

Evaluación de la efectividad de un desinfectante mediante el método de placas de contacto

Evaluation of the effectiveness of a disinfectant through the contact plate method

MSc. Nancy Burguet Lago,^I MSc. Lázaro C. Brito Godoy,^{II} Lic. Iván Cánovas Borges^I

^I Laboratorios Liorad. La Habana, Cuba.

^{II} Hospital Luisa C. de Gandulfo. Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Objetivo: evaluar la efectividad del desinfectante LopHene ST mediante el método de placas de contacto.

Métodos: se tomó 1 mL de la suspensión de los microorganismos de referencia (bacterias, levadura y un hongo filamentosos) y se esparció sobre una superficie de material análogo al material donde se aplica el desinfectante. En posiciones aleatorias en réplicas de tres, se realizó el muestreo de superficie con placas de contacto que contenían agar triptona soya y sabouraud dextrosa agar, más neutralizante. Se incubaron a 32 ± 2 °C de 3 a 5 días y 22 ± 2 °C de 5 a 7 días, según tipo de microorganismo a ensayar. Se contaron las unidades formadoras de colonias en las placas (control positivo). Sobre una superficie de igual dimensión, se aplicó el desinfectante preparado (concentración: 4 %) con 10 min de exposición. Se procedió de igual manera que con el control positivo, se tomó como criterio de aceptación una reducción del número de microorganismos en al menos 3 logaritmos.

Resultados: los tres lotes evaluados mostraron que el desinfectante redujo la concentración de las bacterias en un rango de 4,60 a 7,20 logaritmos. Para la levadura la reducción fue de 4,70 a 5,40 logaritmos y para el hongo filamentosos ensayado los valores estuvieron entre 4,10 y 5,50 logaritmos.

Conclusiones: el desinfectante LopHene ST es eficaz frente a las cepas de microorganismos ensayadas en el tiempo evaluado y a la concentración probada; con esto se confirma su capacidad bactericida y fungicida bajo las condiciones estudiadas. Además se demuestra que el método empleado resulta válido para el análisis de la efectividad de los lotes de desinfectante evaluado, al mostrar la reducción de las colonias.

Palabras clave: desinfectantes, placas de contacto, microorganismos de referencias.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the effectiveness of disinfectant LopHene ST by contact plates method.

Methods: one ml of the suspension of reference microorganisms (bacteria, yeast and a filamentous fungus) was taken and spread over a surface made of a material similar to that in which the disinfectant was applied. At random positions and in three replications, the surface was sampled by the contact plates method containing Tryptone Soy Agar and Sabouraud Dextrose Agar plus neutralizing substance.

Microorganisms were incubated at 32 ± 2 °C for 3 to 5 days and at 22 ± 2 °C for 5 to 7 days, depending on the type of microorganism to be tested. Colony-forming unit on the plates (positive control) were counted, then the prepared disinfectant (4 % concentration) was used over an equal sized area during 10 minutes. The procedure was exactly the same as in the positive control; a reduction of the number of microorganisms by at least 3 logarithms, was adopted as acceptance criteria.

Results: the disinfectant reduced the bacterial concentration in a range from 4.60 to 7.20 logarithms for the three tested batches. In the case of yeast, reduction was 4.70 to 5.40 logarithms and for the filamentous fungus, the reduction ranged from 4.10 to 5.50 logarithms.

Conclusions: LopHene ST disinfectant is effective for the tested microorganism strains in the evaluated time lapse and at the tested concentration. This confirms the bactericidal and fungicidal capacity of this product under the studied conditions. It was also shown that the method is valid for the analysis of effectiveness of the evaluated disinfectant batches since the colonies were reduced.

Key words: disinfectants, contact plates, reference microorganisms.

INTRODUCCIÓN

A pesar de numerosos procedimientos y tecnologías de avanzada dirigidos a la producción de fármacos que aseguren la no presencia de partículas extrañas en ellos, y aun cuando el empleo de tecnologías garantiza un ambiente de trabajo con niveles de partículas muy bajos y los materiales que se emplean cuentan con una preparación óptima, es detectada la aparición de partículas.¹ Es por esta razón que la rotación de desinfectantes en áreas de laboratorio con el objetivo de evitar generación de tolerancias en la microbiota contaminante es de amplio conocimiento y utilización. La limpieza y desinfección centra su atención sobre aquellas superficies que contactan directamente con el producto fabricado.^{2,3}

