto mínimo de 2 min. Solprogel[®] fue efectivo a la formulación del 16%, que contiene 960 ppm de cloro disponible. Estos resultados son similares a los publicado por Nath et al. ¹⁰⁹. Estos autores demostraron que la actividad remanente de la DNA-P después del tratamiento con NaOCl esta inversamente relacionada con la cantidad de cloro disponible e independiente del tiempo de exposición al compuesto. Así, se perdió solo un 25% de la actividad de la DNA-P del VHB cuando la cantidad de cloro disponible fue de 250 ppm, siendo casi toda la inactivación en el primer min. de contacto. Cuando el cloro disponible fue de 1.250 ppm, únicamente se detectó el 30% de la actividad de la DNA-P inicial después de 2 min. y no se halló actividad con 2.500 ppm de cloro disponible después de 1 min. de contacto. Por otro lado, Tsiquaye y Barnard ¹⁰² afirman que el NaDCC es más efectivo que el NaOCl para inactivar el VHB, dado que dos minutos de exposición con NaDCC (2.200 ppm de cloro disponible) inhiben totalmente la actividad de la DNA-P frente a las 3.600 ppm de NaOCl de la lejía doméstica o 3.200 ppm de la lejía industrial.

En conclusión, en este estudio se demostró la total inactivación de la DNA-P del VHB después del tratamiento del virus con 1.000 ppm de cloro disponible de NaDCC y Solprogel[®] al 16% en 2 min.

6. CONCLUSIONES

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”

Aristóteles

6. CONCLUSIONES

6.1. Estudio *in vitro* de evaluación comparativa de Perasafe[®] con glutaraldehído alcalino al 2% frente a *Mycobacterium* spp (artículo 1)

1. Perasafe[®] es micobactericida y tuberculocida en 20 min. de contacto frente a MAI, *M.tuberculosis*, *M.fortuitum* y *M.chelonae*.
2. Cidex[®] fue micobactericida y tuberculocida en 30 min. de exposición.
3. MAI fue la micobacteria más resistente a la acción del ácido peracético y del glutaraldehído alcalino al 2%.
4. El aislamiento de *M.chelonae* utilizado en el estudio fue sensible al glutaraldehído alcalino, pero requirió un tiempo de exposición elevado.
5. Perasafe[®] puede ser un producto alternativo al glutaraldehído alcalino al 2% para la desinfección de alto nivel de los dispositivos médicos.

6.2. Estudio *in use* de evaluación de Perasafe[®] comparado con Cidex[®] en la desinfección de BFs (artículo 2)

1. La limpieza del BF consiguió una eliminación media de microorganismos de 2.48 log₁₀.
2. Perasafe[®] y de Cidex[®] fueron igualmente eficaces en el procedimiento de desinfección de los BFs tras 10 min. de contacto frente a *M.tuberculosis*, no recuperándose microorganismos viables (cultivos negativos).
3. Perasafe[®] y de Cidex[®] consiguieron un factor de reducción logarítmico ≥ 5 en 20 min. de exposición frente a MAI, aunque con Cidex[®] no se recuperaron micobacterias viables y con Perasafe[®] se obtuvo un número reducido de microorganismos.
4. Perasafe[®], es un desinfectante de alto nivel efectivo frente a micobacterias y constituye una posible alternativa al glutaraldehído alcalino al 2% en la desinfección de BFs.

6.3. Evaluación de la actividad micobactericida y tuberculocida de Korsorex[®], un detergente-desinfectante (artículo 3)

1. Korsorex[®] AF demuestra una aceptable actividad microbiana frente a *M.tuberculosis*, MAI, *M.kansasii* y *M.chelonae* en ensayos cuantitativos de suspensión y de portagérmenes.
2. La presencia de materia orgánica en los ensayos cuantitativos de portagérmenes incrementó el tiempo de exposición requerido.
3. MAI fue la micobacteria más resistente a la acción Korsorex[®].
4. Dada la actividad micobactericida y tuberculocida de este producto, los productos biocidas que contienen aminas podrían ser útiles en la desinfección intermedia y de alto nivel de los dispositivos médicos.
5. Además, como producto pre-desinfectante Korsorex[®] puede contribuir a reducir el riesgo de infección por micobacterias en los trabajadores de los centros sanitarios que manipulan material quirúrgico o dispositivos médicos durante los procesos de descontaminación, desinfección y/o esterilización.

6.4. Sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes de *Acinetobacter baumannii* (artículo 4)

1. Todas las cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas a lo largo del brote epidémico fueron sensibles a todos los antisépticos y desinfectantes ensayados, incluyendo alcoholes, fenoles, QACs y clorhexidina al 4%.
2. *In vitro*, no se observó resistencias de las cepas de *A.baumannii* a los biocidas.
3. En este estudio, la resistencia a múltiples antibióticos de las cepas de *A.baumannii* no se asoció a resistencia o descenso de sensibilidad a los antisépticos y desinfectantes.

6.5. Evaluación *in vitro* de la eficacia de Virkon[®] al 1% frente a bacterias, hongos, virus y esporas mediante normativas AFNOR (artículo 5)

1. Virkon[®] al 1% es un desinfectante de bajo nivel por ser un biocida con efecto antimicrobiano rápido frente a bacterias vegetativas (gramnegativas y

grampositivas), levaduras, virus y micobacterias no tuberculosas en ensayos cuantitativos de suspensión, pero únicamente bactericida en los ensayos con portagérmenes.

2. Por lo expuesto en el apartado anterior, Virkon® al 1% no puede considerarse un producto alternativo al glutaraldehído alcalino en la desinfección de alto nivel.

6.6. Estudio *in vitro* de la actividad virucida de Solprogel® frente al VIH (artículo 6)

1. El NaDCC, a una concentración de 100 ppm de cloro disponible, inhibió el VIH-1 después de 5 min. de exposición.
2. Solprogel® a una concentración de 120 ppm de cloro disponible, posee actividad virucida frente a VIH en 5 min. de contacto.
3. Solprogel®, por su capacidad de formar un gel en contacto con líquidos y su actividad frente a VIH es un desinfectante útil para usarlo sobre fluidos y tejidos contaminados con el virus.

6.7. Evaluación de la eficacia de Solprogel® frente al VHB (artículo 7)

1. El enzima DNA-P del VHB fue sensible a la inhibición de los desinfectantes clorados, NaDCC y Solprogel® evaluados.
2. La concentración mínima de NaDCC necesaria para inactivar la DNA-P del VHB fue de 1.000 ppm de cloro disponible y se requirió un tiempo de contacto mínimo de 2 min.
3. De las tres formulaciones evaluadas, Solprogel® al 16% que contiene 960 ppm de cloro disponible, fue efectiva para inactivar la DNA-P del VHB en un tiempo de exposición mínimo de 2 min.

7. BIBLIOGRAFÍA

“Uno no es lo que es por lo que escribe, sino por lo que ha leído”

Jorge Luís Borges

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Michele TM, Cronin WA, Graham NM et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by a fiberoptic bronchoscope. Identification by DNA fingerprinting. JAMA 1997; 278: 1093-1095.
2. Wenzel R. *M.tuberculosis* infection after bronchoscopy. JAMA 1997; 278: 1111.
3. Wade JJ. Emergence of *Enterococcus faecium* resistant to glycopeptides and other standard agents- a preliminary report. J Hosp Infect 1995; 30 (Suppl): 485-493.
4. Wenzel RP, Netteleman MD, Jones RN, Pfaller MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and control measures. Am J Med 1991; 91 (Suppl. 3B): 212S-227S.
5. Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1997; 24 (Suppl 1): S74-S79.
6. Strulens MJ, Carlier E, Maes N, et al. Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. J Hosp Infect 1993; 25: 15-32.
7. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-165.
8. Hugo WB. Historical introduction. En: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Disinfection, preservation and sterilization. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 1999; 1-4.
9. Cremieux A, Freney J, Davin-Regli A. Methods of testing disinfectants. En: Block SS (ed). Disinfection, Sterilization and Preservation. 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; 1305-1327.
10. Garner JS, Favero MS. CDC guideline for handwashing and hospital environmental controls, 1985. Infect Control 1986; 7:231-43.
11. Spaulding EH. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Lawrence CA, Block SS (eds). Disinfection, Sterilization and Preservation. Philadelphia: Lea and Febiger, 1968; 517-531.
12. Food and Drug Administration and Environmental Protection Agency. Memorandum of understanding between the Food and Drug Administration, Public Health Service, Department of Health and Human Service, and the Environmental

- Protection Agency: notice regarding matters of mutual responsibility-regulation of liquid chemical germicides intended for use on medical devices. 1993. Disponible on-line: [ftp:// fedbbs. access. gpo. gov/ gpo_bbs/ epa_frc/ epa_fda. asc](ftp://fedbbs.access.gpo.gov/gpo_bbs/epa_frc/epa_fda.asc).
13. Food and Drug Administration. Interim measures for the registration of antimicrobial products/liquid chemical germicides with medical device use claims under the memorandum of understanding between FDA and EPA. CDRH facts and demand, self n° 851, pag. 14, 30 de junio de 1994. Disponible on line: [http:// www.fda.gov](http://www.fda.gov).
 14. Rutala WA. APIC Guidelines for selection and use of disinfectants. *Am J Infect Control* 1996; 24: 313-42.
 15. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health, Infection Control Devices Branch, Division of Dental, Infection Control and General Hospital Devices, Office of Device Evaluation (2000). Guidance for Industry and FDA Reviewers. Content and format of premarket notification [510(k)] submissions for liquid chemical sterilants/high level disinfectants. CDRH, FDA.
 16. Sattar SA and Springthorpe VS. Methods under development for evaluating the antimicrobial activity of chemical germicides. En: *Proceedings of the International Symposium on chemical germicides in health care*. Cincinnati: Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc., 1994; 237-254.
 17. Reybrouck G. Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of disinfectants. En: Russell AD, Hugo WB and Ayliffe GAJ eds. *Disinfection, Preservation and Sterilization*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999; 124-144.
 18. Members of American Society for Gastrointestinal Endoscopy ad Hoc Committee on Disinfection. Reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 540-546.
 19. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, et al. Patient to patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337: 237-240.
 20. EN 1040: 1997. Chemical disinfectants and antiseptics-basic bactericidal activity-test method and requirements (phase 1). European Committee for Standardization (CEN).
 21. PrEN 14347: 2001. Chemical disinfectants. Basic sporicidal activity. Test method and requirements (phase 1). European Committee for Standardization (CEN).

22. EN 1275: 1997. Chemical disinfectants and antiseptics-basic fungicidal activity-test method and requirements (phase 1). European Committee for Standardization (CEN).
23. EN 1276: 1997. Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
24. EN 1650: 1997. Chemical disinfectants and antiseptics-quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
25. Cole EC, Rutala WA, Johnson JL. Evaluation of penicylinders used in disinfectant testing: Bacterial attachment and surface texture. *J AOAC* 1987; 70: 903-906.
26. Mulberry G. Currents methods of testing disinfectants. En: *Proceedings of the International Symposium on chemical germicides in health care*. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc., Cincinnati, 1994; 225-235.
27. NF T72-190: 1988. Désinfectants de contact utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité bactéricide, fongicide et sporicide. Méthode des porte-germes. Association Française de Normalisation. Paris : La Défense, 1989.
28. Peters J, Spicher G. Model tests for efficacy of disinfectants on surface. IV communication: dependence of test results on the amount of contamination and the kind of active substance. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1998; 201:311-323.
29. PrEN 13697: 1999. Chemical Disinfectants and Antiseptics. Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method without mechanical action and requirements (phase 2/step 2). European Committee for Standardization (CEN).
30. PrEN 13713: 1999. Chemical Disinfectants –Surface disinfectants used in human medicine, bactericidal activity. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
31. Bloomfield SF, Arthur M. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides. *J Appl Bacteriol Symp* 1994; 76 (Suppl): 91S-104S.

32. PrEN 14561: 2002. Chemical Disinfectants -Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in medical area. Test method and requirements (phase 2, step 2). European Committee for Standardization (CEN).
33. PrEN 14562: 2002. Chemical Disinfectants -Quantitative carrier test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in medical area. Test method and requirements (phase 2, step 2). European Committee for Standardization (CEN).
34. PrEN 14563: 2002 Chemical disinfectants and antisepsis. Quantitative carrier test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectant for instruments used in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 2). European Committee for Standardization (CEN).
35. PrEN 13727: 2003. Chemical Disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
36. PrEN 13624: 2003. Chemical Disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
37. PrEN 14348: 2004. Chemical disinfectants and antisepsis. Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectant in the medical area including instrument disinfectants. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
38. Bradley CR, Babb JR, Ayliffe GA. Evaluation of the Steris System 1 peracetic acid endoscope processor. *J Hosp Infect* 1995; 29: 143-151.
39. Deva AK, Vickery K, Zou J et al. Establishment of an *in use* testing methods for evaluating disinfection of surgical instruments using the duck hepatitis model. *J Hosp Infect* 1996; 32: 119-30.
40. Tsuji S, Kawano S, Oshita M et al. Endoscopy disinfection using acidic electrolytic water. *Endoscopy* 1999; 31: 528-35.

41. Chanzy B, Duc-Bin DL, Rousset B et al. Effectiveness of a manual disinfection procedure in elimination hepatitis C virus from experimentally contaminated endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1999; 50:147-151.
42. Cronmiller JR, Nelson DK, Jackson DK et al. Efficacy of conventional endoscopic disinfection and sterilization methods against *Helicobacter pylori* contamination. *Helicobacter* 1999; 4: 198-203.
43. Middleton AM, Chadwick MV, Sanderson JL et al. Comparison of a solution of super-oxidized water (Sterilox) and glutaraldehyde for the disinfection of bronchoscopes contaminated. *J Hosp Infect* 2000; 45: 278-82.
44. Folliente RL, Kovacs BJ, Aprecio RM et al. Efficacy of high-level disinfectants for reprocessing GI endoscopes in simulate-use testing. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 456-462.
45. Gaspar MC, García-Margallo T, Loscos JM et al. Desinfección de colonoscopios. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 4: 727.
46. Fraser VJ, Zuckerman G, Clouse RE et al. A prospective randomized trial comparing manual and automated endoscope disinfection methods. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14:383-389.
47. Alfa MJ, Sitter DL In-hospital evaluation of orthophthalaldehyde as a high level disinfectant for flexible endoscopes. *J Hosp Infect* 1994; 26: 15-26.
48. Gaspar MC, Ramírez Armengol J, Fereres J. Colonoscope disinfection with Virkon or New Ger. *J Hosp Infect* 1998; 40 (Suppl. A): P.9.4.1.
49. Alvarado CJ, Reichelderfer M. APIC guidelines for infection prevention and control in flexible endoscopy. *Am J Infect Control* 2000; 28:138-155.
50. Bond WW, Hedrick ER. Microbiological culturing of environment and medical devices surfaces. En: Isenberg HD, Gilchrist MJR (eds). *Clinical Microbiology Procedures handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992: 11 10 1, 11 10 9.
51. Food and Drug Administration. General hospital and personal use devices: classification of liquid chemical sterilants/high level disinfectants and general purpose disinfectants. *Federal Register* 2000; 65: 36324-36326.
52. Widmer AF and Frei R. Decontamination, disinfection and sterilization. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover F y Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1999; 138-164.

53. Rodríguez-Froján G, Castella J, Ausina V et al. Estudio experimental de la desinfección del broncofibroscopio. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1994; 12: 433-438.
54. Jackson J, Leggett JE, Wilson A, Gilbert DN. *Mycobacterium gordonae* in fiberoptic bronchoscopes. *Am J Infect Control* 1996; 24: 19-23.
55. Middleton AM, Chadwick MV, Gaya H. Disinfection of bronchoscopes, contaminated in vitro with *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intracellulare* and *Mycobacterium chelonae* in sputum, using stabilized, buffered peracetic acid solution (Nu-Cidex). *J Hosp Infect* 1997; 37: 137-143.
56. De la Peña J, Sanchez E, Rivero M et al. Cleaning and disinfection of gastrointestinal endoscopes. Comparative analysis of two disinfectants. *Rev Esp Enferm Dig* 1999; 91: 489-96.
57. Chaufour X, Deva AK, Vickery K et al. Evaluation of disinfection and sterilization of reusable angioscopes with the duck hepatitis B model. *J Vasc Surg* 1999; 30: 277-82.
58. Vesley D, Melson J and Stanley P. Microbial bioburden in endoscope reprocessing and an *in use* evaluation of the high-level disinfection capabilities of Cidex. *Gastroenterol Nurs* 1999; 22: 63-68.
59. Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Hand Hygiene in Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *MMWR* 2002; 51 (RR-16): 1-45.
60. PrEN 12054: 1995. Chemical disinfectants and antiseptics. Products for hygienic and surgical handrub and handwash. Bactericidal activity. Test methods and requirements (phase 2/ step 2). European Committee for Standardization (CEN).
61. Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect* 2003; 55: 108-115.
62. PrEN 14476: 2003. Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectant and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).

63. UNE-EN 1499:1997. Antisépticos y desinfectantes químicos. Lavado higiénico de las manos. Método de ensayo y requisitos (fase 2/ etapa 2). Comité Técnico AEN/CTN 111, Aparatos y Dispositivos Médicos y Quirúrgicos.
64. UNE-EN 1500: 1998. Antisépticos y desinfectantes químicos. Tratamiento higiénico de manos por fricción. Método de ensayo y requisitos (fase 2/ etapa 2). Comité Técnico AEN/CTN 111, Aparatos y Dispositivos Médicos y Quirúrgicos.
65. PrEN 12791: 1997. Chemical disinfectants and antiseptics. Surgical hand disinfectants. Test methods and requirements (phase 2/ step 2). European Committee for Standardization (CEN).
66. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouth rinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55:95-100.
67. Pitten FA, Splieth C, Kramer A. Prophylactic and therapeutic application of antimicrobial agents in the oral cavity. *Pharmazie* 2000; 55: 635-639.
68. Messenger S, Goddard PA, Dettman PW, Maillard JY. Comparison of two *in vivo* and two *ex-vivo* test to assess the antibacterial activity of several antiseptics. *J Hosp Infect* 2004; 58: 115-21.
69. Collins FM. Bactericidal activity of alkaline glutaraldehyde solution against a number of atypical mycobacterial species. *J Appl Bacteriol* 1986; 61: 247-251.
70. van Klingeren B and Pullen W. Comparative testing of disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium terrae* in a quantitative suspension test. *J Hosp Infect* 1987; 10: 292-298.
71. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacy of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2234-2239.
72. Cole EC, Robinson R. Test methodology for evaluation of germicides. En: JM Ascenzi (ed). *Handbook of disinfectants and antiseptics*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1996; 1-16.
73. Russell AD. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. En: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3th ed. Russell AD, Hugo WB and Ayliffe GAJ editors. Oxford: Blackwell Science, Ltd., 1999; 95-123.
74. Knott AG, Dancer BN, Hann AC, Russell AD. Non-variable sources of pure water and the germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *J Appl Microbiol* 1997; 82: 267-272.

75. Gardner JF and Peel MM. Sterilization, disinfection and infection control. Churchill Livingstone. 3th ed. Melbourne: Harcourt Brace & Company, 1998.
76. Lorian V. *In vitro* simulation of *in vivo* conditions: physical state of the medium. J Clin Microbiol 1989; 27: 2403-2406.
77. Russell AD, McDonnell G. Concentration: a major factor in studying biocidal action. J Hosp Infect 2000; 44: 1-3.
78. Gorman SP, Scout EM, Russell AD. Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. J Appl Bacteriol 1980; 48: 161-190.
79. Griffiths PA, Badd JR and Fraise AP. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test. J Hosp Infect 1998; 38: 183-192.
80. Sutton SVW. Neutralizer evaluations as control experiments for antimicrobial efficacy test. En: Handbook of disinfectants and antiseptics. Ascenzi ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996; 43-62.
81. Valot S, Edert D and Le Faou A. A simple method for the *in vitro* study of the virucidal activity of disinfectants. J Virol Method 2000; 86: 21-24.
82. Aidaros H and Gaudin OG. A gel filtration method to test the efficiency of virucidal disinfectants. Comp Immun Microbiol Infec Dis 1983; 6: 221-226.
83. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): Variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis 1999; 29: 253.
84. Swart SK and Hilgren JD. Methods of testing fungicides. En: Disinfection, Sterilization and Preservation. Block editor. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 1383-1389.
85. Terleckyj B and Axler DA. Quantitative neutralization assay of fungicidal activity of disinfectants. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 794-798.
86. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis, 15th edn. Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1990.
87. NF T72-200: 1987. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité fongicide. Méthode par dilution-neutralisation. Association Française de Normalisation. Paris: La Défense, 1989.

88. Miner NA, Mulberry GK, Starks AN et al. Identification of possible artefacts in the Association of Official Analytical Chemist sporicidal test. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1658-1660.
89. Birnie GC, Quigley EM, Clements GB, Follett EA, Watkinson G. Endoscope transmission of hepatitis B virus. *Gut* 1983; 24: 171-174.
90. Blanchard A, Ferris S, Chamaret S, Guetard D, Montagnier L. Molecular evidence for nosocomial transmission of human immunodeficiency virus from a surgeon to one of his patients. *J Virol* 1998; 72: 4537-4540.
91. Rabkin CS, Telzak EE, Ho MS et al. Outbreak of echovirus 11 infection in hospitalized neonates. *Pediatr Infect Dis* 1988; 7: 186-190.
92. De Lamballerie X, Olmer M, Benchonard D, Zandoti C, De Micco P. Nosocomial transmission of hepatitis C virus in haemodialysis patients. *J Med Virol* 1996; 49: 296-302.
93. Cambon M, Jallart-Archimbaud C, Bailly JL, et al. Comparative sensitivities of Sabin and Mahoney poliovirus type 1 prototype and two recent isolates to low concentrations of glutaraldehyde. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3199-3204.
94. Guideline of Bundesgesundheitsamt (BGA; German Federal Health Office) and Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV; German Society for the Control of Virus Diseases) for testing the effectiveness of chemical disinfectants against viruses. *Zbl Hys* 1990; 189: 554-562.
95. NF T72-180: 1986. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité virucide vis-à-vis des virus de vertébrés. Association Française de Normalisation. Paris: La Défense, 1989.
96. Sattar SA and Springthorpe VS. Methods of testing the virucidal activity of chemicals. En: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block editor. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 1391-1412.
97. Atler MJ, Ahrone J, Maynard JE. Hepatitis B virus transmission associated with a multiple-dose vial in a haemodialysis unit. *Ann Intern Med* 1983; 99: 330-333.
98. Grob PJ, Bischof B, Naeff F. Cluster of hepatitis B transmitted by a physician. *Lancet* 1981; 8257: 1218-1220.
99. Bond WW, Favero MS, Peterson NJ, Eber JW. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 535-538.

100. Kobayashi H, Tsuzuki M, Koshimizu K, et al. Susceptibility of hepatitis B virus to disinfectant or heat. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 214-216.
101. Prince DL, Prince HN, Thraenhart O, Muchmore E, Bonder E, Pugh J. Methodological approaches to disinfection of human hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3296-3304.
102. Tsiquaye KN, Barnard J. Chemical disinfection of duck hepatitis B virus: a model for inactivation of infectivity of hepatitis b virus. *J Antimicrobial Chemother* 1993; 32: 313-323.
103. Schinazi RF, Illan E, Black PL et al. Cell-based and animal models for hepatitis B and C viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 1999; 10: 99-114.
104. Kock J, Nassal m, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsacker F. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol* 2001; 75: 5084-5089.
105. Vickery K, Deva AK, Zon J, Kumaradeva P, Bissett L, Cossart YE. Inactivation of duck hepatitis B virus by a hydrogen peroxide gas plasma sterilization system: laboratory and in use testing. *J Hosp Infect* 1999; 41: 317-322.
106. Pugh JC, Ijaz MK and Suchmann DB. Use of surrogate models for testing efficacy of disinfectants against hepatitis B virus. *Am J Infect Control* 1999; 27: 375-376.
107. Wang C-Y J, Giambrone JJ, Smith BF. Development of viral disinfectant for duck hepatitis B virus using cell culture/ PCR. *J Virol Methods* 2002; 106: 39-50.
108. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42: 762-767.
109. Nath N, Fang CT, Doodd RY. Inactivation of DNA polymerase associated with hepatitis B virus. *J Med Virol* 1982; 10: 131-140.
110. Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S, Petit MA. *In vitro* infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J Virol* 1990; 64: 3025-3032.
111. Payan C, Cottin C, Lemarie C, Ramona C. Inactivation of hepatitis B virus in plasma by hospital in-use chemical disinfectants assessed by a modified HepG2 cell culture. *J Hosp Infect* 2001; 47: 282-287.
112. Payan C, Pivert A, Kampf G, Ramont C, Cottin J, Lemarie C. Assessment of new chemical disinfectants for HBV virucidal activity in a cell culture model. *J Hosp Infect* 2004; 56: S58-S63.

113. Rey JF, Halfen P, Feryn JM, Khiri H, Masseyeff MF, Quzan D. Risk of transmission of hepatitis C virus by digestive endoscopy. *Gastroenterol Clin Biol* 1995; 19: 346-349.
114. Spach DH, Silverstein FE, Stamin WE. Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Ann Intern Med* 1993; 118: 117-128.
115. Valli MB, Carloni G, Manzin A, et al. (1997). Hepatitis C virus infection of a Vero cell clone displaying efficient virus-cell binding. *Res. Virol* 1997; 148: 181-186.
116. Agolini G, Russo A, Pharm D and et al. Effect of phenolic and chlorine disinfectants on hepatitis C virus binding and infectivity. *Am J Infect Control* 1999; 27: 236-239.
117. Charrel RN, de Chesse R, Decaudin A, De Micco P, De Lamballerie X. Evaluation of disinfectant efficacy against hepatitis C virus using a RT-PCR-based method. *J Hosp Infect* 2001; 49: 129-134.
118. Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, Tondreu S, Markham PD. Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *JAMA* 1986; 255: 1887-1891.
119. Hanson PJ, Gor D, Jeffries DJ, Collins JV. Chemical inactivation of HIV on surfaces. *Br Med J* 1989; 298: 862-4.
120. Van Bueren J, Simpson RA, Jacobs P et al. Survival of human immunodeficiency virus in suspension and dried onto surfaces. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (2): 571-574.
121. Tjotta E, Hungnes O, Grinde B. Survival of HIV-1 activity after disinfection, temperature and pH changes, or drying. *J Med Virol* 1991; 35: 223-227.
122. Aranda-Anzaldo A, Viza D and Busnel RG. Chemical inactivation of human immunodeficiency virus *in vitro*. *J Virol Methods* 1992; 37: 71-82
123. Van Bueren J. Methodology for HIV disinfectant testing. *J Hosp Infect* 1995; 30 (Suppl.): 383-388.
124. Lee MH, Sano K, Morales FE, Imagawa DT. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitative HIV-1. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1717-21.
125. Sattar SA, Springthorpe VS. Survival and disinfectant inactivation of the human immunodeficiency virus: a critical review. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 430-47.
126. Cole EC, Rutala WA, Nessen L et al. Effect of methodology dilution and exposure time on the tuberculocidal activity of glutaraldehyde-based disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1813-1817.

127. Ascenzi JM, Ezzell RJ and Wendt TM. Evaluation of carriers used in the test methods of the Association of Official Analytical Chemists. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 91-94.
128. Ascenzi JM, Ezzell RJ and Wendt TM. A more accurate method for measurement of tuberculocidal activity of disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 2189-2192.
129. Sattar SA, Bestt M, Springthorpe VS, Sanani G. Mycobactericidal testing of disinfectants: an update. *J Hosp Infect* 1995; 30 (Suppl): 372-382.
130. Ascenzi JM. Standardization of tuberculocidal testing of disinfectants. *J Hosp Infect* 1991; 18 (Suppl A): 256-263.
131. PrEN 13272: 2002. Chemical disinfectants and antisepsis. Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity for instruments used in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
132. Hanson PJV, Gor D, Clarke JR et al. Contamination of endoscopes used in AIDS patients. *Lancet*: 1989; 2: 86-88.
133. Broadley SJ, Jenkins PA, Furr JR, and Russell AD. Antimycobacterial activity of biocides. *Lett Appl Microbiol* 1991; 13: 118-122.
134. Holton J, Nye P, McDonald V. Efficacy of selected disinfectants against mycobacteria and cryptosporidia. *J Hosp Infect* 1994; 27:105-115.
135. van Klingeren B, Pullen P. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. *J Hosp Infect* 1993; 25:147-149.
136. Lynan PA, Babb JR, Fraise AP. Comparison of the mycobactericidal activity of 2% alkaline glutaraldehyde and Nu-Cidex (0.35% peracetic acid). *J Hosp Infect* 1995; 30: 237-239.
137. Taylor DM. Transmissible degenerative encephalopathies: inactivation of the unconventional causal agents. En: Russell AD, Hugo WB and Ayliffe GAJ eds. *Disinfection, preservation and sterilization*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999; 222-236.
138. Fichet G, Comoy E, Duval C et al. Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 2004; 364: 521-526.
139. Baquero F, Patron C, Cantón R et al. Laboratory and *in vitro* testing of skin antiseptics: a prediction for *in vitro* activity. *J Hosp Infect* 1991; 18 (Suppl): 5-11.

140. Russell AD, Russell NJ. Biocides: activity, action and resistance. *Symp Soc Gen Microbiol* 1995; 53: 327-365.
141. Kolawole DO. Resistance mechanisms of mucoid-grown *Staphylococcus aureus* to the antibacterial action of some disinfectants and antiseptics. *FEMS Microbiol Lett* 1984; 25: 205-209.
142. MacDonell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-179.
143. Russell AD, Gould GW. Resistance of *Enterobacteriaceae* to preservatives and disinfectants. *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 1988; 65: 167S-195S.
144. Pallent LJ, Hugo WB, Grant DJW, Davies A. *Pseudomonas cepacea* and infections. *J Hosp Infect* 1983, 4: 9-13.
145. Ismaeel N, El-Moug T, Furr R, Russell AD. Resistance of *Providencia stuartii* to chlorhexidine: a consideration of the role of the inner membrane. *J Appl Bacteriol* 1986; 60: 361-367.
146. Russell AD. Activity of biocides against mycobacteria. *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 1996; 81: 87S-101S.
147. Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants. Present knowledge and future problems. *J Hosp Infect* 1998; 43 (Suppl): S57-S68.
148. Broadley SJ, Jenkis PA, Furr JR, Russell AD. Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpridinium chloride on mycobacteria by etambutol *J Med Microbiol* 1995; 43; 458-460.
149. Manzoor SE, Lambert PA, Griffiths PA, Gill MJ, Fraise AP. Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 759-765.
150. Knott AG, Russell AD, Dancer BN. Development of resistance to biocides during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol* 1995; 79: 492-498.
151. Knott AG, Russell AD. Effects of chlorhexidine gluconate on the development of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21: 117-120.
152. Bloomfield SF. Resistance of bacterial spores to chemical agents. En: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. *Disinfection, preservation and sterilization*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 1999; 303-320.

153. Setlow B, Setlow P. Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3418-3427.
154. Russell AD. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 99-114.
155. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey G et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41: 435-464.
156. Ramírez de Arellano E, Pascual A, Martínez-Martínez L et al. Antimicrobial activity in *Staphylococcus epidermidis* biofilms on polyvinyl chloride catheters. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 581-586.
157. Pérez-Giraldo C, Rodríguez-Benito A, Moran FJ et al. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 643-646.
158. Wood P, Jones M, Bhakoo M, Gilbert P. A novel strategy for control of microbial biofilms through generation of biocide at the biofilm-surface interface. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2598-2602.
159. Dimple B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet* 1991; 25: 315-337.
160. Elkins JG, Hassett DJ, Stewart PS, Scheizer HP, McDermott TR. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4594-4600.
161. Russell AD, Suller MTE, Maillard JY. Do antiseptics and disinfectants select for antimicrobial resistance? *J Med Microbiol* 1999; 48: 613-615.
162. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE* delta1 in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 159: 173-178.
163. Kummerle N, Feutch HH, Kaulfers PM. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of the resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2276-2279.
164. Pearce H, Messenger S, Maillard JY. Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 1999; 43: 101-107.

165. Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2151.
166. George AM. Multidrug resistance in enteric gramnegative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 139: 1-10.
167. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 166: 305-309.
168. Edgar R, Bibi E. MdfA, and *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J Bacteriol* 1997; 179: 2274-2280.
169. Barry AL, Fuchs PC, Brow SD. Lack of effect of antibiotic resistance on susceptibility of micro-organisms to chlorhexidine gluconate and povidone iodine. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 920-921.
170. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. *J Bacteriol* 1998; 180: 3477-3479.
171. Haines KA, Klein DA, McDonnell G, Pretzer D. Could antibiotic-resistance pathogens be cross-resistant to hard-surface disinfectants? *Am J Infect Control* 1997; 25: 439-441.
172. Alquerashi AM, Day MJ, Russell AD. Susceptibility of some strains of enterococci and streptococci to antibiotics and biocides. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 745.
173. Anderson RL, Carr JH, Bomd WS, Favero MS. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18: 195-199.
174. Kampf G, Jarosh R, Ruden H. Limited effectiveness of chlorhexidine based hand disinfectants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Hosp Infect* 1998; 38: 297-303.
175. Royal Pharmaceutic Society of Great Britain. Resistance to antimicrobials agents: submission to House of Lords subcommittee. *Pharm J* 1997; 259:919.921.
176. White DG, McDermott PF. Biocides, drug resistance, and microbial evolution. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4: 313-17.

177. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 1998; 394:531-32.
178. McMurry LM, McDermott PF, Levy SB. Genetic evidence that *InhA* of *Mycobacterium smegmatis* is a target of triclosan. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 711-13.
179. Heath RJ, Rock CO. A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* 2000; 406: 145-46.
180. Parikh SL, Xiao G, Tonge PJ. Inhibition of *InhA*, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* 2000; 39: 7645-50.
181. Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants over expressing *MexCD-OprJ*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 428-32.
182. Hiom SJ, Furr JR, Russell AD, Dickinson JR. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Bacteriol* 1992, 72: 335-340.
183. Maillard J-Y. Mechanisms of viricidal action. En: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3th ed. Russell AD, Hugo WB and Ayliffe GAJ ed. Oxford: Blackwell ScienceLtd., 1999; 207-221.
184. Parry C, Davies PDO. The resurgence of tuberculosis. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 23S-26S.
185. March F, Garriga X, Rodríguez P, et al. Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from compliant patients with human immunodeficiency virus-associated tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1044-7.
186. Wheeler PW, Lancaster D, Kaiser AB. Bronchopulmonary cross-colonisation and infection related to mycobacterial contamination of suction valves of bronchoscopes. *J Infect Dis* 1989; 159: 954-958.
187. Argerton T, Valway S, Gore B, Pozsik C, Plikaytis B, Woodley C, Onorato I. Transmission of a highly drug-resistant strain (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*. Community outbreak and nosocomial transmission via a contaminated bronchoscope. *JAMA* 1997; 278: 1073-1077.

188. Centers for Disease Control and Prevention. Bronchoscopy-related infections and pseudoinfections- New York, 1996 and 1998. MMWR 1999; 48: 557-560.
189. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection of endoscopes: Review of new chemical sterilants used for high-level disinfection. Infect Cont Hosp Epidemiol 1999; 20: 69-76.
190. Best M, Springthorpe VS, Sattar SA. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of microorganisms. Am J Infect Control 1994; 22; 152-162.
191. Stanley P. Efficacy of peroxygen compounds against glutaraldehyde resistant mycobacteria. Am J Infect Control 1999; 27: 339-343.
192. Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP. Mycobactericidal activity of selected disinfectants using a quantitative suspension test. J Hosp Infect 1999; 41: 111-121.
193. Coates D, Hutchinson DN. How to produce a hospital disinfection policy. J Hosp Infect 1994; 26: 57-68.
194. Griffiths PA, Babb JR, Bradley CR, Fraise AP. Glutaraldehyde resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. J Appl Microbiol 1987; 82: 519-526.
195. Leers W. Disinfecting endoscopes: how not to transmit *Mycobacterium tuberculosis* by bronchoscopy. Can Med Assoc J 1980; 123: 275-280.
196. Nelson KE, Larson PA, Schraufnagel DE, Jackson J. Transmission of tuberculosis by flexible fiberbronchoscopes. Am Rev Respir Dis 1983; 127: 97-100.
197. Steere AC, Corrales J, von Graevenitz A. A cluster of *Mycobacterium gordonae* isolates from bronchoscopy specimens. Am Rev Respir Dis 1979; 120: 214-216.
198. Favero MS. Strategies for disinfection and sterilization of endoscopes: the gap between basic principles and actual practice. Infect Control Hosp Epidemiol 1991; 12: 279-281.
199. Rutala WA. Infection practices for endoscopes and other semicritical items. Infect Control Hosp Epidemiol 1991; 12: 282-288.
200. Bennett SN, Peterson DE, Johnson DR, Hall WN, Robinson-Dunn B, Dietrich S. Bronchoscopy-associated *Mycobacterium xenopi* pseudoinfection. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 245-250

201. Alvarado CJ, Stolz SM, Maki DG. Nosocomial infection from contaminated endoscopes: a flawed commercial endoscope washer. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl 3B): 272S- 280S.
202. Fraser VJ, Jones M, Murray PR, Medoff G, Zhang Y, Wallace Jr RJ. Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 853-855.
203. Gubler JG, Salfinger M, von Graevenitz A. Pseudoepidemic of nontuberculous mycobacteria due to a contaminated bronchoscope cleaning machine. Report of and outbreak and review of the literature. *Chest* 1992; 101:1245-1249.
204. Department of Health (NHS Estates). Decontamination Guidance. HTM 2030: washer-disinfectors validation and verification. 1999.
205. Hanson PJ, Jeffries DJ, and Collins JV. Viral transmission and fiberoptic endoscopy. *J Hosp Infect* 1991; 18 (Suppl. A): 136-140.
206. Hanson PJV, Chadwick MV, Gaya H, Collins JV. A study of glutaraldehyde disinfection of fibreoptic bronchoscopes experimentally contaminated with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Hosp Infect* 1992; 22: 137-142.
207. Rutala WA, Weber DJ. Reprocessing endoscopes: United States perspectives. *J Hosp Infect* 2004; 56: S27-S39.
208. Nicholson G, Hudson RA, Chadwick MV and Gaya H. The efficacy of the disinfection of bronchoscopes contaminated in vitro with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium - intracellulare* in sputum: a comparison of Sactimed-I-Signald and glutaraldehyde. *J Hosp Infect* 1995; 29: 257-264.
209. Seballos RJ, Walsh AL and Metha AC. Clinical evaluation of liquid chemical sterilization system for the flexible bronchoscope. *J Bronchology* 1995; 2: 192-199.
210. Kneiflora J, Slosarek M, Melichercikova V, Parikova J. Microbiocidal effect of Lautercid, a new disinfectant. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Immunol* 1992; 41: 355-61.
211. Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med* 1998; 129: 182-189.

212. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, et al. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 2003; 53: 97-102.
213. Roberts SA, Findlay R, Lang SD. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *J Hosp. Infect* 2001; 48: 228-232.
214. Hangerger H, García Rodríguez JA, Gobernado M, Goznes H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European Countries. *JAMA* 1999; 281: 67-71.
215. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3403-3406.
216. Manuel RJ, Yen Shin G, Farrag N, Holliman R. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a London hospital. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 141-142.
217. Corbella X, Montero A, Pujol M, et al. Emergent and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol* 2000; 38:4086-4095.
218. Corbella X, Ariza J, Ardanuy C, et al. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 793-802.
219. Jiménez-Mejías ME, Pachón J, Becerril B, Palomino-Nicas J, Rodríguez-Cobacho A, Revuelta M. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/ sulbactam. *Clin Infect Dis* 1997; 4: 932-5.
220. Rodríguez Hernández MJ, Pachón J, Pichardo C, et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 493-501.
221. Montero A, Ariza J, Corbella X, et al. Efficacy of colistin versus β -lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1946-52.

222. Cardoso CL, Pereira HH, Zequim JC, Guihermetti M. Effectiveness of hand-cleansing agents for removing *Acinetobacter baumannii* strain from contaminated hands. *Am J Infect Control* 1999; 27:327-31.
223. Corbella X, Pujol M, Ayats J, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 329-34.
224. Garrouste-Orgeas M, Marie O, Rouveau M, Villiers s, Arlet G, Schlemmer B. Secondary carriage with multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in an adult ICU population: Relationship with nosocomial infections and mortality. *J Hosp. Infect* 1996; 34:279-89.
225. Webster C, Towner KJ, Humphrey H. Survival of *Acinetobacter* on three clinical related inanimate surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 246.
226. García Arata MI, Gener-Smidt P, Baquero F, Ibrahim A. PCR amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* stains at the DNA group level. *Res Microbiol* 1997; 148: 777-784.
227. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance for antimicrobial susceptibility testing; 9th informational supplement; M100-S9. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 1999.
228. Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, et al. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a residual concentration. *J Hosp Infect* 2000; 46: 297-303.
229. McDonnell G and Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Review* 1999; 12: 147-179
230. Rochon-Edouard S, Pons JL, Veber B, Larki M, Vassal S, Lemeland JF. Comparative *in vitro* and *in vivo* study of nine alcohol-based handrubs. *Am J Infect Control* 2004; 32: 200-4.
231. Rotter ML. Arguments for alcoholic hand disinfection. *J Hosp Infect* 2001; 48 (Suppl. A): S4-S8.
232. Pittet D. Compliance with hand disinfection and its impact on hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* 2001; 48 (Suppl. A): S40-S46.
233. Kramer A, Rudolph P, Kamf G, Pittet D. Limited efficacy of alcohol-based hand gels. *Lancet* 2002; 359: 1489-90.

234. Kampf G, Rudolf M, Labadie JC, Barrett SP. Spectrum of antimicrobial activity and user acceptability of the hand disinfectant agent Sterillium[®] Gel. *J Hosp Infect* 2002; 52: 141-147.
235. Rutala WA, Steiegel MM, Sarabbi FA, Weber DJ. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 417-421.
236. Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organism of reduced susceptibility. *J Hosp Infect* 2002; 51: 201-6.
237. Koljalg S, Naaber P, Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 2002; 51: 106-113.
238. Stickler DJ, Thomas B. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. *J Clin Pathol* 1980; 33: 288-296.
239. Broadley SJ, Furr JR, Jenkins PA, Russell AD. Antimycobacterial activity of Virkon[®]. *J Hosp Infect* 1993; 23: 189-197.
240. Tyler R, Ayliffe GAJ, Bradley C. Virucidal activity of disinfectants: studies with the polio virus. *J Hosp Infect* 1990; 15: 339-345.
241. NF T72-150: 1987. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables. Détermination de l'activité bactéricide (méthode par dilution-neutralisation). Association Française de Normalisation. Paris: La Défense, 1989.
242. NF T72-230: 1988. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables. Détermination de l'activité sporicide. Méthode par dilution-neutralisation. Association Française de Normalisation. Paris: La Défense, 1989.
243. Coates D, Wilson M. Powders composed of chlorine-releasing agent acrylic resin mixtures or based on peroxygen compounds for spills of body fluids. *J Hosp Infect* 1992; 21: 241-252.
244. Gaspar MC, Uribe p, González A, Ferrers J (1997). Estudio comparativo de la actividad del glutaraldehído alcalino, Virkon[®] y New-Ger[®]. IX Congreso de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Barcelona, 1997.
245. Clerici P, Decé F, Pescatori T, Pagani N. Valutazione dell'attività battericida di un nuovo disinfettante (Virkon[®]). *Ann Ig* 1992; 4: 113-117.

246. British Society of Gastroenterology. Aldehyde disinfectants and health in endoscopy units. *Gut* 1993; 34: 1641-1645.
247. Coates D, Spencer MB, Wareing DRA, Lee L. Possible use of 1% Virkon[®] solution for laboratory discard jars. *J Hosp Infect* 1992; 22:337-339.
248. Savino A, Pasquarella C, Cerbini I, Isa D, Pitzurra M. Attività di tre disinfettanti sporicidi a confronto. *Tecnica Ospedaliera* 1995; 32-40.
249. Braga A. Considerazioni sull'attività germicida del disinfettante Virkon[®]. *Ann Ig* 1995; 7: 35-41.
250. Coates D. Sporicidal activity of sodium dichloroisocyaaurate, peroxygen and glutaraldehyde disinfectants against *Bacillus subtilis*. *J Hosp Infect* 1996; 32: 283-294.
251. Spire B, Montagnier I, Barré-Sinoussi F, Cherman JC. Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by chemical disinfectants. *Lancet* 1984; 2: 899-901.
252. Martin LS, McDougal JS, Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 1985; 152: 400-403.
253. Richman DD, Mitsuya H, Broker S et al. Fusidic acid, HIV, and host toxicity. *Lancet* 1988; i: 1051-2.
254. Spickett G, Baettie RE, Bountiff L, Dalglish AG, Webster ADB. Quantification of HIV-1 activity in tissue culture supernatants: effects of culture condition on syncytial assays and virus production. *J Virol Methods* 1989; 24: 67-76.
255. Bloomfield SF, Smith-Bunchenell CA, Dalglish AG. Evaluation of hypochlorite-releasing disinfectants against the human immunodeficiency virus (HIV). *J Hosp Infect* 1990; 15: 273-278.
256. Kaplan PM, Greeman RL, Gerin JL et al. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; 12: 995-1005.
257. Tsiquaye KN, McCaul TF, Zuckerman AJ. Maternal transmission of duck hepatitis B virus in pedigree Pekin ducks. *Hepatology* 1985; 5: 622-8.
258. Sherertz EF, Davis GL, Rice RW, Harris BA, Franzini DA. Transfer of hepatitis B virus by contaminated reusable needle electrodes after electrodesiccation in simulated use. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 1242-1246.

259. Will H, Cattaneo R, Koch HG et al. Cloned HVB DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* 1982; 299: 740-742.
260. Weber DJ, Barbee SL, Sobsery MD, Rutala WA. The effect of blood on the viral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quaternary ammonium compound. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 821-827.

8. ARTÍCULOS

“En el arte, nada que merezca la pena se puede hacer sin genio; en ciencia, incluso una capacidad muy modesta puede contribuir a un logro supremo”

Bertrand Russell

8.1. Artículos en los que está basada la tesis

Artículo 1

A Hernández, E Martró, L Matas and V Ausina. In-vitro evaluation of Perasafe[®] compared with 2% alkaline glutaraldehyde against *Mycobacterium* spp. J Hosp Infect 2003; 54: 52-56.



In-vitro evaluation of Perasafe® compared with 2% alkaline glutaraldehyde against *Mycobacterium* spp.

A. Hernández, E. Martró, L. Matas, V. Ausina*

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 5 November 2002; accepted 20 December 2002

KEYWORDS

Perasafe®;
2% Glutaraldehyde;
Mycobacteria;
Disinfection

Summary Quantitative suspension and carrier tests were used to compare the activity of Perasafe® and Cidex® against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium chelonae*. The interference of an organic load, and of hard water was also considered. Both agents achieved reductions exceeding 10⁵-fold within 20 and 30 min for all the strains tested. Perasafe® is thus mycobactericidal and a viable alternative to Cidex® for intermediate or high-level disinfection.

© 2003 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Aldehyde-based agents have been commonly used for high-level disinfection in hospitals. Glutaraldehyde is by far the most used, especially for equipment, because of its broad spectrum and potency.^{1,2} However, its mycobacterial activity has been queried because of inability to penetrate the waxy layers in mycobacterial cell walls.^{3,4} Although use of automatic machines has reduced exposure to the side effects of aldehydes, these remain a problem for healthcare workers, and use of the machines has resulted in selection of glutaraldehyde-resistant strains like *Mycobacterium chelonae*.^{5,6}

Peracetic acid may be a suitable alternative as it has a wide spectrum of activity, even in the

presence of organic matter,⁵ and is considered a high-level disinfectant by the Food and Drug Association (FDA). Peracetic acid is water and lipid soluble, and becomes non-toxic on decomposition. It is a powerful oxidizing agent, and can be corrosive. However, commercial formulations such as Nu-Cidex® are an equilibrium mixture of peracetic and acetic acids with hydrogen peroxide is not corrosive and is rapidly mycobactericidal.⁷ Perasafe® is a new 0.26% peracetic acid-based disinfectant, which works at room temperature, and could be a good and cheap alternative to glutaraldehyde. This paper presents comparative data on its use against mycobacteria vs 2% alkaline glutaraldehyde using a suspension test and a carrier test.

Materials and methods

Disinfectants

The disinfectants were freshly prepared according

*Corresponding author. Dr V. Ausina, Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona 08916, Spain. Tel.: +34-3-49-788-94; fax: +34-3-49-788-95.

E-mail address: vausina@ns.hugtip.scs.es

to the manufacturer's instructions and used within 2 h. Perasafe (Antec International Limited, Sudbury, Suffolk, UK) was diluted in sterile distilled water for the suspension test and in standard hard water (200 ppm calcium carbonate) in the carrier test. For the suspension test, it was prepared 10% more concentrated to give the in-use dilution after addition of the inoculum.

Cidex 2% alkaline glutaraldehyde (Johnson & Johnson Medical Ltd, UK), was activated by increasing the pH of the solution by using the activator provided and tested at the in-use dilution.

Test organisms

The following strains of mycobacteria were used: *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv ATCC 9360, *M. chelonae* ATCC 35752 and clinical strains of *Mycobacterium avium-intracellulare*, and *Mycobacterium fortuitum*.

Preparation of mycobacterial suspensions

Stock cultures were stored at -80°C and before testing were thawed and spread on Löwenstein-Jensen medium (MAIN SA, Barcelona, Spain). *M. fortuitum* and *M. chelonae* were incubated for seven days at 37°C and 5% CO_2 , and the other test species for 20-30 days in the same conditions.

Test suspensions were prepared by suspending harvested mycobacteria in diluent (quarter strength Ringer's solution containing 0.5% Tween 80) and homogenizing them with sterile glass beads. Five to 10 mL of diluent was added, agitated and the suspension left to settle for 10 min. This supernatant fluid was adjusted reading the absorbance to give a concentration of 10^7 - 10^9 cfu/mL. Test suspensions were controlled by performing 10-fold dilutions up to 10^{-7} in diluent, and then cultured in 7H11 Middlebrook agar plates with oleic acid albumin dextrose catalase (OADC) supplement (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Disinfectant activity was also tested with an organic load by preparing test suspensions in 7.6 g/L tryptose phosphate broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The original test suspension was centrifuged at 3000 rpm for 15 min and then the sediment was resuspended in the same broth.

Freshly prepared test suspensions with and without organic matter for each micro-organism were used as initial inocula for all tests and used within 2 h.

Quantitative suspension test

All tests were performed at room temperature and both test suspensions (with and without organic matter) were tested for each micro-organism.

The method used was based on that described by Best *et al.*⁸ modified as follows. Briefly, 1 mL of each test suspension was added to 9 mL of disinfectant solution. Controls contained 9 mL diluent instead of disinfectant. Immediately after contact times of 5, 10, 20 and 30 min (and until 45-60 min for *M. avium-intracellulare*), 0.1 mL of the reaction mixture was removed and diluted 100-fold in neutralizer (quarter strength Ringer's solution containing 0.5% Tween 80 and 0.5% sodium thiosulphate). After 10 min neutralization further 10-fold dilutions were prepared in diluent up to 10^{-6} . Samples (1 mL) from the neat and subsequent dilutions were spread on 7H11 Middlebrook agar plates with OADC supplement in duplicate and incubated at 37°C and 5% CO_2 for up to four weeks (*M. fortuitum* and *M. chelonae*) or six weeks for the rest of micro-organisms. Samples (0.5 mL) from the same dilutions were also inoculated in Löwenstein-Jensen medium and incubated at 37°C for up to four or eight weeks, respectively. Survivors were enumerated as colony-forming units per millilitre.

The efficacy of the dilution-neutralization method was tested for both disinfectants. To assess the lack of any residual disinfectant activity after dilution and neutralization, 90 μL disinfectant and 10 μL water were added to 9.9 mL neutralizer. After 10 min, the reaction mixture was placed in a tube containing 10^6 cfu and processed as described above. The presence of any inhibitory effect on mycobacterial growth produced by the neutralization was also tested. One millilitre of the initial inoculum was added to 9 mL sterile distilled water and, after the maximum contact time, 0.1 mL of the mixture was pipetted into 9.9 mL neutralizer and processed as above.

Quantitative carrier test

The carrier test was performed by the technique described by Best *et al.*⁹ with minor modifications. Sterile borosilicate disks (12 mm diameter) were used as carriers, on which aliquots of 10 μL of each test suspension (with and without an organic load) were allowed to dry for 60 min in a class II biological safety cabinet. The contaminated area was then covered with 60 μL of disinfectant prepared at use dilution. Controls for each test suspension were covered with 60 μL hard water instead of disinfectant. After the contact times described in

the suspension test, carriers were placed into tubes containing 2.94 mL of neutralizer using sterile forceps. These tubes were vortexed for 30 s to elute the bacteria from the carrier. After 10 min neutralization the eluates were serially diluted down to 10^{-7} in diluent, samples spread on 7H11 and Löwenstein-Jensen medium, and incubated as described in the suspension test. A neutralization control was performed by placing an inoculated dried carrier in contact with the neutralized disinfectant and processed as before.

Interpretation of results

In the suspension test, disinfectant efficacy was determined by comparing growths on the control and disinfectant plates and it is reported as the \log_{10} reduction factor in the number of colony-forming units per millilitre at each contact time. In the carrier test it is reported as the \log_{10} reduction factor in the number of colony-forming units per carrier.

Both disinfectants were tested for their capacity to cause $\geq 10^5$ -fold reduction in colony-forming units ($\geq 99.999\%$ reduction). Disinfectants were considered mycobactericidal when a $\geq 10^5$ -fold reduction was achieved in the initial inoculum.

Results

Bacterial concentrations in the initial inocula of 1.05×10^7 – 1.72×10^8 cfu/mL. The dilution-neutralization method and the neutralizer was found to be effective leading to no residual disinfectant activity, and not inhibiting mycobacterial growth (data not shown) in the suspension test. Controls of test suspensions, dilution-neutralization method and the recovery of bacteria from carriers were satisfactory and ratified the obtained results (data not shown).

Quantitative suspension test

The results of mycobacterial activity tests are presented in [Tables I and II](#). Perasafe[®] was mycobactericidal (\log_{10} reduction factor >5) against four mycobacteria species in 5–10 min in the absence of organic load and in 5–20 min in the presence of tryptose phosphate broth. The clinical isolate of *M. avium-intracellulare* was by far the most resistant of the four tested mycobacteria under material load needing a longer exposure (30 min) for the same logarithm reduction.

Cidex achieved a \log_{10} reduction factor >5 in the absence of organic matter, but its activity was substantially reduced when organic matter was present as shown by the need to increase the exposure times to 30 min, except for *M. fortuitum*.

Quantitative carrier test

The data in [Tables III and IV](#) indicate the efficacies of both disinfectants. Perasafe showed a \log_{10} reduction factor >5 against *M. avium-intracellulare*, *M. tuberculosis* and *M. chelonae* in 5 min without tryptose phosphate broth, and 5–10 min with it. However, 20 min exposure was required to produce a \log_{10} reduction factor of 5 in *M. fortuitum*, with no organic load, and in tryptose broth a maximum \log_{10} reduction factor of 4.83 was obtained after 30 min exposure.

[Table IV](#) shows that Cidex had a good mycobacterial activity, giving a \log_{10} reduction factor >5 with or without organic loading in 5–10 min.

Discussion

Our findings suggest that Perasafe was effective within 20 min against all the test strains (*M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum* and *M. chelonae*). Cidex was also effective

Table I Mycobactericidal activity of Perasafe: suspension test

Mycobacteria	Organic load	Contact time ^a (min)	\log_{10} initial count	\log_{10} reduction factor
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	Absent	5	8.16	>5
Clinical strain (Ref. 104)	Present	20	7.88	>5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37 Rv	Absent	10	7.20	>5
ATCC 9360	Present	10	7.02	>5
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Absent	10	8.17	>5
Clinical strain	Present	10	8.17	>5
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Absent	5	7.95	>5
ATCC 35752	Present	5	7.95	>5

^a Shortest contact time to achieve a \log_{10} reduction factor >5 . Organic load: tryptose phosphate broth (7.6 g/L).

Table II Mycobactericidal activity of Cidex: suspension test

Mycobacteria	Organic load	Contact time ^a (min)	Log ₁₀ initial count	Log ₁₀ reduction factor
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	Absent	5	8.24	>5
Clinical strain (Ref. 104)	Present	30	8.13	4.96
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37 Rv	Absent	10	7.00	>5
ATCC 9360	Present	30	6.96	>5
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Absent	5	8.00	>5
Clinical strain	Present	5	7.91	>5
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Absent	5	8.20	>5
ATCC 35752	Present	30	8.00	>5

^a Shortest contact time to achieve a log₁₀ reduction factor >5. Organic load: tryptose phosphate broth (7.6 g/L).

within 30 min. Mycobactericidal activity can be taken as a marker of an intermediate or high-level disinfectant when choosing agents for spillage or heat-sensitive instruments such as endoscopes.¹⁰ Lind *et al.*¹¹ point out that mycobacteria have differing mechanisms of resistance to antimicrobial agents and different susceptibility to disinfectants. Until recently *M. tuberculosis* was the test strain of choice because of its clinical relevance, but recently *M. terrae* has been suggested as a surrogate,^{12,13} which may be used in the European Standard currently in preparation. However, other species are relevant causes of infection. Therefore, we studied *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum* and *M. chelonae* due to the increasing numbers of isolations associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), nosocomial infections, endoscopy and medical devices.⁶

In general our suspension test results agree with those of others, although there few published studies on the mycobactericidal activity of peracetic acid, usually involving differing techniques and test strains. There are no studies using carriers. Lyman *et al.*¹⁴ reported that Nu-Cidex (0.35% peracetic acid and 0.96% hydrogen peroxide) was far more rapidly effective than 2% alkaline glutaraldehyde against various mycobacterial species. Others^{15,16} confirmed these results showing a log₁₀ reduction factor >5 of

strains of *M. tuberculosis* (including drug-resistant strains) and *M. avium-intracellulare* after 4-5 min (under clean and dirty conditions). Cidex PA, which contains a mixture of 0.07% peracetic acid and 1% hydrogen peroxide, gave a log₁₀ reduction factor of 6 against *M. chelonae* strains (including some *M. chelonae var abscessus* strains resistant to glutaraldehyde) after 10 min.¹⁷ While Perasafe (containing 0.25% peracetic acid) showed a log₁₀ reduction factor >5 in our studies, it was not as rapidly bactericidal as Nu-Cidex or Cidex PA.

Several studies have shown that 2% alkaline glutaraldehyde is effective against *M. tuberculosis* and *M. fortuitum*. Griffiths *et al.*¹⁸ found that it destroyed *M. tuberculosis* within 10 min. Nevertheless others^{16,19} reported that 20-30 min contact was required. In our study 5-10 min contact was required to reduce *M. tuberculosis* by a log₁₀ factor of 5 at room temperature, findings similar to those of others. *M. avium-intracellulare* was found to be much more resistant to glutaraldehyde as has been shown in other studies.^{15-17,19,20} Our test strain of *M. fortuitum* was very susceptible, with a reduction greater than 10⁵-fold being achieved in under 5 min both with and without organic loading. Although the strain of *M. chelonae* we used was a glutaraldehyde-susceptible type strain it needed a longer contact time. Conversely Griffiths *et al.*²¹ found that only

Table III Mycobactericidal activity of Perasafe: carrier test

Mycobacteria	Organic load	Contact time ^a (min)	Log ₁₀ initial count (cfu/carrier)	Log ₁₀ reduction factor
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	Absent	5	7.13	>5
Clinical strain (Ref. 104)	Present	10	7.21	>5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37 Rv	Absent	5	6.32	>5
ATCC 9360	Present	10	6.02	>5
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Absent	20	7.10	>5
Clinical strain	Present	30	7.04	4.83
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Absent	5	7.06	>5
ATCC 35752	Present	5	7.00	>5

^a Shortest contact time to achieve a log₁₀ reduction factor >5. Organic load: tryptose phosphate broth (7.6 g/L).

Table IV Mycobactericidal activity of Cidex: carrier test

Mycobacteria	Organic load	Contact time ^a (min)	Log ₁₀ initial count (cfu/carrier)	Log ₁₀ reduction factor
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>	Absent	5	6.96	>5
Clinical strain (Ref. 104)	Present	10	6.92	>5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37 Rv	Absent	5	5.78	>5
ATCC 9360	Present	5	6.74	>5
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Absent	5	7.06	>5
Clinical strain	Present	5	7.01	>5
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Absent	5	7.00	>5
ATCC 35752	Present	10	7.01	>5

^a Shortest contact time to achieve a log₁₀ reduction factor >5. Organic load: tryptose phosphate broth (7.6 g/L).

1 min contact was required either with or without organic loading.

In conclusion Perasafe may be a viable alternative to 2% alkaline glutaraldehyde for killing mycobacteria. Further testing is required to assess its efficacy and practicability. Before using it for high-level disinfection in-use and compatibility studies are required.

Acknowledgements

This study was funded by Tedec-Meiji Farma SA, Spain, and supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ref. FIS 98/0006) and the Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament de Presidència de la Generalitat de Catalunya (Ref. 1999 FI 00768).

References

- British Society of Gastroenterology, Aldehyde disinfectants and health in endoscopy units. *Gut* 1993;**34**:1641–1645.
- Scott EM, Gorman SP. Glutaraldehyde. In: Lawrence CA, Block SS, editors. *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th edn. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1991. p. 596–614.
- Russell AD. Bacterial sensitivity and resistance: disinfection mycobacterial agents. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA, editors. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific; 1992.
- Schattner TJ. More on glutaraldehyde and tuberculocidal activity. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990;**11**:412–413.
- Block SS. Peroxygen compounds. In: Lawrence CA, Block SS, editors. *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th edn. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1991. p. 167–181.
- Lynam PA. *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *Scope* 1995;**7**:10–11.
- Holton J, Shetty N, McDonald V. Efficacy of Nu-Cidex[®] (0.35% peracetic acid) against mycobacteria and cryptosporidia. *J Hosp Infect* 1995;**31**:235–237.
- Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kenndy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:2234–2239.
- Best M, Springthorpe VS, Sattar SA. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of microorganisms. *Am J Infect Control* 1994;**22**:152–162.
- Rutala WA, Weber DJ. Disinfection of endoscopes: review of new chemical sterilants used for high-level disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;**20**:69–76.
- Lind A, Lundholm M, Pedersen G, Sundaeus V, Wahlén P. A carrier method for the assessment of the effectiveness of disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Hosp Infect* 1986;**7**:60–67.
- Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test. *J Hosp Infect* 1998;**38**:183–192.
- Van Klingerden B, Pullen W. Comparative testing of disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium terrae* in quantitative suspension test. *J Hosp Infect* 1987;**10**:292–298.
- Lynam PA, Babb JR, Fraise AP. Comparison of the mycobactericidal activity of 2% alkaline glutaraldehyde and Nu-Cidex[®] (0.35% peracetic acid). *J Hosp Infect* 1995;**30**:237–240.
- Collins FM. Bactericidal activity of alkaline glutaraldehyde solution against a number of atypical mycobacterial species. *J Appl Bacteriol* 1986;**61**:247–251.
- Holton J, Nye P, McDonald V. Efficacy of selected disinfectants against mycobacteria and cryptosporidia. *J Hosp Infect* 1994;**27**:105–115.
- Stanley P. Efficacy of peroxygen compounds against glutaraldehyde-resistant mycobacteria. *Am J Infect Control* 1999;**27**:339–343.
- Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP. Mycobactericidal activity of selected disinfectants using a quantitative suspension test. *J Hosp Infect* 1999;**41**:111–121.
- Broadley SJ, Jenkins PA, Furr JR, Russell AD. Antimycobacterial activity of biocides. *Lett Appl Microbiol* 1991;**13**:118–122.
- Coates D, Hutchinson DN. How to produce a hospital disinfection policy. *J Hosp Infect* 1994;**26**:57–68.
- Griffiths PA, Babb JR, Bradley CR, Fraise AP. Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *J Appl Microbiol* 1987;**82**:519–526.

Artículo 2

A Hernández, E Martró, C Puzo, L Matas, C Burgués, N Vázquez, J Castella and V Ausina. In-use evaluation of Perasafe[®] compared with Cidex[®] in fiberoptic bronchoscope disinfection. *J Hosp Infect* 2003; 54: 46-51.



ELSEVIER



In-use evaluation of Perasafe® compared with Cidex® in fiberoptic bronchoscope disinfection

A. Hernández^a, E. Martró^a, C. Puzo^b, L. Matas^a, C. Burgués^b, N. Vázquez^b, J. Castella^b, V. Ausina^{a,*}

^a*Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Ctra. del Canyet s/n. Badalona, Barcelona 08916, Spain*

^b*Servicio de Pneumología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain*

Received 5 November 2002; accepted 20 January 2003

KEYWORDS

Peracetic acid; Alkaline glutaraldehyde; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium avium-intracellulare*; Fiberoptic bronchoscope; Disinfection

Summary The mycobactericidal activity of Perasafe® (0.26% peracetic acid) was compared with that of Cidex® (2% alkaline glutaraldehyde) by an in-use test. Fiberoptic bronchoscopes were artificially contaminated with *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium-intracellulare* in sputum and, after manual pre-cleaning with a neutral soap, 10 and 20 min disinfection periods were tested. Perasafe® was as effective as Cidex®, thus requiring a 10 min disinfection period against *M. tuberculosis* and 20 min against *M. avium-intracellulare*. The results demonstrate that Perasafe® is an effective disinfectant for use in reprocessing fiberoptic bronchoscopes.

© 2003 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Flexible fiberoptic bronchoscopy has become accepted as a safe tuberculosis diagnostic and therapeutic procedure and it is well tolerated by the patient. However, the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*,¹⁻⁵ atypical mycobacteria,⁶⁻⁸ and other pathogens between patients undergoing bronchoscopy has been reported due to improper cleaning and disinfection procedures. Thus, adequate reprocessing fiberoptic bronchoscopes (FB) is of paramount importance in infection control.

During the last decade, high-level disinfectants based on glutaraldehyde became widely used in FB disinfection because of their biocidal activity against multiple pathogens.^{9,10} However, disinfection of FB with glutaraldehyde has recently been of some concern because of its toxicity, skin and respiratory sensitizing of hospital staff¹¹ and the emergence of resistant mycobacteria. Although the use of endoscope washer-disinfectors decreases exposure to the disinfectant, it has also selected strains of several micro-organisms with a decreased susceptibility to 2% alkaline glutaraldehyde, such as *Mycobacterium chelonae*,^{12,13} leading to misdiagnosis and iatrogenic infections.

Many studies have been performed to assess possible alternatives to glutaraldehyde. Some have compared peracetic acid with 2% alkaline

*Corresponding author. Tel.: +34-3-4978894; fax: +34-3-4978895.

E-mail address: vausina@ns.hugtip.scs.es

glutaraldehyde, demonstrating the efficacy of peracetic acid against mycobacterial species.¹⁴⁻¹⁶ Accordingly it is listed as a high-level disinfectant and chemical sterilant by the United States Food and Drug Administration (FDA). However, the peracetic acid formulation has to be used at 50-56°C, a temperature at which it is toxic, thus requiring automated washer-disinfectors.

Perasafe[®] (0.26% peracetic acid, Antec International Limited, Sudbury, Suffolk, UK) is a new disinfectant, based on peracetic acid, which is used at room temperature. As described by the manufacturer, it is not toxic and damages neither the environment nor the instruments since it is both biodegradable and non-corrosive. This disinfectant has proved to be rapidly mycobactericidal agent in previous in vitro studies performed by our group. Hence, Perasafe[®] could be a useful alternative to glutaraldehyde in the manual disinfection of FB formulations. The aim of this in-use study was to determine the efficacy of Perasafe[®] in comparison with Cidex[®] (2% alkaline glutaraldehyde, Johnson and Johnson Medical Ltd., UK) in the disinfection of FB previously contaminated with mycobacteria in sputum.

Materials and methods

Disinfectants

Disinfectants were freshly prepared according to the manufacturer's instructions and used within 6 h at room temperature. Cidex[®] was activated by using the activator provided with the product, and Perasafe[®] was diluted in tap water. Both disinfectants were tested at their use dilution.

Test micro-organisms

The strains of mycobacteria used were: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 9360) and a clinical strain of *Mycobacterium avium-intracellulare* (Ref. 104).

Preparation of mycobacterial suspensions

Stock cultures were stored at -80°C. Before testing, the suspensions were thawed and spread on to Löwenstein-Jensen (L-J) medium (MAIM S.A., Barcelona, Spain). After 20-30 days at 37°C, the mycobacterial growth was harvested, added to glass beads, moistened with diluent (quarter strength Ringer's solution containing 0.5% Tween 80) and shaken for 4 min. Five to 10 mL of diluent was added, agitated and the suspension left to

settle for 10 min. The supernatant fluid was removed and adjusted by optical density to obtain a concentration of 10⁷-10⁹ cfu/mL. Test suspensions were controlled by performing 10-fold dilutions to 10⁻⁷ in diluent, and then culturing on 7H11 Middlebrook agar plates with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC) supplements (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

Six millilitres of these suspensions were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and the sediments were resuspended in 1 mL diluent. These concentrated suspensions were inoculated into 5 mL mycobacterium culture-negative human homogenized sputa to obtain the initial inocula of 10⁷-10⁹ cfu/mL for all tests.

Contamination of FB

The FB (Model BF-P10, Olympus) was contaminated on 10 different occasions for each disinfectant: five times with sputa contaminated with *M. tuberculosis* and five times with *M. avium-intracellulare*. All internal surfaces of the FB were contaminated by aspirating the inoculum (6 mL), which was then fixed by aspirating air for 2 min.

Cleaning and disinfection

The FB was manually cleaned with a neutral detergent solution (Gel Neutro Inibsa, Laboratorios Inibsa S.A., Barcelona, Spain). The outside of the instrument was wiped and the valves and the channel were cleaned with the cleaning brush and rinsed with abundant tap water.

After the cleaning procedure, the FB was immersed in the disinfectant solution (either Cidex[®] or Perasafe[®]). The disinfectant was injected through the channel by using a syringe, and it was left full. The instrument was removed after either 10 or 20 min, the valves disassembled and the FB rinsed with sterile distilled water. The valves were reassembled and 250 mL sterile distilled water was aspirated to eliminate the disinfectant completely.

Culture procedure and microbiological analysis

To obtain specimens for culture, 10 mL tryptic soy broth (MAIM S.A., Barcelona, Spain) was sucked in through the FB channel and collected into sterile tubes at the distal end.

The FB was sampled for the presence of viable mycobacteria at the following stages: (S1) after contamination, (S2) after cleaning, (S3) after a

Table I In-use FB disinfection study with Perasafe® and *Mycobacterium tuberculosis*

Inoculum in sputa	S1	S2	S3	S4
1.13×10^8	5.00×10^3	3.50×10^2	NG	NG
1.13×10^8	5.00×10^3	1.93×10^2	NG	NG
1.13×10^8	3.50×10^4	18	NG	NG
1.13×10^8	Unc	32.5	NG	NG
1.13×10^8	1.50×10^4	73.5	NG	NG

Results in cfu/mL of five replicate experiments. S1: growth after contamination of the FB, S2: growth after cleaning, S3: growth after a 10 min disinfection, S4: growth after a 20 min disinfection. Unc: uncountable; NG: no growth was detected (<0.5 cfu/mL).

10 min disinfection period, and (S4) after a 20 min disinfection period.

The samples obtained were decontaminated by the Tacquet-Tison procedure,¹⁷ and the sediment was resuspended in 3 mL sterile distilled water. Ten-fold dilutions were prepared in diluent to 10^{-6} for S1 and S2, and 1 mL was spread in duplicate on to 7H11 Middlebrook agar (7H11). Aliquots (0.5 and 1 mL) of the samples S3 and S4 were spread on L-J and 7H11, respectively. Both media were incubated at 37°C for up to six weeks (7H11) or eight weeks (L-J).

Interpretation of the results

The FB disinfection procedure (including the previous cleaning) was considered effective when no growth was detected, or a \log_{10} reduction of ≥ 5 (99.999% kill) was achieved for *M. avium-intracellulare* comparing the number of colony-forming units per millilitre after contamination with the number of colony-forming units per millilitre after cleaning and disinfection.

Results

Test suspension controls showed bacterial concentrations of 8.57×10^7 cfu/mL (\log_{10} cfu/mL = 7.93) for *M. tuberculosis* and 1.44×10^9 cfu/mL

(\log_{10} cfu/mL = 9.16) for *M. avium-intracellulare*, in the initial inocula used to contaminate sputa. However, the FB was effectively contaminated each time with a mean of 1.03×10^5 cfu/mL (\log_{10} cfu/mL = 5.01) *M. tuberculosis* and 2.51×10^6 cfu/mL (\log_{10} cfu/mL = 6.40) *M. avium-intracellulare*. Cleaning was found to reduce the initial viable count to 20-3000 cfu/ml for FB contaminated with *M. avium-intracellulare* and to 18-2900 cfu/mL for *M. tuberculosis*. These values being the \log_{10} of the average inocula in columns S1 of Tables I-IV.

The results of the in-use test to determine the efficacy of Perasafe® in the disinfection of FB are shown in Tables I and II. After the cleaning and the 10 min disinfection procedures, cultures for *M. tuberculosis* were negative on each occasion (<0.5 cfu/mL, the lower limit of sensitivity). However, with the same contact time, a $\geq 10^5$ -fold reduction was not achieved in one of the five trials performed with *M. avium-intracellulare*. Therefore, a 20 min contact period was necessary to achieve a ≥ 5 - \log_{10} reduction in all trials performed with that micro-organism.

Tables III and IV outline the efficacy of Cidex® under the same experimental conditions. *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare* were not recovered from the FB after 10 and 20 min disinfection periods, respectively.

Discussion

In this in-use study we have found that Perasafe® (0.26% peracetic acid) and Cidex® (2% alkaline glutaraldehyde) have a similar mycobactericidal activity when disinfecting FB which had been experimentally contaminated with *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare* in sputum.

Currently, there is no standardized in-use test with FB for testing the disinfection of FB with regard to the inoculum size and the threshold reduction that disinfectants must cause in the initial viable count.^{18,19} The present in-use study

Table II In-use FB disinfection study with Perasafe® and *Mycobacterium avium-intracellulare*

Inoculum in sputa	S1	S2	S3	\log_{10} reduction	S4	\log_{10} reduction
1.67×10^9	3.90×10^6	1.56×10^4	2.42×10^2	4.21	39	5
1.67×10^9	5.80×10^6	1.85×10^3	3	>5	21	>5
1.67×10^9	3.60×10^6	2.13×10^2	3	>5	0.5	>5
1.67×10^9	3.30×10^6	1.61×10^4	NG	>5	3.5	>5
1.67×10^9	1.28×10^6	1.39×10^3	3.5	>5	2.5	>5

Results in cfu/mL of five replicate experiments. S1: growth after contamination of the FB, S2: growth after cleaning, S3: growth after a 10 min disinfection, S4: growth after a 20 min disinfection. NG: no growth was detected (< 0.5 cfu/mL).

Table III In-use FB disinfection study with Cidex[®] and *Mycobacterium tuberculosis*

Inoculum in sputa	S1	S2	S3	S4
5.83×10^7	5.00×10^3	4.00×10^2	NG	NG
5.83×10^7	8.00×10^4	4.04×10^2	NG	NG
5.83×10^7	2.30×10^5	70	NG	NG
5.83×10^7	2.05×10^5	3.30×10^2	NG	NG
5.83×10^7	3.43×10^5	45.67	NG	NG

Results in cfu/mL of five replicate experiments. S1: growth after contamination of the FB, S2: growth after cleaning, S3: growth after a 10 min disinfection, S4: growth after a 20 min disinfection. NG: no growth detected (<0.5 cfu/mL).

is similar in methodology to that of Rodríguez-Froján *et al.*,²⁰ artificially contaminating a FB with sputa inoculated with mycobacteria, thus reproducing bronchoscopy suite conditions in the laboratory. The use of a larger mycobacterial inoculum than would be expected in a patient sample, together with the presence of sputum was a considerable test of the disinfectant's efficacy.

An adequate physical pre-cleaning of the FB before disinfection is of great importance, as most disinfectants have a lower efficacy when in contact with organic matter. Thorough cleaning ensures that micro-organisms are largely removed^{21,22} together with the organic matter. This fact is supported by the mean log₁₀ reduction factor achieved by cleaning the FB in our study, which was 3.27 ± 0.67 for FB contaminated with sputa containing *M. avium-intracellulare*, and 2.42 ± 1.04 for FB contaminated with *M. tuberculosis*. Outbreaks associated with the reprocessing of endoscopes have been reported, as up to 40% of the institutions do not follow the published guidelines for endoscope cleaning and disinfection.^{23,24} Human error in manual reprocessing, among other reasons, has fostered the use of automated washer-disinfectors for endoscopes. However, none of the current machines fulfil the demands of infection control. Problems related to contamination of endoscope washers do not apply to disinfectors that use peracetic acid, such as Steris System 1, but

it requires a thorough manual cleaning.²⁵ Moreover, an acceptable safety level can be achieved with manual disinfection if the guidelines are strictly followed.¹⁰

In our opinion, the efficacy of Perasafe[®] and Cidex[®] is demonstrated by the absence of *M. tuberculosis* growth after a 10 min contact time, with an mean initial viable count 1.03×10^5 cfu/mL (log₁₀ cfu = 5.01). Both disinfectants achieved a log₁₀ reduction factor ≥ 5 in the initial viable counts in the FB contaminated with a mean of 2.51×10^6 cfu/mL (log₁₀ cfu = 6.40) of *M. avium-intracellulare*, in 20 min. In this case, both Cidex[®] and Perasafe[®] required a longer contact time as *M. avium-intracellulare* is more resistant to disinfectants than *M. tuberculosis*.²⁶ and the initial viable count in the FB contaminated with *M. avium-intracellulare* was higher. Even though both disinfectants achieved a log₁₀ reduction factor ≥ 5 , Cidex[®] rendered sterile cultures while there was scanty survival after disinfection with Perasafe[®]. This difference between Perasafe[®] and Cidex[®] to achieve sterile cultures from FB contaminated with *M. avium-intracellulare* could be due to a higher initial contamination in the trials performed with Perasafe[®], which reflects the difficulty in standardizing the inoculum and the varying viscosity of sputa.

The results obtained by our group with Cidex[®] and *M. tuberculosis* agree with those of Hanson *et al.*,²⁷ who obtained negative cultures after a 10 min disinfection. Since they used a lower initial contamination inocula (8×10^3 cfu/mL) than ours when considering the log₁₀ of our average inoculum, pre-cleaning alone reduced the viable count to smaller number of colony-forming units per millilitre providing an easier challenge to the disinfectant. However, in a study with an auto-disinfector, Nicholson *et al.*,²⁸ recovered *M. tuberculosis* in five out of 10 FB, and *M. avium-intracellulare* cultures were also positive in 10 out of 10 FB after a 60 min disinfection period obtaining a low reduction (log₁₀ reduction factor of 2.38). This lower efficacy of Cidex[®] found by Nicholson *et al.*,

Table IV In-use FB disinfection study with Cidex[®] and *Mycobacterium avium-intracellulare*

Inoculum in sputa	S1	S2	S3	Log ₁₀ reduction	S4	Log ₁₀ reduction
1.20×10^9	1.31×10^6	1.15×10^3	0.5	>5	NG	>5
1.20×10^9	4.12×10^5	1.54×10^2	34.5	4.08	NG	>5
1.20×10^9	5.07×10^5	2.50×10^2	NG	>5	NG	>5
1.20×10^9	1.02×10^6	7.00×10^2	1.5	>5	NG	>5
1.20×10^9	4.00×10^6	1.65×10^2	1	>5	NG	>5

Results in cfu/mL of five replicate experiments. S1: growth after contamination of the FB, S2: growth after cleaning, S3: growth after a 10 min disinfection, S4: growth after a 20 min disinfection. NG: no growth was detected (<0.5 cfu/mL).

could be due to the lack of manual pre-cleaning of the FB, and the fact that in all 10 trials the machine used the same disinfectant solution. Besides, they obtained a higher contamination of the FB (8.20 log₁₀) and used a more sensitive liquid recovery medium such as Bactec 460.

Conversely, the efficacy of 0.26% peracetic acid against *M. tuberculosis* found in our study agrees with a previous study performed with an automated bronchoscope washing machine. Middleton *et al.*,²⁹ reported that 0.35% peracetic acid (Nu-Cidex[®]) was effective in 5 min without previous manual cleaning, obtaining negative cultures in 10 out of 10 FB contaminated with a clinical *M. tuberculosis* strain in sputa. As regards *M. avium-intracellulare*, our results contrast with those of Middleton *et al.*,²⁹ who found that 5 min was enough to obtain negative *M. avium-M. intracellulare* cultures. The use of an enzymatic detergent in the pre-cleaning could have contributed to obtain a better efficacy of this disinfectant. Seballos *et al.*³⁰ also obtained negative cultures when using the Steris System with 0.2% peracetic acid. However, they contaminated the FB by using normal saline containing *M. avium* complex organisms—which is not comparable to sputum used in our study—and only performed two trials.

We conclude that Perasafe[®], properly used together with adequate pre-cleaning, is an effective mycobactericidal agent and a possible alternative to glutaraldehyde in manual disinfection of FB. Although further studies are necessary to evaluate the use of this new disinfectant in the longer term, the rapid mycobactericidal activity and the lack of environmentally harmful or toxic residues, make Perasafe[®] very attractive for FB disinfection.

Acknowledgements

This study was funded by Tedec-Meiji Farma S.A., Spain, and supported by the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (Ref. FIS 98/0006) and the 'Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament de Presidència de la Generalitat de Catalunya' (Ref. 1999FI 00768).

References

- Leers W. Disinfecting endoscopes: how not to transmit *Mycobacterium tuberculosis* by bronchoscopy. *Can Med Assoc J* 1980;123:275–280.
- Nelson KE, Larson PA, Schraufnagel DE, Jackson J. Transmission of tuberculosis by flexible fiberbronchoscopes. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:97–100.
- Wheeler PW, Lancaster D, Kaiser AB. Bronchopulmonary cross-colonisation and infection related to mycobacterial contamination of suction valves of bronchoscopes. *J Infect Dis* 1989;159:954–958.
- Agerton T, Valway S, Gore C, *et al.* Transmission of a highly drug-resistant (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*. Community outbreak and nosocomial transmission via a contaminated bronchoscope. *JAMA* 1997;278:1073–1077.
- Michele TM, Cronin WA, Graham NM, *et al.* Transmission of *M. tuberculosis* by a fiberoptic bronchoscope. Identification by DNA fingerprinting. *JAMA* 1997;278:1093–1095.
- Dawson DJ, Armstrong JG, Blacklock ZM. Mycobacterial cross-contamination of bronchoscopy specimens. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:1095–1097.
- Steere AC, Corrales J, Von Graevenitz A. A cluster of *Mycobacterium gordonae* isolates from bronchoscopy specimens. *Am Rev Respir Dis* 1979;120:214–216.
- Jackson J, Leggett JE, Wilson D, Gilbert DN. *Mycobacterium gordonae* in fiberoptic bronchoscopes. *Am J Infect Control* 1996;24:19–23.
- Rutala WA. Disinfection practices for endoscopes and other semicritical items. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12:282–288.
- Martin MA, Reichelderfer M. APIC guidelines for prevention and control in flexible endoscopy Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology; Inc. 1991, 1992 and 1993 APIC Guidelines Committee. *Am J Infect Control* 1993;22:19–23.
- Jachuck SJ, Bound CL, Steel J, Blain PG. Occupational hazard in hospital staff exposed to 2% glutaraldehyde in an endoscopy unit. *J Soc Occup Med* 1989;38:69–71.
- Van Klinger B, Pullen P. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. *J Hosp Infect* 1993;25:147–149.
- Lynam PA. *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer-disinfectors. *Scope* 1995;7:10–11.
- Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP. Mycobactericidal activity of selected disinfectants using a quantitative suspension test. *J Hosp Infect* 1999;41:111–121.
- Holton J, Shetty N, McDonald V. Efficacy of 'Nu-cidex[®]' (0.35% peracetic acid) against mycobacteria and cryptosporidia. *J Hosp Infect* 1995;31:235–237.
- Lynam PA, Babb JR, Fraise AP. Comparison of the mycobactericidal activity of 2% alkaline glutaraldehyde and 'Nu-cidex[®]' (0.35% peracetic acid). *J Hosp Infect* 1995;30:237–240.
- Tison F, Carbonnelle B. Culture des mycobactéries. In: Tison F, Carbonnelle B, editors. *Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante*. Paris, France: Crouan & Roques; 1972. p. 89–130.
- Ayliffe GAJ. Standardization of disinfectant testing. *J Hosp Infect* 1989;13:211–216.
- Cutler RR, Wilson P. Disinfectant testing of contaminated endoscopes—a need for standardization. *J Hosp Infect* 1993;25:145–147.
- Rodríguez-Froján G, Castella J, Ausina V, Puzo C. Estudio experimental de la desinfección del broncofibroscopio. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12:433–438.
- Hanson PJ, Jeffries DJ, Collins JV. Viral transmission and fiberoptic endoscopy. *J Hosp Infect* 1991;18(Suppl. A):136–140.
- Ayliffe GAJ, Babb JR, Bradley CR. The immersible endoscope. *Lancet* 1984;i:161.
- Favero MS. Strategies for disinfection and sterilization of endoscopes: the gap between basic principles and actual practice. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12:279–281.

24. Rutala WA. Disinfection practices for endoscopes and other semicritical items. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;**12**: 282–288.
25. Bradley CR, Babb JR, Ayliffe GA. Evaluation of the Steris System 1 peracetic acid endoscope processor. *J Hosp Infect* 1995;**29**:143–151.
26. Bradley SJ, Jenkins PA, Furr JR, Russell AD. Antimycobacterial activity of biocides. *Lett Appl Microbiol* 1991;**13**: 118–122.
27. Hanson PJV, Chadwick MV, Gaya H, Collins JV. A study of glutaraldehyde disinfection of fiberoptic bronchoscopes experimentally contaminated with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Hosp Infect* 1992;**22**:137–142.
28. Nicholson G, Hudson RA, Chadwick MV, Gaya H. The efficacy of the disinfection of bronchoscopes contaminated in vitro with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* in sputum: a comparison of Sactimed-I-Signald and glutaraldehyde. *J Hosp Infect* 1995;**29**:257–264.
29. Middleton AM, Chadwick MV, Gaya H. Disinfection of bronchoscopes, contaminated in vitro with *M. tuberculosis*, *M. avium*–*M. intracellulare* and *M. chelonae* in sputum using stabilized, buffered peracetic acid solution (Nu-Cidex[®]). *J Hosp Infect* 1997;**37**:137–143.
30. Seballos RJ, Walsh AL, Metha AC. Clinical evaluation of liquid chemical sterilization system for the flexible bronchoscope. *J Bronchol* 1995;**2**:192–199.

Artículo 3

A Hernández, E Martró, L Matas, A Jiménez and V Ausina. Mycobactericidal and tuberculocidal activity of Korsolex[®] AF, an amine detergent/ disinfectant product. *J Hosp Infect* 2005; 59: 62-66.



SHORT REPORT

Mycobactericidal and tuberculocidal activity of Korsolex[®] AF, an amine detergent/disinfectant product

A. Hernández, E. Martró, L. Matas, A. Jiménez, V. Ausina*

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Ctra. del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain

Received 2 April 2004; accepted 27 May 2004
Available online 27 October 2004

KEYWORDS

Amine derivatives;
Disinfectant test;
Mycobacteria

Summary The mycobactericidal and tuberculocidal activities of Korsolex[®] AF against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* (MAI), *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium chelonae* were determined using quantitative suspension and carrier tests. The effects of organic load and hard water were also considered. A clinical isolate of MAI was the most resistant of the four test organisms. A 2% solution had good mycobactericidal and tuberculocidal activities after 30 min of exposure. Although further evaluation using European standard tests is necessary, we conclude that Korsolex[®] AF appears to be a promising product for the disinfection of hospital instruments contaminated with mycobacteria. © 2004 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The resurgence of tuberculosis in both developing and industrialized countries was reported in the early 1990s,^{1,2} and is linked to inefficient vaccination programmes, poor healthcare services, lack of effective antitubercular drugs and human

immunodeficiency virus infection.³ However, *Mycobacterium tuberculosis* is not the most common mycobacterium involved in hospital-acquired infection. Species widely distributed in the environment, such as *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* (MAI), *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*, can infect debilitated or immunocompromised patients. Medical-device-associated mycobacterial infections, due to inadequate cleaning or disinfection in high-level disinfection methods, have been reported.⁴⁻⁸ Mycobacteria are generally more resistant to chemical

* Corresponding author. Tel.: +34 3 4978894; fax: +34 3 4978895.

E-mail address: vausina@ns.hugtip.scs.es

disinfection than other vegetative bacteria and viruses, but more sensitive than bacterial spores.⁹ As its composition includes mycolic acids and other complex lipids, the mycobacterial cell wall acts as a barrier to limit the uptake of biocides into the cell. Non-tuberculous mycobacteria frequently show significant resistance to disinfectants.^{9,10}

Appropriate disinfection procedures for medical devices after use and selection of an adequate chemical disinfectant are of major importance in order to prevent cross-infection from patient to patient, from patient to environment and from environment to patient. Glutaraldehyde, hydrogen peroxide and peracetic acid are the most widely used high-level disinfectants. However, the activity of these products is affected by organic material, which may contribute to disinfection failures. Therefore, cleaning remains the most important initial stage of the disinfection process, as it reduces the bioburden and removes the load of proteins and other materials. Manual cleaning or pre-disinfection of objects contaminated with infectious material is required immediately after use and before automated or manual processing.¹¹ While cleaning might represent a hazard to staff, it renders the equipment and instruments safe for subsequent handling and in a suitable condition for efficient sterilization or high-level disinfection.

Aldehydes, phenols, quaternary ammonium compounds and polyalkylamines are commonly used as detergents/disinfectants in the pre-disinfection procedure. However, aldehydes and phenols may be toxic, fix proteins and are inactivated by organic matter. These limitations have stimulated research on new disinfectant formulations. The antimicrobial activity of amine derivatives has been studied for some time, although only limited information is available in the literature on the specific efficacy of these compounds against mycobacteria.^{12,13}

Recently, Korsolex® AF, an aldehyde-free instrument disinfectant based on two long-chain aliphatic fatty amines (15.6% dodecyl-bis-propylene triamine and 5.1% lauryl propylene diamine) obtained from coconut oil, has been commercialized. It is an alkaline product that can be used as a pre-disinfectant for the manual processing of both thermosensitive and thermostable instruments (immersion and ultrasonic bath procedures). The aim of this study was to evaluate its biocidal activity against several *Mycobacterium* species, using in-vitro suspension and carrier tests. The effects of organic load and standard hard water were also taken into account.

Materials and methods

Disinfectant

Korsolex® AF (Bode Chemie GmbH & Co., Hamburg, Germany) was freshly prepared according to the manufacturer's instructions and used within 2 h. Sterile distilled water and standard hard water (200 ppm calcium carbonate) were used as diluent in the suspension and carrier tests, respectively. For the suspension test, the product was prepared 1.11-fold more concentrated to render the in-use dilution after addition of the inoculum. The concentrations and contact times tested were 1% for 60 min, 2% for 30 min and 3% for 15 min.

Test organisms

The following mycobacterial strains were used: *M. tuberculosis* H37 Rv ATCC 25618, *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, *M. chelonae* ATCC 35752, and a MAI clinical strain.

Quantitative suspension and carrier tests

The methods for preparing mycobacterial inoculum and performing the suspension and carrier tests have been described in detail previously.¹⁴ Briefly, growth was harvested from 7H11 Middlebrook agar plates (MAIN SA, Barcelona, Spain) supplemented with oleic acid albumin dextrose catalase (OADC) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Ten millilitres of diluent (quarter strength Ringer's solution containing 0.5% Tween 80) were added, vortexed with glass beads, and the suspension was left to settle for 10 min. The supernatant fluid was adjusted to give a concentration of 10^7 - 10^8 cfu/mL for each mycobacterial strain.

Engley & Dey neutralizing broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was chosen as the neutralizer on the basis of results obtained in neutralization tests. Its efficacy and non-toxicity were assessed for each mycobacterial strain.

In the suspension test, 1 mL of inoculum was added to 9 mL of disinfectant solution. Immediately after contact times of 15, 30 and 60 min, 0.1 mL of the reaction mixture was removed and diluted 100-fold in 9.9 mL of neutralizer. After 10 min of neutralization, 10-fold dilutions were prepared in diluent up to 10^{-4} . Samples of 1 and 0.5 mL from the neat sample and subsequent dilutions were inoculated on 7H11 agar plates and Löwenstein-Jensen medium (L-J) in duplicate, respectively. Surviving colonies were enumerated and reported as cfu/mL in the reaction mixture.

Sterile borosilicate disks were used as carriers, on which 10- μ L aliquots of inoculum were allowed to dry for 60 min at room temperature in a class II biological safety cabinet. The contaminated area was then covered with 60 μ L of disinfectant prepared at test dilutions (1%, 2% and 3%) in standard hard water. After contact times of 15, 30 and 60 min, carriers were placed into tubes containing 2.94 mL of neutralizer. These tubes were vortexed for 1 min to elute bacteria from the carrier surface. After 10 min of neutralization, the eluates were serially diluted up to 10^{-4} in diluent, and samples were spread on 7H11 and L-J media in duplicate. Survivors were enumerated as the mean number of cfu/carrier.

For both suspension and carrier tests, sterile distilled water was used instead of disinfectant for control trials. Disinfectant activity in tests was also tested in the presence of an organic load by preparing mycobacterial suspensions in 7.6 g/L tryptose phosphate broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Interpretation of results

The viable count obtained in the controls was considered to be the initial mycobacterial load for calculation of disinfectant efficacy (D). In the suspension test, D was determined by comparing growths from control and test samples, and reported as the \log_{10} reduction factor of the number of cfu/mL in the reaction mixture for each contact time and disinfectant concentration. In the carrier test, D was calculated as the \log_{10} reduction factor of the number of cfu/carrier by subtracting the mean \log_{10} post-disinfection count from the mean \log_{10} pre-disinfection count of the control trials.

Each disinfectant concentration was considered to show acceptable mycobactericidal activity if a $\geq 10^5$ -fold reduction was achieved within a particular contact time. The lower sensitivity limits were 50 cfu/mL in the suspension test and 1.5 cfu/carrier in the carrier test.

Results

Bacterial concentrations in the initial inocula were 7.45×10^7 - 9.60×10^8 cfu/mL for the suspension test and 1.26×10^8 cfu/mL- 6.80×10^8 cfu/mL for the carrier test. Both the dilution-neutralization method and the neutralizer were found to be effective, leading to no residual disinfectant activity and no inhibition of mycobacterial growth.

Controls of test suspensions, dilution-neutralization methods and the recovery of bacteria from carriers were also satisfactory (data not shown).

Quantitative suspension test

The activity of Korsolex[®] AF against tested mycobacteria in the suspension test is presented in Table I. All tested disinfectant concentrations showed a good efficacy against *M. tuberculosis*, MAI, *M. kansasii* and *M. chelonae* both in the absence and presence of organic matter for all contact times tested.

Quantitative carrier test

The mycobactericidal activity of the product in the carrier test is shown in Table II. A 1% solution showed an efficient mycobactericidal activity against all mycobacteria tested both with and without organic material with an exposure time of 60 min. The 2% solution achieved a $>10^5$ -fold reduction in all tests except for MAI, in which a maximum \log_{10} reduction of 4.60 was achieved in 30 min in the presence of organic material. The 3% solution showed a $>10^5$ -fold reduction against *M. tuberculosis*, *M. kansasii* and *M. chelonae* in the absence of organic material following 15 min of exposure. However, this concentration was not effective against *M. tuberculosis*, MAI and *M. kansasii* in the presence of organic material.

Discussion

Amine-based disinfectants have become fairly popular for the pre-disinfection of surgical instruments and medical devices, and they are a convincing alternative to aldehyde-containing products. However, the mycobactericidal activity of these compounds has not been widely investigated. The present study demonstrates that Korsolex[®] AF has excellent mycobactericidal and tuberculocidal activity, even at low concentrations. The 3% solution achieved a 10^5 -fold and a 10^4 -fold reduction factor against *M. tuberculosis*, MAI, *M. kansasii* and *M. chelonae* in 15 min in the suspension and carrier tests, respectively. Similar results were obtained with 1 and 2% solutions with 60 and 30 min of exposure time, respectively. Furthermore, the presence of organic material, the use of standard hard water as disinfectant diluent, and the fact that mycobacteria were adhered and dried on to a surface did not decrease the activity of the product.

Table I Mycobactericidal activity in the suspension test with and without organic material

Mycobacteria	Organic material	Log initial count ^a	Disinfectant concentration and contact time					
			3%, 15 min		2%, 30 min		1%, 60 min	
			S	D	S	D	S	D
<i>M. tuberculosis</i>	-	7.29	NC	>5	NC	>5	NC	>5
	TBP	6.86	NC	>5	NC	>5	NC	>5
<i>M. avium-M. intracellulare</i>	-	7.69	NC	>5	NC	>5	NC	>5
	TBP	7.65	NC	>5	NC	>5	NC	>5
<i>M. kansasii</i>	-	7.28	2.30	4.98	NC	>5	NC	>5
	TBP	6.87	NC	>5	NC	>5	NC	>5
<i>M. chelonae</i>	-	7.58	NC	>5	NC	>5	NC	>5
	TBP	7.82	NC	>5	NC	>5	NC	>5

S, number of survivors after disinfection (\log_{10}); D, \log_{10} reduction achieved by the disinfectant; NC, negative culture (< 50 cfu/mL, the lower detection limit); TBP, tryptose phosphate broth, 7.6 g/L.

^a \log_{10} (cfu/mL) from control trial.

The use of a practical and reproducible suspension test method is essential for selecting suitable mycobactericidal products for the disinfection of medical devices. Such disinfectants must be effective against a range of pathogens and opportunistic mycobacteria. The present methodology was based on our previous experience,¹⁴ since no European standard test for the assessment of basic (phase 1) or specific (phase 2) mycobactericidal activity was available when the study started. Recently, drafts of standard European mycobactericidal tests (phase 2) for medical-device disinfectants have become available for both quantitative suspension and carrier tests (PrEN 14348 and PrEN 14563).^{15,16} These standards use non-tuberculous strains as reference micro-organisms, such as *Mycobacterium terrae* (a surrogate for *M. tuberculosis*) and *M.*

avium. However, we evaluated mycobactericidal activity using *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. chelonae* and MAI, which are the most representative mycobacteria associated with nosocomial infections. The criterion requirement for passing European assays is a \log_{10} reduction factor of 5 for the quantitative suspension test and 4 for the carrier test. Our criterion was similar for the suspension test, but was more rigorous for the carrier test.

The four test micro-organisms were more susceptible in the suspension test than in the carrier test. In the latter, mycobacteria were dried on to a surface and were less accessible to disinfectant than mycobacteria in a homogeneous suspension. Similarly, mycobacterial susceptibility to disinfectants may be reduced in the presence of body fluids, such as blood and mucus. For this reason, a biocide

Table II Mycobactericidal activity in the carrier test with and without organic material

Mycobacteria	Organic material	Log initial count ^a	Disinfectant concentration and contact time					
			3%, 15 min		2%, 30 min		1%, 60 min	
			S	D	S	D	S	D
<i>M. tuberculosis</i>	-	5.92	NC	>5	NC	>5	NC	>5
	TBP	5.78	1.50	4.29	NC	>5	NC	>5
<i>M. avium-M. intracellulare</i>	-	6.55	1.99	4.56	0.48	>5	NC	>5
	TBP	6.50	2.41	4.09	1.90	4.60	NC	>5
<i>M. kansasii</i>	-	6.24	NC	>5	NC	>5	NC	>5
	TBP	6.03	1.26	4.78	NC	>5	NC	>5
<i>M. chelonae</i>	-	6.60	NC	>5	NC	>5	NC	>5
	TBP	6.56	NC	>5	NC	>5	NC	>5

S, number of survivors/carriers after disinfection (\log_{10}); D, \log_{10} reduction achieved by the disinfectant; NC, negative culture (< 1.5 cfu/carrier, the lower detection limit); TBP, tryptose phosphate broth, 7.6 g/L.

^a \log_{10} (cfu/carrier) from control trial.

should be tested in the presence of interfering substances. In this study, tryptose phosphate broth was added to the initial inoculum, thus simulating clinical conditions. This substance did not reduce the activity of the disinfectant against the four mycobacteria tested in the suspension test, but increased the exposure times required in the carrier test.

The results obtained in mycobactericidal assays usually depend significantly on the test organism, as variations in response to disinfectants are found amongst mycobacteria species. MAI is more resistant than other mycobacteria, although the mechanisms involved remain to be elucidated.⁹ This is supported by our results. *M. chelonae*, *M. kansasii* and *M. tuberculosis* were more susceptible than MAI, which was the most resistant species, in agreement with results obtained by Kneiflora *et al.*¹³ for *M. tuberculosis* and MAI. They recommended 5% Lautericide[®], a product that contains acetate amine of coconut acid, with a 10-min exposure time for *M. tuberculosis* and a 10% solution with a 60-min exposure time for MAI.

In conclusion, Korsolex[®] AF had acceptable efficacy against several species of mycobacteria in quantitative suspension and carrier tests at a concentration of 2% with an exposure time of 30 min. Therefore, its use may help to reduce the incidence of hospital-acquired mycobacterial infections. In addition, as a pre-disinfectant product, it may help to lower the risk of infection and exposure to toxic agents of healthcare workers. Amine-based disinfectants could be useful for intermediate- and high-level disinfection of medical devices if mycobacteria are likely to be present. However, further evaluation using standard European mycobactericidal tests (phase 2) and clinical trials (phase 3) is required to confirm their efficacy.

Acknowledgements

This study was funded by Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany.

References

1. Parry C, Davies PDO. The resurgence of tuberculosis. *J Appl Bacteriol* 1996;**81**:235–265.
2. March F, Garriga X, Rodríguez P, *et al.* Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from compliant patients with human immunodeficiency virus-associated tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997;**25**:1044–1047.
3. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a re-emergent killer. *Science* 1992;**257**:1055–1064.
4. Wheeler PW, Lancaster D, Kaiser AB. Bronchopulmonary cross-contamination and infection related to mycobacterial contamination of suction valves of bronchoscopes. *J Infect Dis* 1989;**159**:954–958.
5. Michele TM, Cronin WA, Graham NM, *et al.* Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by a fiberoptic bronchoscope: identification by DNA fingerprinting. *JAMA* 1997;**278**:1093–1095.
6. Wenzel RP, Edmond MB. Tuberculosis infection after bronchoscopy. *JAMA* 1997;**278**:1093–1111.
7. Argenon T, Valway S, Gore B, *et al.* Transmission of a highly drug-resistant strain (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *JAMA* 1997;**278**:1073–1077.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Bronchoscopy-related infections and pseudoinfections—New York, 1996 and 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;**48**:557–560.
9. Russell AD. Activity of biocides against mycobacteria. *J Appl Bacteriol* 1996;(Symp. Suppl.):875–1015.
10. Widmer AF, Frei R. Decontamination, disinfection and sterilization. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover F, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 138–164.
11. Bradley CR, Babb JR. Endoscope decontamination: automated vs manual. *J Hosp Infect* 1995;**30**(Suppl.):537–542.
12. Hoyt A, Djang AHK, Smith RC. Tuberculosis disinfection with diamine. *Public Health Rep* 1956;**71**:1097–1103.
13. Kneiflova J, Slosarek M, Melicherikova V, Parikova J. Microbiocidal effect of Lautericid, a new disinfectant. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Immunol* 1992;**41**:355–361.
14. Hernández A, Martró E, Matas L, Ausina V. In-vitro evaluation of Perasafe compared with 2% alkaline glutaraldehyde against *Mycobacterium* spp. *J Hosp Infect* 2003;**54**:52–56.
15. CEN. The European Standard Chemical Disinfectants and Antiseptics. *PrEN 14348: Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants (phase 2/step 1)*. Bruxelles: European Committee for Standardization; 2001.
16. CEN. The European Standard Chemical Disinfectants and Antiseptics. *PrEN 14563: Quantitative carrier test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in medical area (phase 2/step 2)*. Brussels: European Committee for Standardization; 2002.

Artículo 4

E Martró, **A Hernández**, J Ariza, MA Domínguez, L Matas, MJ Argerich, R Martín and V Ausina. Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. J Hosp Infect 2003; 55: 39-46.



ELSEVIER



Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants

E. Martró^a, A. Hernández^a, J. Ariza^b, M.A. Domínguez^c, L. Matas^a,
M.J. Argerich^b, R. Martín^c, V. Ausina^{a,*}

^aDepartment of Microbiology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain

^bDepartment of Infectious Diseases, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain

^cDepartment of Microbiology, Hospital de Bellvitge, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain

Received 25 November 2002; accepted 20 May 2003

KEYWORDS

Acinetobacter baumannii; Outbreak; Multiple antibiotic resistance; Biocides; Antiseptics; Disinfectants

Summary Disinfection and antiseptics are of primary importance in controlling outbreaks of *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen that frequently shows multiple antibiotic resistance. In this study we assessed the susceptibility of nine *A. baumannii* strains isolated during a sustained intensive care unit outbreak, to several antiseptics and disinfectants based on European Standards. While the tested strains showed diverse antibiotic resistance patterns, they were equally sensitive to the biocides assessed in vitro. We observed neither evidence of development of resistance to biocides over time, nor a correlation between resistance to antibiotics and a decreased susceptibility to antiseptics or disinfectants.

© 2003 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Non-fermentative Gram-negative bacilli have emerged as major nosocomial pathogens and have become epidemic in many hospitals despite the implementation of specific control strategies. *Acinetobacter baumannii* has been involved in an increasing number of outbreaks around the world, especially in intensive care units (ICUs), where it

can persist for long periods.^{1,2} Epidemiological studies suggest the hospital environment and colonized patients as the major reservoirs of these infections.

Acinetobacter species are widely distributed both in nature and in the hospital environment and may be present in the skin flora of healthy humans. *A. baumannii* is the species of greatest clinical interest. Although considered of low virulence, this micro-organism causes a wide spectrum of nosocomial infections in debilitated individuals, in wounds, urinary and respiratory tracts, bacteraemia, and particularly ventilator-associated pneumonia in ICU patients.³ The ability of this micro-organism rapidly to develop antimicrobial

*Corresponding author. Address: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Ctra. del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34-3-49-788-94; fax: +34-3-49-788-95.

E-mail address: vausina@ns.hugtip.scs.es

multiresistance⁴ and to colonize various body sites of hospitalized patients, its capacity for long-term survival (up to several months) on most environmental and dry surfaces, and its ease of spread between patients^{3,5} have led to an important role in hospital-acquired infection.

At Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB), a 1000-bed hospital in Barcelona, Spain, a large and sustained nosocomial outbreak caused by multi-drug resistant strains of *A. baumannii* was observed over a recent 10 year period.^{6,7} Control measures repeatedly carried out during this period included the revision and reinforcement of cleaning procedures, a surveillance programme of environmental contamination, the early detection of colonized patients, and the implementation of all control barrier measures, including handwashing and isolation precautions. Chlorhexidine gluconate was routinely used for handwashing of healthcare workers and skin hygiene of patients in ICU wards because concomitant endemic infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were frequent during this period. In addition, ICUs were closed on several occasions to assure complete decontamination. Although control measures were repeatedly revised and reinforced throughout the period, only transient decreases in the rates of *A. baumannii* infection or colonization followed each reinforcement.

Initially, most of our *A. baumannii* isolates were susceptible only to imipenem, sulbactam and colistin, but after 1997 carbapenem resistance emerged and rapidly spread throughout the ICUs. Although the emergence of antimicrobial resistance in this micro-organism has often been reported in literature, only limited studies are available regarding possible resistance to antiseptics and disinfectants (biocides). Russell et al.⁸ suggested that concomitant antibiotic and antiseptic resistance in Gram-negative bacteria may occur. The aims of the present study were to evaluate whether the clinical and environmental strains involved in the outbreak exhibited altered susceptibility to disinfectants and antiseptics, and to assess the possible relationship between antibiotic and biocide resistance.

Methods

Test organisms

The bactericidal activity of several antiseptics and disinfectants was assessed on nine *A. baumannii* strains obtained from clinical and environmental

specimens in an ICU during an outbreak. These strains were representative of the endemic clones in CSUB, where 1900 patients had been involved since 1992, 60-70% of them during an ICU stay. *A. baumannii* caused 31% of respiratory, 17% of surgical wound, 12% of vascular catheter-related and 10% of urinary tract infections.

A. baumannii isolates were identified by standard biochemical reactions⁹ and ability to grow at 37, 41 and 44°C. Confirmation of the identification was by restriction analysis of the 16-23 S ribosomal genes and the intergenic spacer sequence¹⁰ from representative isolates.

The antibiotic susceptibility of *A. baumannii* was determined by the microdilution method (MicroScan, NegCombo Type 6I plates; Dade International Inc., West Sacramento, CA, USA). For epidemiological purposes, highly discriminatory antibiotics were evaluated in the present study: gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, imipenem, sulbactam and ceftazidime. Imipenem resistance was confirmed by E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Results were interpreted according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) criteria.¹¹ The breakpoints for sulbactam were those of NCCLS for ampicillim-sulbactam.¹⁰ All nine strains were colistin-susceptible following breakpoints defined by the French Society for Microbiology;¹² thus, isolates were considered susceptible to colistin if the minimum inhibitory concentration (MIC) was ≤ 2 mg/L. More detailed antibiotic susceptibility information on these strains has been published elsewhere.⁷

Antiseptics and disinfectants

The following antiseptic hygienic and surgical handrubs were tested: Sterillium[®] (mecetronium ethylsulphate, *n*-propanol and iso-propanol, Bode Chemie, Hamburg, Germany), 'Gel Antiséptico de Manos' (ethanol and didecylidimethylammonium chloride, Laboratorios Inibsa SA, Llicà de Vall, Barcelona, Spain), and 'Solución Antiséptica de Manos' (propanol, isopropanol and *o*-phenyl-phenol, Laboratorios Inibsa SA, Llicà de Vall, Barcelona, Spain). An antiseptic for hygienic and surgical handwash, Hibiscrub[®] (4% chlorhexidine digluconate, Zeneca SA, Spain) and a product for general skin antisepsis, Clorina[®] (sodium tosylchloramide, Squibb Industria Farmacéutica SA, Spain) were also tested. A liquid soap with no bactericidal activity (Lifosit[®], B. Brawn-Dexon SA, Spain) was tested as well, and considered a negative control. Antiseptic handrubs were used undiluted, while Hibiscrub and Clorina were prepared at a 55% (v/v) dilution in

standard hard water (300 ppm CaCO₃) as described in the European Standard Draft prEN 12054: 1995.¹³

Two disinfectants were also evaluated: Virkon at 1% (potassium monoperoxysulphate triple salt, sulphamic acid and sodium alkyl benzene sulpho-nate. Antec International Ltd, Sudbury, Suffolk, UK) and Instrunet Superficies[®] (glutaraldehyde, formal, glyoxal and dodecyl-dimethylammonium chloride. Laboratorios Inibsa SA, Lliçà de Vall, Barcelona, Spain). Both disinfectants were prepared in sterile distilled water at a concentration 1.25-fold the use dilution, as described in the European Standard EN 1040.¹⁴ All products were freshly prepared and used within 2 h.

Assessment of bactericidal activity of antiseptics

All antiseptics and Lifosit[®] were evaluated for their efficacy against the nine *A. baumannii* strains by performing a quantitative suspension test according to the European Standard Draft prEN 12054.

Preliminary tests were carried out to determine the most effective neutralizer for each product. The neutralizers used in the bactericidal tests were as follows: Bereens diluent for Sterillium; 3% Tween 80 (v/v), 0.3% lecithin (w/v), 0.1% histidine (w/v) for 'Solución Antiséptica de Manos'; 3% Tween 80 (v/v), 0.3% lecithin (w/v), 0.1% histidine (w/v), 1% peptone (w/v), 0.43% ClNa (w/v), 0.36% KH₂PO₄ (w/v) and 0.72% Na₂HPO₄ (w/v) for 'Gel Antiséptico de Manos'; 15% Tween 80 (v/v), 1.5% lecithin (w/v) and 1.5% histidine (w/v) for Hibiscrub and Lifosit; and 0.5% sodium thiosulphate (w/v) for Clorina.

As described in the European Standard prEN 12054, bacterial test suspensions were obtained for each strain with 1-3 × 10⁸ cfu/mL. The concentration of these test suspensions (N, in cfu/mL) were measured by diluting the adjusted suspensions up to 10⁻⁶ and inoculating 1 mL in duplicate on to TSA plates, which were incubated at 37 ± 1°C for 42-48 h. To assess the activity of the test products, 1 mL of test suspension was pipetted into a tube containing 9 mL of product test solution, and left at 20 ± 1°C for 30 s (handrub antiseptics), 1 min (Hibiscrub and Lifosit) or 3 min (Clorina) according to the manufacturers instructions. One millilitre of the reaction mixture was then pipetted into a tube containing 8 mL of the appropriate neutralizer and 1 mL of water and left at 20 ± 1°C for 1 min. A series of 10-fold dilutions was prepared and 1 mL samples of the neat and 10⁻¹ dilution (handrubs), the 10⁻² and 10⁻³ dilutions (Hibiscrub and Clorina) or the 10⁻², 10⁻³ and 10⁻⁴ dilutions (Lifosit) were pipetted in duplicate into separate Petri dishes and 15-20 mL melted tryptone soy agar (TSA) at

45 ± 1°C was added. Plates were incubated as above and cfu/mL were counted (n).

In addition, the neutralizer was checked for its possible toxicity for the test organisms. One millilitre of a diluted bacterial suspension containing 1-3 × 10³ cfu/mL was added to 9 mL neutralizer and left at 20 ± 1°C for 1 min. Two 1 mL samples of the mixture were then inoculated on to TSA plates and incubated as above. Colony-forming units were enumerated (N'). Finally, the inactivation of the product activity by the dilution-neutralization method was also validated. Nine millilitres of the product test solution was added to 1 mL of the diluent for bacterial suspensions and left at 20 ± 1°C for 1 min. Then, 1 mL of the mixture was transferred into a tube containing 8 mL neutralizer (previously kept at 20 ± 1°C) and left at 20 ± 1°C for 1 min. One millilitre of a diluted bacterial suspension containing 1-3 × 10³ cfu/mL was then added and left at 20 ± 1°C for 1 min. Two 1 mL samples of the mixture were then inoculated onto TSA plates and incubated as described above. Colony-forming units were counted (n').

An additional control was performed for products prepared in hard water, to assess any negative effects of such experimental conditions on tested micro-organisms. One millilitre of a diluted bacterial suspension containing 1-3 × 10³ cfu/mL was added to 9 mL hard water, and left at 20 ± 1°C for 1 min (Hibiscrub and Lifosit) or 3 min (Clorina). Two 1 mL samples of the mixture were then inoculated onto TSA plates and incubated as described above. Colony forming units were enumerated (A).

Assessment of bactericidal activity of disinfectants

Both disinfectants were evaluated for their efficacy against the nine *A. baumannii* strains, by performing a quantitative suspension test according to the European Standard EN 1040. Preliminary tests were carried out to determine the most effective neutralizer for each product. The neutralizers used in the bactericidal tests were as follows: 1% sodium thiosulphate (w/v) and 10% fetal bovine serum for Virkon; and 1% histidine (w/v), 0.3% lecithin (w/v) and 10% Tween 80 (v/v) for Instrunet Superficies.

The suspension test method described in EN 1040 is very similar to that described above for prEN 12054 except for three differences: (1) the concentration of the bacterial test suspension is 1.5-5 × 10⁸ cfu/mL; (2) 1 mL of test suspension was pipetted into a tube containing 8 mL disinfectant and 1 mL water, and the contact time was 5 min;

and (3) 1 mL of reaction mixture was neutralized with 8 mL of the appropriate neutralizer, and neutralization time was 5 min. The average viable count after the test procedure is expressed as N_a , the viable count after the toxicity control of the neutralizer as N_x , the viable count after the product inactivation control as N_y , and the viable count in the test suspension used for the preliminary tests as N_v .

Interpretation of results

Following the European Standard prEN 12054, validation of the dilution-neutralization method includes validation of non-toxicity of the neutralizer ($N' \geq 0.5 N$), validation of the product inactivation by the dilution-neutralization method ($n' \geq 0.5 N'$) and validation of hard water conditions ($A \geq 0.5 N$). The values obtained for N , N' and A should be 100-300 cfu.

Provided that the dilution-neutralization method is validated, antiseptics used for both hygienic and surgical handwash are deemed effective as long as they demonstrate a reduction in the viable count from $1-3 \times 10^7$ to no more than $1-3 \times 10^4$ cfu/mL within 30 s or 1 min, according to the contact time recommended by the manufacturer. Antiseptics used for both hygienic and surgical handrubs are considered bactericidal if they show a reduction in the viable count from $1-3 \times 10^7$ to no more than $1-3 \times 10^2$ cfu/mL within 30 s or 1 min.

As stated in the European Standard EN 1040, validation of the dilution-neutralization method includes validation of non-toxicity of the neutralizer ($N_x \geq 0.05N_v$) and validation of the inactivation by the dilution-neutralization method ($N_y \geq 0.05N_v$). N should be $1.5-5 \times 10^8$ cfu/mL and N_v $6 \times 10^2-3 \times 10^3$.

Provided that the dilution-neutralization method is validated, disinfectants are deemed effective as long as they achieve a 10^5 -fold reduction in the viable count within not more than 60 min at $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Results

Characterization of *A. baumannii* strains

Four clonal types of *A. baumannii* were identified by macrorestriction analysis of chromosomal DNA and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), which showed different antibiotic resistance patterns, including multiple antibiotic resistance in both

clinical and environmental isolates (Table I). The clonal type designations were the same as used in earlier reports of strains isolated in our ICU.

Sensitivity of *A. baumannii* to antiseptics

The neutralizers used were effective at inactivating each antiseptic and non-toxic for the test organisms, thus fulfilling the requirements stated in the European Standard prEN 12054 (data not shown). All antiseptics tested showed good bactericidal activity against the nine *A. baumannii* strains (Tables II and III). Sterillium, 'Gel Antiséptico de Manos' and 'Solución Antiséptica de Manos' rendered negative cultures in 30 s at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Similar results were obtained with Hibiscrub in 1 min and Clorina in 3 min, according to the contact times specified by the manufacturers. In contrast, the liquid soap Lifosit did not show bactericidal activity against any of the strains tested.

Sensitivity of *A. baumannii* to disinfectants

The neutralizers used were effective at inactivating each disinfectant and non-toxic for the test organisms, thus fulfilling the requirements stated in the European Standard EN 1040 (data not shown). Both Virkon and Instrunet Superficies were bactericidal, demonstrating a $> 10^5$ -fold reduction in the viable count of all nine *A. baumannii* strains within 5 min at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (Table IV).

Discussion

The control of outbreaks caused by *Acinetobacter* spp. presents a difficult challenge because the micro-organisms persistence in the hospital environment leads to continuous contamination of patients and personnel. Disinfection and handwashing practices are of utmost importance, and in some instances, units have had to be closed for complete disinfection.³ While numerous studies have focused on the emergence of antibiotic resistance, only a few have examined the possible emergence of resistance to antiseptics and disinfectants as the result of a sustained *A. baumannii* outbreak. In order to clarify the response of *A. baumannii* to biocides, we investigated its susceptibility to several antiseptics and disinfectants.

Our hospital suffered a large and sustained outbreak of endemic nosocomial infection caused by different strains of *A. baumannii* which evolved over the course of the outbreak. From 1992 to 1996, the prevalent clones were A and B, which were

Table 1 Characterization of *Acinetobacter baumannii* strains

Strain	Isolation date	Origin	Clonal type ^a	Gent (mg/L)	Amk (mg/L)	Cip (mg/L)	Imp (mg/L)	Caz (mg/L)	Sulbactam (mg/L)
94/151101	Nov 94	Blood	B	R (>128)	R (>128)	S (≤2)	S (≤1)	S (≤4)	S (≤4)
95/12230	Feb 95	CSF	A	R (>128)	R (>128)	R (>32)	S (≤1)	R (>16)	S (2)
96/305535	Nov 96	Sputum	A	S (4)	R (>128)	R (>32)	S (≤1)	S (≤4)	S (2)
96/320139	Dec 96	Rectal swab	D	R (>128)	R (>128)	R (>32)	S (8)	R (>16)	S (4)
97/100477	Jun 97	Environment	D	R (>128)	R (>128)	R (>32)	S (8)	R (>16)	S (4)
97/200271	Dec 97	Environment	E	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	R (>64)
97/34087	Feb 97	Urine	E	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	R (>64)
99/266014	Nov 99	Blood	—	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	R (>64)
99/267387	Nov 99	Tracheal aspirate	—	R (>128)	R (>128)	R (>32)	R (>32)	R (>16)	I (8)

Gent, gentamicin; Amk, amikacin; Cip, ciprofloxacin; Imp, imipenem; Caz, ceftazidime; S, sensitive; R, resistant; I, intermediate; CSF, cerebrospinal fluid; —, not done.

^a Genotype by PGFE as reported previously.⁷

uniformly susceptible to carbapenems and sulbactam. Isolates belonging to clone C, a minor clone in the outbreak, were not available for the present study. In 1996, clone D appeared, with decreased susceptibility to imipenem. Finally, in 1997, clone E emerged, which was susceptible only to colistin and was highly resistant to all beta-lactams, including carbapenems and sulbactam, to aminoglycosides and to fluorquinolones. By evaluating representative strains isolated at different times during the outbreak, we were able to assess the evolution of *A. baumannii* susceptibility to biocides over time and examine the influence of biocides on the evolution of the endemic outbreak. In addition, we analysed the relationship between susceptibility to biocides and antibiogram patterns exhibited throughout this period.

Just as repeated exposure of hospital pathogens to antibiotics can lead to resistance, so might a similarly intensive exposure to biocides result in a possible resistance to antiseptics and disinfectants. In fact, a stable increase in chlorhexidine MICs was reported for *Pseudomonas aeruginosa* after exposure to sub-inhibitory concentrations simulating residual levels of this antiseptic in the environment.¹⁵ Moreover, a relationship between chlorhexidine use and an increased prevalence of Gram-negative isolates with higher MICs has been reported; strains of *P. aeruginosa* and *Proteus* spp. isolated from urinary tract infection in paraplegic patients showed an above-average resistance to quaternary ammonium compounds (QACs) and chlorhexidine.^{8,16} In our study, all strains isolated throughout the outbreak were sensitive to all antiseptics and disinfectants tested, including alcohols, phenolics, chlorine compounds, QACs and 4% chlorhexidine. Certainly, the assessment of the activity of biocides in vitro does not take into account some factors that may significantly modify

their clinical efficacy, such as the inhibitory effect of organic matter, and micro-organisms on dry environmental surfaces or on the skin may be less sensitive to biocidal agents than those in suspension. In fact, several antiseptics with good in vitro activity showed widely varying clinical efficacy at removing *A. baumannii* from heavy contaminated hands; the effectiveness of 70% ethyl alcohol and 10% povidone-iodine was higher than that of 4% chlorhexidine or plain soap, as expected.¹⁷ This may help to explain the spread of *A. baumannii* among the patients and healthcare workers of our ICUs, as heavy contamination was often detected and cleaning and hygienic protocols included the use of chlorhexidine.

Efflux pump mechanisms and changes in permeability of the outer membrane are recognized mechanisms of intrinsic and acquired bacterial resistance to antibiotics.¹⁸ The naturally low permeability of *A. baumannii* is the main mechanism responsible for its pronounced ability to develop resistance to many kinds of antibiotics. Although it is therefore possible that changes in the outer membrane might also cause a decreased susceptibility to antiseptics or disinfectants, Barry et al.¹⁹ concluded that antibiotic resistance had no effect on sensitivity to either chlorhexidine gluconate or povidone-iodine when testing *Acinetobacter* and other bacterial species. Moreover Rutala et al.²⁰ were not able to demonstrate a correlation between antibiotic resistance and resistance to QACs and phenolics in *P. aeruginosa* or other bacteria. In contrast, another study found a correlation between antibiotic resistance and chlorhexidine susceptibility.²¹ Multiple antibiotic resistance also appeared to be associated with increased chlorhexidine resistance among Gram-negative bacteria,²² such as *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Providencia*

Table II Bactericidal activity of antiseptics for hygienic and surgical handrub against *A. baumannii* strains

Strains	Sterillium®			SAM			GAM		
	N	n	Log ₁₀ reduction factor	N	n	Log ₁₀ reduction factor	N	n	Log ₁₀ reduction factor
94/151101	2.69 × 10 ⁷	NC	> 4.95	1.85 × 10 ⁷	NC	> 4.79	2.98 × 10 ⁷	NC	> 5
95/12230	1.80 × 10 ⁷	NC	> 4.78	1.97 × 10 ⁷	NC	> 4.82	1.89 × 10 ⁷	NC	> 4.80
96/305535	2.89 × 10 ⁷	NC	> 4.99	1.40 × 10 ⁷	NC	> 4.67	1.31 × 10 ⁷	NC	> 4.64
96/320139	1.57 × 10 ⁷	NC	> 4.72	3.02 × 10 ⁷	NC	> 5.01	2.17 × 10 ⁷	NC	> 4.86
97/100477	3.24 × 10 ⁷	NC	> 5.04	1.92 × 10 ⁷	NC	> 4.81	2.41 × 10 ⁷	NC	> 4.91
97/200271	2.61 × 10 ⁷	NC	> 4.94	2.98 × 10 ⁷	NC	> 5	1.30 × 10 ⁷	NC	> 4.64
97/34087	2.46 × 10 ⁷	NC	> 4.92	1.90 × 10 ⁷	NC	> 4.80	1.18 × 10 ⁷	NC	> 4.60
99/266014	2.85 × 10 ⁷	NC	> 4.98	1.77 × 10 ⁷	NC	> 4.77	1.29 × 10 ⁷	NC	> 4.64
99/267387	2.95 × 10 ⁷	NC	> 4.99	2.62 × 10 ⁷	NC	> 4.94	1.98 × 10 ⁷	NC	> 4.82

N, the average viable count of the test suspension control; n, the average viable count after the test procedure; results are given in cfu/mL. NC, negative culture (less than 3 × 10² cfu/mL). SAM, 'Solución Antiséptica de Manos'; GAM, 'Gel Antiséptico de Manos'.

Table III Bactericidal activity of antiseptics for hygienic and surgical handwash (Hibiscrub® and Clorina®) against *A. baumannii* strains versus liquid soap (Lifosit®)

Strains	Hibiscrub®			Clorina®			Lifosit®		
	N	n	Log ₁₀ reduction factor	N	n	Log ₁₀ reduction factor	N	n	Log ₁₀ reduction factor
94/151101	1.23 × 10 ⁷	NC	> 3.08	2.01 × 10 ⁷	NC	> 3.30	2.63 × 10 ⁷	2.51 × 10 ⁷	0.02
95/12230	2.76 × 10 ⁷	NC	> 3.44	1.09 × 10 ⁷	NC	> 3.03	1.83 × 10 ⁷	1.75 × 10 ⁷	0.02
96/305535	1.53 × 10 ⁷	NC	> 3.18	1.06 × 10 ⁷	NC	> 3.02	2.62 × 10 ⁷	2.27 × 10 ⁷	0.06
96/320139	1.86 × 10 ⁷	NC	> 3.26	1.78 × 10 ⁷	NC	> 3.25	2.66 × 10 ⁷	2.10 × 10 ⁷	0.10
97/100477	1.61 × 10 ⁷	NC	> 3.20	1.08 × 10 ⁷	NC	> 3.03	2.87 × 10 ⁷	2.50 × 10 ⁷	0.06
97/200271	3.41 × 10 ⁷	NC	> 3.53	2.45 × 10 ⁷	NC	> 3.38	2.51 × 10 ⁷	2.42 × 10 ⁷	0.01
97/34087	1.83 × 10 ⁷	NC	> 3.26	2.91 × 10 ⁷	NC	> 3.46	2.51 × 10 ⁷	2.49 × 10 ⁷	0
99/266014	1.67 × 10 ⁷	NC	> 3.22	1.59 × 10 ⁷	NC	> 3.20	2.29 × 10 ⁷	2.10 × 10 ⁷	0.03
99/267387	2.66 × 10 ⁷	NC	> 3.42	1.60 × 10 ⁷	NC	> 3.20	2.92 × 10 ⁷	2.62 × 10 ⁷	0.05

N, the average viable count of the test suspension control; n, the average viable count after the test procedure; results are given in cfu/mL. NC, negative culture (less than 1 × 10⁴ cfu/mL).

Table IV Bactericidal activity of disinfectants against *A. baumannii* strains

Strains	Virkon®			Instrunet Superficies®		
	N	N _a	Log ₁₀ reduction factor	N	N _a	Log ₁₀ reduction factor
94/151101	1.22 × 10 ⁸	NC	5.91	1.46 × 10 ⁸	NC	5.99
95/12230	1.56 × 10 ⁸	NC	6.02	2.58 × 10 ⁸	NC	6.24
96/305535	1.42 × 10 ⁸	NC	5.98	2.42 × 10 ⁸	NC	6.21
96/320139	1.28 × 10 ⁸	NC	5.93	2.20 × 10 ⁸	NC	6.17
97/100477	2.54 × 10 ⁸	NC	6.23	3.07 × 10 ⁸	NC	6.31
97/200271	2.75 × 10 ⁸	NC	6.26	3.05 × 10 ⁸	NC	6.31
97/34087	2.96 × 10 ⁸	NC	6.30	2.78 × 10 ⁸	NC	6.27
99/266014	1.91 × 10 ⁸	NC	6.11	3.14 × 10 ⁸	NC	6.32
99/267387	1.81 × 10 ⁸	NC	6.08	3.55 × 10 ⁸	NC	6.38

N, the average viable count of the test suspension control; N_a, the average viable count after the test procedure; results are given in cfu/mL. NC, negative culture (less than 1.5 × 10² cfu/mL).

stuartii and *Serratia marcescens*.^{8,23} In the present study, all *A. baumannii* strains tested showed different patterns of resistance to antibiotics, but were equally sensitive to the use-dilution of the disinfectants and antiseptics tested in vitro. Therefore, our results do not show evidence of a correlation between antibiotic and biocide resistance.

Generally, clinical reports on susceptibility to biocides are based on determination of MICs, and resistance is measured in terms of MIC increases. Although this method is appropriate for antibiotic sensitivity testing, it is not suitable for testing biocidal activity of antiseptics and disinfectants.²⁴ The MIC test provides basic information regarding the activity of biocidal and antimicrobial formulations, but further testing with in vitro and in-use assays is needed. To our knowledge, this is the first assessment of the bactericidal activity of antiseptics and disinfectants against *Acinetobacter* spp. based on European Standards. The quantitative in vitro suspension test that we used allowed an accurate determination of the logarithmic reduction factor achieved by biocides in the number of colony-forming units.

We conclude that there is no evidence of *A. baumannii* resistance to the antiseptics and disinfectants tested in vitro. We found no development of resistance over time, a factor that could have contributed to the persistence of our large and sustained endemic outbreak, and no changes in susceptibility associated with different patterns of antibiotic resistance. Thus, the alterations in the cell-wall permeability or transport associated with multiple antibiotic resistance in *A. baumannii* do not seem to interfere in the uptake of disinfectants or antiseptics into the cells under the conditions used in this study. However, environmental reservoirs and healthcare workers play an important role

in the transmission of this micro-organism from one patient to another, and therefore in-use studies of disinfection of surfaces and artificially contaminated hands would provide further information regarding the efficacy of disinfectants and antiseptics under practical conditions.

Acknowledgements

We thank Laboratorios Inibsa SA, Bode Chemie Hamburg, Zeneca SA, B. Brawn-Dexon and Tedec-Meiji Farma SA (distributor of Antec International) for supplying the antiseptics and disinfectants used in this study.

References

- Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med* 1998;**129**:182–189.
- Struelens MJ, Carlier E, Maes N, et al. Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J Hosp Infect* 1993;**25**:15–32.
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;**9**:148–165.
- Hanggerger H, Garcia Rodríguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. *JAMA* 1999;**281**:67–71.
- Webster C, Towner KJ, Humphreys H. Survival of *Acinetobacter* on three clinical related inanimate surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;**21**:246.
- Corbella X, Pujol M, Ayats J, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1996;**23**:329–334.
- Corbella X, Montero A, Pujol M, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and

- sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:4086–4095.
8. Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, et al. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;**42**:2151.
 9. Dijkshoorn L. *Acinetobacter*—microbiology. In: Bergogne-Bérézin E, Joly-Guill ML, Towner KJ, editors. *Acinetobacter: Microbiology, Epidemiology, Infections, Management*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc; 1996. p. 37–69.
 10. García Arata MI, Gener-Smidt P, Baquero F, Ibrahim A. PCR-amplified 16 S and 23 S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res Microbiol* 1997;**148**:777–784.
 11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance for antimicrobial susceptibility testing; 9th informational supplement; M100-S9. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 1999.
 12. Soussy CJ, Cluzel R, Courvalin P, The Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;**13**:238–246.
 13. PrEN 12054: 1995 E. Chemical disinfectants and antiseptics. Products for hygienic and surgical handrub and handwash. Bactericidal activity. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization (CEN).
 14. EN 1040: 1997 E. Chemical disinfectants and antiseptics. Basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1). European Committee for Standardization (CEN).
 15. Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, et al. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a residual concentration. *J Hosp Infect* 2000;**46**:297–303.
 16. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;**12**: 147–179.
 17. Cardoso CL, Pereira HH, Zeguín JC, et al. Effectiveness of hand-cleansing agents for removing *Acinetobacter baumannii* strain from contaminated hands. *Am J Infect Control* 1999;**27**:327–331.
 18. Naikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets. Permeability barriers and active efflux. *Science* 1994;**264**: 382–388.
 19. Barry AL, Fuchs PC, Brow SD. Lack of effect of antibiotic resistance on susceptibility of micro-organisms to chlorhexidine gluconate and povidone iodine. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1999;**18**:920–921.
 20. Rutala WA, Stiehl MM, Saubbi FA, et al. Susceptibility of antibiotic susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;**18**:417–421.
 21. Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* 2002;**51**: 201–206.
 22. Koljalg S, Naaber P, Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 2002;**51**:106–113.
 23. Stickler DJ, Thomas B. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. *J Clin Pathol* 1980;**33**:288–296.
 24. Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J Hosp Infect* 1998;**43**(Suppl.):S57–S68.

8.2. Artículos relacionados con la línea de investigación

Artículo 5

A Hernández, E Martró, L Matas, M Martín and V Ausina. Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon[®] against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. *J Hosp Infect* 2000; 46: 203-209.

Artículo 6

A Hernández, FJ Belda, J Domínguez, L Matas, M Giménez, M Caraballo, C Ramil and V Ausina. Evaluation of the disinfectant effect of Solprogel[®] against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J Hosp Infect* 1996; 34: 223-228.

Evaluation of the disinfectant effect of Solprogel against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

A. Hernández, F. J. Belda, J. Domínguez, L. Matas, M. Gimenez, M. Caraballo, C. Ramil and V. Ausina

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain

Received 20 March 1996; revised manuscript accepted 26 June 1996

Summary: The antiviral activities of sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) and a commercial product (Solprogel 2%) against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) were investigated using a quantitative suspension test method. Solprogel is a compound that contains NaDCC and a biodegradable polymer of acrylic acid. Viral suspensions were prepared containing 3.2×10^6 tissue culture infective dose 50 (TCID₅₀) in culture media. Syncytium formation in the MT-2 line and HIV antigen p24 on the supernatant of the cultures were used to determine viral titre. Results indicate that satisfactory disinfection (1000-fold reduction in 5 min) can be achieved using NaDCC and Solprogel at concentrations of 100 and 120 ppm available chlorine, respectively.

Keywords: Disinfectant granules; sodium dichloroisocyanurate; HIV; Solprogel.

Introduction

Precise information on the efficacy of chemical disinfection procedures against human immunodeficiency virus (HIV-1) is of growing interest because of the continuing rise in the number of AIDS cases, the repeated hospitalization of HIV-infected individuals and the consequent increased risk of accidental exposure to HIV-contaminated material for healthcare providers.

The ability of HIV to survive at room temperature under a variety of environmental conditions has been demonstrated.¹ Cell-free and cell-associated HIV cultures suspended in 10% serum have been known to remain infectious for several weeks at room temperature.² Preliminary studies however, indicate that HIV is extremely sensitive to the action of sodium hypochlorite (NaOCl).^{3,4} Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC)

Correspondence to: Dr Vicente Ausina, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Cra. de Canyet s/n 08019 Badalona, Barcelona, Spain.

is an organic chlorine compound containing two =N-Cl groups that hydrolyse in water to form the imino (=N-H) group and HOCl, which is the antimicrobial component. HOCl is also the active component in bleach solutions, which have been shown capable of destroying HIV.³

Hypochlorite solutions are prepared for use in hospitals either by diluting NaOCl solutions or by dissolving NaDCC-containing tablets or granules in water to release hypochlorous acid. The method currently recommended is to prepare a solution containing 100 000 ppm Cl₂ by diluting household bleach to 10% strength, and then to pour the solution over a spillage and leave it for 30–60 min. This procedure has disadvantages however, because not all household bleaches contain 100 000 ppm av. Cl₂. Previous studies^{5–7} have shown that NaDCC has many advantages over NaOCl. The NaDCC granules are quicker and easier to use because no dilutions are required, and give solutions of known available chlorine concentration. NaDCC also has less tendency to be inactivated by organic matter and is less corrosive to metals.

Still newer solid compounds with decontaminating and deodorizing properties have recently appeared on the market offering additional alternatives to steam sterilization or incineration. One such product, Solprogel (Laboratorios Inibsa S.A., Barcelona, Spain), is supplied as a dry powder form that can be sprinkled on to a liquid to convert it to a granulated gel that contains 2% NaDCC.

We have determined the minimum in-vitro concentration of NaDCC and the minimum time of contact needed to inactivate HIV-1 for both NaDCC and Solprogel.

Materials and methods

Virus and cells

The HIV-1_{IIIB} virus strain was used. The virus was grown in MT-2 cell cultures, suspended in growth medium (GM) (RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1% L-glutamine, penicillin and streptomycin) and kept at 37°C in 5% CO₂ in air. Cell-free virus stock was obtained by centrifuging the cultures at 830 *g* for 15 min and removing the supernatants for pelleting by centrifugation (100 000 *g*, 10 min, 4°C). Cell-free virus-containing supernatants were then frozen in aliquots at –80°C.

Virus titrations

Determination of virus titre was based on infectivity assays. Briefly, 10-fold dilutions of each timed sample were prepared in GM; 100 µL of each dilution was then inoculated into each of three replicates in a 24 well microtitre plate containin 0.9 mL MT-2 cells (3.0 × 10⁵ cell/mL) in GM. The cultures were incubated at 37°C 5% CO₂ in air. GM was added to each well after three to four days. On days 4, 7 and 11, cultures were examined microscopically for cytopathic effect (syncytium formation) and

culture fluid was harvested for the HIV antigen (Ag) p24 assay (NEK-060, Du Pont de Nemour, Belgium). Virus titre was calculated using the Spearman-Kärber formula,⁸ and expressed as the tissue culture infective dose 50 (TCID₅₀), which is the reciprocal of the highest dilution at which syncytia develop and/or HIV Ags are expressed.

Disinfectant solutions

Solutions of NaDCC. NaDCC granules (Delsa S.A., Barcelona, Spain) containing 60% av. Cl₂ were dissolved in sterile distilled water. According to the manufacturer's data 2 g NaDCC dissolved in 120 mL water yields 10 000 ppm av. Cl₂. Working solutions of NaDCC at 1000 and 100 ppm av. Cl₂ were prepared from this initial solution. A fresh dilution of disinfectant was prepared in distilled water before each use.

Solprogel. Solprogel (Laboratorios Inibsa S.A., Barcelona, Spain) is a dry powder containing a biodegradable polymer of acrylic acid with the empirical formula (C₃H₃O₂ Na) 2.1 × (C₃H₄O₂) and with a large number of bonds among its hydrophilic chains. When Solprogel comes into contact with a liquid residue, the liquid is solidified by solvation of the polymer's hydrophilic groups; the compound also has a strong ability to expand and encapsulate. Solprogel contains NaDCC which yields Cl₂ as described previously. Following the manufacturer's instructions, 10 g/L of Solprogel was dissolved in GM containing the stock virus, to give 120 ppm av. Cl₂.

Cytotoxicity assays

Initially, the disinfectant solutions were examined for toxic effect on the target cells used to assess residual virus infectivity using a virus titration procedure. Cell viability for each sample was checked microscopically by trypan blue exclusion at 24 and 48 h, and every two or three days thereafter for a period of at least 11 days, unless clear evidence of cytotoxicity or cell lysis appeared before the end of that term.

Virus treatment

Successive 10⁻¹ dilutions of stock virus in NaDCC disinfectant solutions were prepared (10 000, 1000 and 100 ppm av. Cl₂). Solprogel was added to a 10⁻¹ solution of virus stock in GM. Times of contact with the virus were 5, 15 and 60 min. Once the treatment period was over, the samples were diluted in NTE buffer (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl; pH 7.4) to neutralize the disinfectant. The Solprogel samples were homogenized in a vortex for 2–3 min and then centrifuged at 2500 g for 10 min to eliminate gel residues, and later ultracentrifuged at 100 000 g for 10 min at 4°C to pellet the viral particles.

The pellets were resuspended in 1 mL GM, filtered through a 0.45 µm filter (Schleicher and Schenell, Dassel, Germany) and stored at -80°C until the test of residual infectivity could be performed in MT-2 cells.

Virus survival

HIV survival was measured directly by infection of cell cultures (syncytium formation) and indirectly by HIV p24 Ag. Viral titres of the suspensions treated with NaDCC and Solprogel, and of untreated control solutions, were obtained by means of 10-fold dilutions (10^{-2} – 10^{-6}) on MT-2 cells, as described above. These dilutions were inoculated in triplicate in 24 well plates, which were then incubated for 11 days at 37°C in air enriched with 5% CO₂. The presence of infectious virus was determined by examining the viral cultures each three to four days for any cytopathic effect and the culture fluid was then harvested for HIV-1 p24 assay.

Results

After the incubation period of the cytotoxicity assay the traces of disinfectant had no significant toxic effect on the MT-2 cells (viability >85%). Virus titres for HIV-1 suspensions were determined before and after treatment with either NaDCC or Solprogel. The virus titre of the stock suspension was 3.2×10^6 TCID₅₀ and under the experimental conditions of this study the stock titre decreased to 6.8×10^5 TCID₅₀ (Table I). Infectious virus was detected in all untreated samples but was not detected in any of the samples treated with NaDCC or Solprogel, indicating that virions present in inoculates after treatment were unable to replicate in MT-2 cells. The presence or absence of cytopathic effect coincided with positive or negative determination of Ag p24.

The titre of virus in all untreated (control) samples was 6.8×10^5 TCID₅₀. The titre of virus in samples treated with either NaDCC or Solprogel was $<10^2$. NaDCC and Solprogel at concentrations of 100 and 120 ppm of av. Cl₂ respectively, achieved a thousand-fold reduction in TCID₅₀ >3 in 5 min.

Discussion

HIV is a serious hazard for healthcare workers, and it is essential to determine the virucidal activities of disinfectant agents used in hospitals and laboratories under strict experimental conditions. To test the virucidal activity of one commercial biocide against HIV-1, we used a quantitative suspension test. Syncytial inhibition assays on the MT-2 line and HIV Ag p24 on the supernatant of the cultures was used to determine viral titre. Because HIV replication is highly dependent upon the ability of the cells used to grow the virus, chemical cytotoxicity can be an important source of error. Richman *et al.*⁹ pointed out that if the cells used to assay a chemically treated sample of HIV are killed by traces of the inactivating agent, the resulting absence of viral production could be interpreted as viral inactivation, whereas it would in fact be the result of cytotoxicity. Our results, however, indicate that traces of the disinfectant solutions we used had no toxic effect on MT-2 cells.

Table I. Effect on HIV-1 of 5, 15 and 60 min treatments with several concentrations of NaDCC and Solprogel

Sample*	Time in contact with disinfectant (min)	Dilution	CPE†	p24 Antigen‡	Virus titre (pg/mL)
PS1		10^{-6}	—	neg	3.2×10^6
		10^{-5}	+	>400	
PS2		10^{-5}	—	neg	6.8×10^5
		10^{-4}	+	>400	
PS3		10^{-5}	—	neg	6.8×10^5
		10^{-4}	+	>400	
PS4		10^{-5}	—	neg	6.8×10^5
		10^{-4}	+	>400	
PS5		10^{-5}	—	neg	6.8×10^5
		10^{-4}	+	>400	
S1	5	10^{-2}	—	neg	$<10^2$
	15	10^{-2}	—	neg	
	60	10^{-2}	—	neg	
S2	5	10^{-2}	—	neg	$<10^2$
	15	10^{-2}	—	neg	
	60	10^{-2}	—	neg	
S3	5	10^{-2}	—	neg	$<10^2$
	15	10^{-2}	—	neg	
	60	10^{-2}	—	neg	
S4	5	10^{-2}	—	neg	$<10^2$
	15	10^{-2}	—	neg	
	60	10^{-2}	—	neg	

* PS1, HIV-1 frozen to -80°C . PS2, HIV-1 frozen to -80°C , diluted to 10^{-1} in culture media and treated under experimental conditions. PS3, HIV-1 frozen to -80°C , diluted to 10^{-1} in culture medium stored 5 min at ambient temperature and treated under experimental conditions. PS4, HIV-1 frozen to -80°C , diluted to 10^{-1} in culture medium, stored at ambient temperature for 15 min and treated under experimental conditions. PS5, HIV-1 frozen to -80°C and diluted to 10^{-1} in culture medium, stored 60 min at ambient temperature and treated under experimental conditions. S1, HIV-1 treated with NaDCC solution, 10 000 ppm av. Cl₂. S₂, HIV-1 treated with NaDCC solution, 1 000 ppm av. Cl₂. S3, HIV-1 treated with NaDCC solution, 100 ppm av. Cl₂. S4, HIV-1 treated with Solprogel.

† +, Syncytium formation. —, No syncytium formation.

‡ neg = absence of p24.

Infectious viruses were considered to be present in a culture when syncytium formation and/or HIV p24 Ag could be observed. Spickett *et al.*¹⁰ showed that reverse transcriptase levels do not necessarily correlate with infectivity, but that correlation between the syncytial assay and infectivity on the C8166 cell line is absolute even when infectivity is measured quantitatively after several days in culture using an HIV antigen assay. In our study using the MT-2 cell line, we also found that syncytium formation coincided with HIV Ag p24 detection.

Our results indicate that disinfection was satisfactory with both NaDCC

and Solprogel at concentrations of 100 and 120 ppm av. Cl₂, as these were sufficient to prevent detectable survival after 5 min of contact in the absence of organic material. Our finding using a syncytium formation assay on MT-2 cell confirm those of previous studies that used the C8166 lymphoblastoid line to determine viral titre. Sattar and Springthorpe¹¹ showed that, in the absence of organic matter, HIV is sensitive to NaDCC, a solution of 100 ppm av. Cl₂ being sufficient to produce a 1000-fold reduction in virus titre within 5 min. These data agree with the results of Bloomfield *et al.*¹², who reported that a 50 ppm av. Cl₂ concentration is able to inactivate HIV and provide decontamination.

Solprogel's ability to inactivate HIV-1 *in vitro*, along with its ability to form a gel, make this product a suitable one to consider when selecting a disinfectant for use on HIV contaminated body fluids and tissues. We propose that further study should be done to test the virucidal efficacy of the product on organic matter and whole blood.

We wish to thank Dr Alfredo Garcia-Saiz, of Centro Nacional de Biología Celular and Retrovirus, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain for supplying the MT-2 cell line and the HIV-1_{IIIB} virus strain. This work was supported by Laboratorios Inibsa, S.A.

References

1. Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, Chermann JC. Resistance of AIDS virus at room temperature. *Lancet* 1985; **ii**: 721-722.
2. Van Bueren J, Simpson RA, Jacobs P, Cookson BD. Survival of human immunodeficiency virus in suspension and dried onto surfaces. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 571-574.
3. Spire B, Montagnier I, Barré-Sinoussi F, Cherman JC. Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by chemical disinfectants. *Lancet* 1984; **2**: 899-901.
4. Martin LS, McDougal JS, Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 1985; **152**: 400-403.
5. Coates D. Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. *J Hosp Infect* 1985; **6**: 31-40.
6. Coates D. Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate. *J Hosp Infect* 1988; **11**: 95-97.
7. Bloomfield SF, Miller EA. A comparison of hypochlorite and phenolic disinfectants for disinfection of clean and soiled surfaces and blood spillages. *J Hosp Infect* 1989; **13**: 231-239.
8. Kärber B. Beitrag zur Kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn-Schmiederbergs. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 1931; **162**: 480-483.
9. Richman DD, Mitsuya H, Broder S *et al.* Fusidic acid, HIV, and host toxicity. *Lancet* 1988; **i**: 1051-1052.
10. Spickett G, Baettie RE, Bountiff L, Dalgleish AG, Webster ADB. Quantitation of HIV-1 activity in tissue culture supernatants: effects of culture condition on syncytial assays and virus production. *J Virol Methods* 1989, **24**: 67-76.
11. Sattar SA, Springthorpe VS. Survival and disinfectant inactivation of the human immunodeficiency virus: a critical review. *Rev Infect Dis* 1991; **13**: 430-47.
12. Bloomfield SF, Smith-Bunchenell CA, Dalgleish AG. Evaluation of hypochlorite-releasing disinfectants against the human immunodeficiency virus (HIV). *J Hosp Infect* 1990; **15**: 273-278.

Artículo 7

A Hernández, FJ Belda, J Domínguez, L Matas, M Giménez, M Caraballo, C Ramil and V Ausina. Inactivation of hepatitis B virus: evaluation of the efficacy of the disinfectant Solprogel[®] using a DNA-polymerase activity assay. *J Hosp Infect* 1997; 36: 305-312.

Inactivation of hepatitis B virus: evaluation of the efficacy of the disinfectant 'Solprogel' using a DNA-polymerase activity assay

A. Hernández, F. J. Belda, J. Domínguez, L. Matas, M. Giménez, M. Caraballo, C. Ramil and V. Ausina

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Received 18 September 1996; revised manuscript accepted 27 February 1997

Summary: The effects of sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) and Solprogel (Laboratorios Inibsa, S.A., Barcelona, Spain), a compound that contains NaDCC plus a biodegradable polymer of acrylic acid, on the activity of DNA polymerase (DNA-P) associated with hepatitis B virus in serum were evaluated. DNA-P positive and negative pools of human serum samples were used as positive and negative stock virus. Inhibition of DNA-P activity by NaDCC and the commercial product was found to be concentration-dependent. Two minutes exposure to the minimum effective concentration of NaDCC (1000 ppm available chlorine) or Solprogel 16% (960 ppm available chlorine) totally inhibited DNA-P activity.

Keywords: Sodium dichloroisocyanurate; Solprogel; DNA-polymerase; hepatitis B virus.

Introduction

The inactivation of hepatitis B virus (HBV) by disinfectants has so far only been determined *in vivo* with the chimpanzee infection assay,^{1,2} although a number of alternatives to the primate model have been suggested. The cell culture model of human hepatoma cells (HepG2 cell) for cultivation of HBV has been shown not to be appropriate because it has not been fully characterized according to Environmental Protection Agency (EPA) requirements with respect to resistance to drying, susceptibility to cytotoxicity, and production of relatively large amounts of infectious virions.³ HepG2 cells cannot be infected with complete infectious Dane particles; only a transfection with HBV DNA is possible. The duck hepatocyte method has limitations because of genetic differences between duck HBV

Correspondence to: Dr Vicente Ausina, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Ctra de Canyet s/n 08019 Badalona, Barcelona, Spain. Tel: 34-3-4651200 Fax: 34-3-3954206.

(DHBV) and human HBV (HHBV). The Morphological Alteration and Disintegration Test (MADT) is an alternative electron microscopy-based method which studies the structural integrity of the HHBV virions that remain after contact with a disinfectant.⁴ Recently, Tsiquaye and Barnard⁵ showed that total inhibition *in vitro* of hepadnavirus DNA-polymerase (DNA-P) activity by chemical disinfectants is a good predictor of infectivity *in vivo*, and proposed using an *in vitro* DNA-P assay to indicate the rate of inactivation of HBV.

New granular compounds with decontaminating and deodourizing properties have recently appeared on the market, offering alternatives to steam sterilization or incineration. One such product, Solprogel (Laboratorios Inibsa, S.A. Barcelona, Spain) comes as a dry powder that can be sprinkled onto a liquid to convert it to granulated gel containing chlorine as sodium dichloroisocyanurate (NaDCC), an organic compound containing two =N-Cl groups which hydrolyse in water to form the imino (=N-H) group and HOCl which is the active component. HOCl is also the active component of bleach solutions.

We used an assay of enzymatic activity of HBV DNA-P for the *in-vitro* determination of the optimum conditions for disinfection. Virus stock was exposed to three percentages of NaDCC in disinfectant gel (Solprogel) and to seven concentrations of NaDCC in solution, for varying times, in order to determine the lowest concentrations which completely inhibited DNA-P activity in the shortest interval.

Materials and methods

Stock virus preparations

DNA-P reactive samples were selected from the collection of HBV virus-positive human sera (HBsAg and HBeAg reactives) in the microbiology department of our hospital. Sera containing DNA-P activity were centrifuged at 40 000 *g* for 4 h at 4°C. The pellets were resuspended to give a $\times 20$ concentration of HBV in human sera. A pool of resuspended pellets was used, and will be referred to as the DNA-P reactive sample. A resuspended pellet from HBV non-reactive sera was used as a negative control.

Disinfectants

NaDCC (Delsa S.A., Barcelona, Spain) granules containing 60% available chlorine (av. Cl₂) were dissolved in sterile distilled water. According to the manufacturer, 2 g NaDCC dissolved in 120 mL water yields 10 000 ppm av. CL₂. Working solutions of NaDCC were prepared from this initial solution. A fresh dilution of disinfectant in distilled water was prepared before each use. Levels of available chlorine were calculated from the final concentrations of disinfectants in serum and disinfectant mixtures (1:1) and were 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500 and 100 ppm.

Solprogel is a dry powder containing a biodegradable polymer of acrylic acid with an empirical formula of $(C_3H_3O_2Na) 2.1 (C_3H_4O_2)$ and a large number of bonds among its hydrophilic chains. When it enters into contact with a liquid residue, the liquid is solidified by solvation of the polymer's hydrophilic groups; the compound also has a strong ability to expand and encapsulate. The powder also contains the disinfectant NaDCC, together with a substance that works on potentially infectious fluids by transforming them into a granulated gel. Formulations containing 2, 8.5 and 16% Solprogel correspond to 120, 510 and 960 ppm av. Cl_2 , respectively, when 10 g/L are used. Samples of the three different concentrations were dissolved in equal volumes of water and serum-positive or serum negative DNA-P. Available chlorine was calculated from the final concentrations of disinfectant in serum and disinfectant mixtures (1:1).

Assay of DNA polymerase (DNA-P) activity

The method used was essentially that described by Kaplan *et al.*⁶ Twenty-five microlitres of HBV virus positive human serum was mixed with 20 μ L of a freshly prepared solution containing 5% Nonidet P-40 (nonionic detergent, Boehringer Mannheim, Germany) and 1.5% 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., Poole, England). To each sample was added 100 μ L of freshly prepared reaction mixture containing 0.16 M Tris HCl (pH 7.6), 0.04 M $MgCl_2$; 0.12 M NH_4Cl , 0.5 mM of each of dATP, dCTP and dGTP (Sigma Chemical Co., Poole, England) and 1.4 μ Ci of [3H] TTP (specific activity: 47 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, England). After incubation at 37°C for 3 h, duplicate aliquots (50 μ L) of each mixture were spotted onto 2.2 cm diameter circles drawn on 3MM Whatman chromatography paper (Whatman Ltd, Maidstone, Kent, England). Each circle had already been pretreated with 50 μ L of 5% trichloroacetic acid solution containing 1% sodium pyrophosphate and dried at room temperature. The circles were again dried at room temperature. The non-trichloroacetic acid-precipitable radioactivity and other ingredients in the reaction mixture were eluted overnight by chromatography as described previously.^{7,8} After elution, the paper was dried in an oven at 50°C. Each circle was cut out into a counting vial, 4 mL scintillation fluid (Ultima GoldTM XR, Packard Instrument Co., Dowers Grove, IU, USA) was added and radioactivity counted.

Effect of disinfectant concentration on DNA-P activity

The minimum effective concentration that totally inhibited the activity of viral DNA-P of HBV preparations was determined in dose-response assays. Aliquots (25 μ L) of a range of concentrations of NaDCC were added to equal volumes of stock virus preparations and allowed to stand at room temperature for 30 min.

For treatment with Solprogel, 2 mg of each of the formulations (2, 8.5 and 16%) was added to 200 μ L of the HBV preparations and distilled water,

(1:1) and allowed to stand at room temperature for 30 min. All the samples were homogenized before dilution with distilled water to 10 mL, then centrifuged at 2500 *g* for 10 min to remove gel residues. The supernatant was centrifuged at 100 000 *g* for 4 h at 4°C. The pellet was resuspended in 200 µL of distilled water.

Normal virus-negative human serum samples treated with the same range of concentrations of disinfectant served as controls. All samples and controls were processed in duplicate.

After treatment with 20 µL of solution containing 5% Nonidet P-40 and 1.5% 2-mercaptoethanol, and 75 µL reaction mixture (0.213 M Tris HCl (pH 7.6), 0.053 M MgCl₂; 0.164 M NH₄Cl, 0.6 mM of dATP, dCTP and dGTP and 1.4 µCi of [³H] TTP) were added to 50 µL treated virus-positive and negative serum aliquots. The mixtures were kept at 37°C for 3 h. After incubation, duplicate aliquots (50 µL) of each mixture were processed for chromatography and radioactivity was counted.

DNA-P activity was expressed as the ratio (P/N) of mean counts per minute (cpm) of treated virus-positive serum (P) to mean cpm of treated virus-negative serum (N). The optimum concentrations of disinfectant which gave P/N values <2.1 were derived from dose-response plots and used as indicators of total inactivation of the virus in 30 min. DNA-P activity ratio (P/N) >2.1 defines the limits of sensitivity of the in-vitro assay. Untreated virus-positive and negative samples to which aliquots of distilled water (25 µL) were added served as controls.

Effect of time of exposure to disinfectant

To determine the minimum contact time needed for inactivation of the virus, aliquots of serum were exposed for various periods of time (2, 5, 10, 15, 20 and 30 min) to the optimum concentration of disinfectant. Minimum effective concentration of NaDCC and Solprogel was defined as that concentration which gave a P/N value <2.1 in the shortest exposure time to stock virus preparations.

Results

Disinfectant activity of NaDCC

The dose-response curves in Figures 1 and 2 show the sensitivity of HBV to inactivation by NaDCC. The decrease in DNA-P activity after the virus was in contact with the disinfectant for 30 min depended on the available chlorine. The DNA-P activity ratio for HBV exposed to 1000 ppm av. Cl₂ for 2 min was 1.28. The minimum effective concentration of available chlorine which inactivated DNA polymerase activity HBV samples after 2 min was 1000 ppm.

Disinfectant activity of Solprogel

Figure 3 shows that the decrease of HBV DNA-P activity after the virus

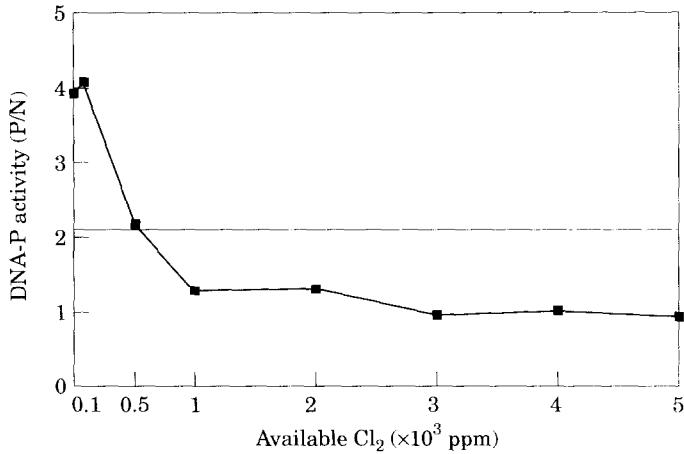


Figure 1. Dose-response effect of sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) on DNA-P at room temperature. Aliquots of stock virus were treated with different concentrations of NaDCC for 30 min. Available Cl₂ in serum refers to final concentration of NaDCC in serum/disinfectant as 1:1 mixture. P/N values are ratios of mean cpm of virus-positive to mean cpm of virus-negative serum aliquots treated similarly.

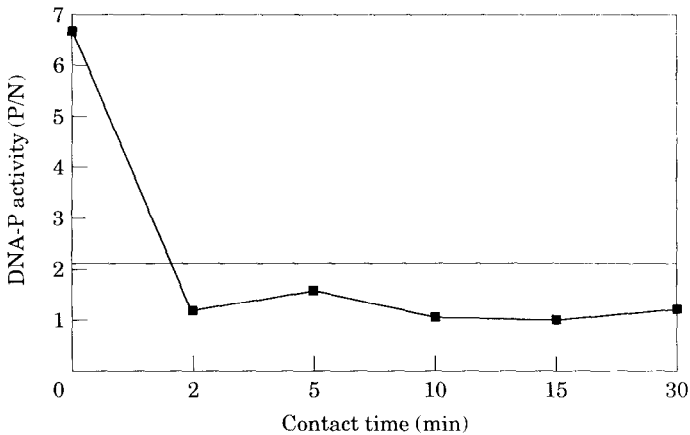


Figure 2. Effect of contact time of NaDCC on DNA-P at room temperature. Aliquots of serum sample were exposed to 1000 ppm of NaDCC for different times. Available Cl₂ in serum refers to final concentration of NaDCC in serum/disinfectant as 1:1 mixture. P/N values are ratios of mean cpm of virus-positive to mean cpm of virus-negative serum aliquots treated similarly.

was in contact with Solprogel for 30 min was also related to available chlorine. Exposure of stock virus preparations to concentrations of disinfectant showed that 960 ppm av. Cl₂ (Solprogel 16%) were required to inactivate the enzymic activity of virus. Loss of DNA-P activity occurred

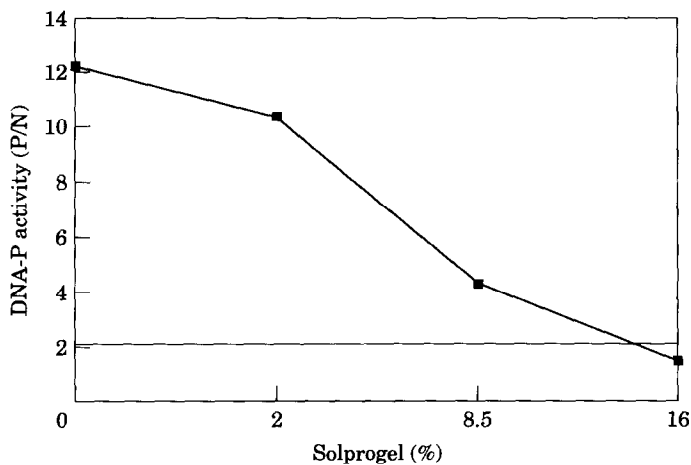


Figure 3. Effect of Solprogel, formulations (2, 8.5 and 16% of NaDCC) on DNA-P at room temperature. Aliquots of DNA-P reactive serum sample were treated for 30 min with varying percentages of NaDCC in Solprogel and tested for DNA-P activity.

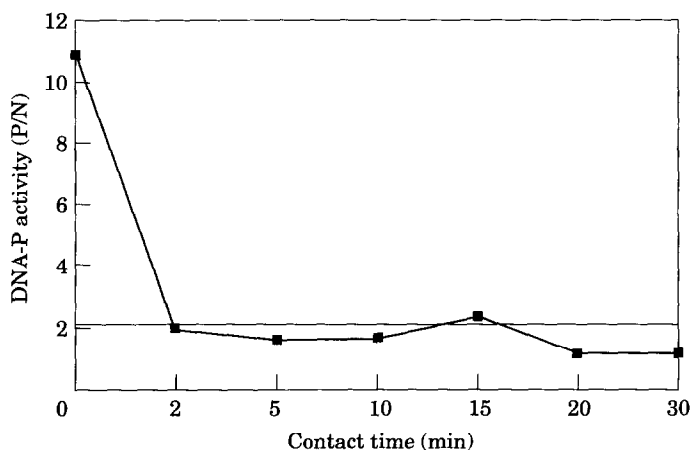


Figure 4. Effect of contact time of Solprogel 16% at room temperature. Aliquots of stock virus samples were exposed to 960 ppm av. Cl_2 for different times.

in the first 2 min when stock virus preparations were exposed to 960 ppm av. Cl_2 (Figure 4).

Discussion

The genome of hepadnaviruses is unique amongst circular double-stranded DNA viruses as it is partially single-stranded. The full-length minus strand

and the short plus strand serve as a template-primer for an active viral DNA-P to repair the gap. The formation of covalently closed circular DNA is essential for hepadnavirus replication. Since the virus DNA-P is tightly associated with the genome, inhibition of the incorporation of exogenous nucleotides during in-vitro DNA synthesis should make the native enzyme an ideal target for investigating inactivation of HBV by disinfectants. Previous studies^{5,9} have shown that the activity of the enzyme in an endogenous reaction is sensitive to inhibition by hypochlorous acid and sodium dichloroisocyanurate in a dose-response manner that is independent of duration of exposure.

In this study virus stocks with high levels of DNA-P activity were prepared from virus-positive human serum samples. Sera enriched with HBV have been used in previous inactivation studies,⁹ although plasma has also been used.⁵ In this study we did not investigate the effect of protein or organic material on inactivation. Mixtures of virus and disinfectants were incubated at 22–25°C the room temperature, at which disinfection is commonly carried out.

We studied the inhibition of HBV associated DNA-P activity by a range of concentrations of NaDCC and by three formulations of Solprogel to determine minimum concentrations effective against the virus. Our data show that the activity of the enzyme is sensitive to inhibition by NaDCC disinfectants. The minimum concentration of NaDCC needed to inactivate of HBV DNA-P was 1000 ppm av. Cl₂ in a minimum contact time of 2 min. Solprogel used at the concentration indicated by the manufacturer is effective when used as 16% NaDCC (960 ppm av. Cl₂) formulation. Nath *et al.*⁹ showed that DNA-P activity remaining after NaOCl treatment is inversely related to the available chlorine and appears to be independent of time. Only 25% of DNA-P activity was lost when available chlorine was 250 to 500 ppm and almost all inactivation occurred within the first minute. When available chlorine was 1250 ppm, only about 30% of initial DNA-P could be detected after 2 min. No residual DNA-P activity was detectable after 1 min with NaOCl equivalent to 2500 ppm av. Cl₂. On the other hand, Tsiquaye and Barnard⁵ demonstrated that NaDCC was more effective than NaOCl for inactivating HHBV, showing that 2 min exposure of minimum effective concentrations of either NaOCl (domestic bleach: 3600 ppm and industrial bleach: 3200 ppm) or NaDDC (2200 ppm av. Cl₂) to HHBV-rich plasma totally inhibited DNA-P activity.

In conclusion, we showed total inactivation of HBV DNA-P after treatment of HBV with NaDCC (1000 ppm av. Cl₂) and with Solprogel 16% (960 ppm av. Cl₂) in 2 min. Nevertheless, we believe that further studies should be performed using organic matter to fully assess the virucidal effect of Solprogel against HBV. The protein content of blood or blood components is a critical factor as the interaction of chlorine-based disinfectants with protein or organic matter can affect the efficacy of disinfection. The use of a DNA-P assay to determine DNA activity of the

viral polymerase is a good approach to evaluating disinfectant action against HBV. This in-vitro test is reproducible, easy to perform, inexpensive and allows a large number of samples to be assayed.

This work was supported by Laboratorios Inibsa, S.A.

References

1. Bond WW, Favero MS, Petersen NJJ and Ebert JW. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals. *J Clin Microbiol* 1983; **18**: 535–538.
2. Tabor E, Buynak E, Smallwood L *et al.* Inactivation of hepatitis B virus by three methods: treatment with pepsin, urea, or formalin. *J Med Virol* 1983; **1**: 1–9.
3. Bchini R, Capel F, Dauguet C *et al.* In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cell with hepatitis B virus. *J Virol* 1990; **64**: 3025–3032.
4. Prince DL, Prince HN, Thraenhart O *et al.* Methodological approaches to disinfection of human hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 1983; **31**: 3296–3304.
5. Tsiquaye KN, and Barnard J. Chemical disinfection of duck hepatitis B virus: a model for inactivation of infectivity of hepatitis B virus. *J Antimicro Chemother* 1993; **32**: 313–323.
6. Kaplan PM, Greeman RL, Gerin JL *et al.* DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; **12**(5): 995–1005.
7. Fang CT, Nath N, Pielech M and Dodd RY. A modified technique for the detection of hepatitis B virus-specific DNA polymerase. *J Virol Meths* 1981; **2**: 349–356.
8. Tsiquayc KN, McCaul TF, and Zuckerman AJ. Maternal transmission of duck hepatitis B virus in pedigree Pekin ducks. *Hepatology* 1985; **5**: 622–8.
9. Nath N, Fang CT, Dodd RY. Inactivation of DNA-polymerase associated with hepatitis B virus. *J Med Virol* 1982; **10**: 131–140.