La resistencia microbiana es considerada como la pérdida de sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. Este hecho involucra necesariamente la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo que se transmite a sus descendientes, los que por este motivo resultan también insensibles al antimicrobiano en cuestión.⁴ La resistencia microbiana constituye un problema en áreas donde se realizan producciones de parenterales, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes desinfectantes, siempre más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados de modo habitual en los programas de rotación de desinfectantes.^{5,6}

El propósito fundamental de la rotación es para evitar la selección de organismos resistentes, debido a la capacidad de los microorganismos de adaptarse a los agentes bactericidas o bacteriostáticos.^{7,8} Además, no todas las bacterias son susceptibles a ser atacadas por los desinfectantes por sus características morfológicas.^{9,10} Por tanto, los desinfectantes constituyen un arma eficaz en la lucha y prevención de la contaminación causada por microorganismos.¹¹ Son productos químicos capaces de inhibir o destruir microorganismos presentes sobre objetos inanimados y/o superficies.¹² Su eficacia depende de los factores tales como tipo de desinfectante, pH del medio, presencia de materia orgánica y naturaleza de los microorganismos.¹³ Las áreas limpias deben mantenerse de conformidad con normas apropiadas de limpieza. Además, los requisitos para el procesamiento aséptico incluyen: pisos, paredes y techo fáciles de limpiar, con superficies lisas y no porosas; control de temperatura, humedad y partículas, y procedimientos de limpieza y desinfección que provean y mantengan las condiciones asépticas.¹⁴

Existen numerosos agentes de limpieza y desinfectantes. En la tabla 1 se exponen los más comunes con sus mecanismos de acción sobre los microorganismos, y sus aplicaciones.

Tabla 1. Desinfectantes más comunes, mecanismos de acción y usos¹⁹

Agente químico	Acción	Usos
Etanol (50-70 %)	Altera y precipita las proteínas del microorganismo	Antiséptico de aplicación tópica
Isopropanol (50-70 %)	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico de aplicación tópica
Formaldehído (8 %)	Reacciona con grupos-NH ₂ , -SH y -COOH	Desinfectante, mata endoesporas
Tintura de yodo (2 %, I ₂ en 70 % alcohol)	Inactiva proteínas	Antiséptico usado en piel
Cloro (Cl ₂) gas o derivados como hipoclorito de sodio (lavandina)	Forma ácido hipocloroso (HClO), un fuerte agente oxidante	Desinfección en general y en particular para agua potable
Nitrato de plata (AgNO ₃)	Precipita proteínas	Antiséptico general y usado en ojos de recién nacidos
Cloruro de mercurio o timerosal	Inactiva proteínas por reacción con los grupos sulfuro	Desinfectante. En ocasiones usado como componente en antisépticos para piel
Detergentes (ej. amonios cuaternarios) Germekil, TEGO 51	Ruptura de membranas celulares	Desinfectantes y antiséptico de piel
Compuestos fenólicos (ej. hexilresorcinol, hexaclorofenol)	Desnaturalizan proteínas y rompen las membranas celulares	Antisépticos a bajas concentraciones, desinfectantes a altas concentraciones
Óxido de etileno (gas)	Agente alquilante	Desinfectante usado para esterilizar objetos sensibles al calor como goma y plásticos

En el mercado se comercializa para la limpieza y desinfección de áreas clases el desinfectante LopHene ST, que contiene en su composición compuestos de cloro (desinfectante universal, más antiguo y utilizado de los derivados clorados, eficaz frente a todos los microorganismos; inhibe las reacciones enzimáticas y desnaturaliza las proteínas),¹⁵ fenólicos, por lo que posee un amplio espectro de actividad frente a las bacterias, virus, hongos y micobacterias; mientras que su actividad esporicida es mínima. Actúa de forma específica sobre la membrana celular e inactiva las enzimas intracitoplasmáticas, lo que hace que formen complejos inestables.¹⁶ Los grupos alcohólicos como parte de su mecanismo de acción destruyen la membrana celular y desnaturalizan las proteínas, presentan actividad antimicrobiana y sirven de solvente de otros productos, entre ellos muchos antisépticos y desinfectantes, lo que potencia su actividad.^{17,18}

La gran problemática existente en la industria farmacéutica frente al control de la contaminación microbiana, y la selección mas apropiada de antisépticos y desinfectantes conlleva a implementar métodos válidos y eficientes para evaluar la eficacia de estos compuestos.¹⁹ Es objetivo de este trabajo evaluar la efectividad del desinfectante LopHene ST mediante el método de placas de contacto.

MÉTODOS

La evaluación de la efectividad de un desinfectante es de suma importancia para establecer su rotación.² Existen varios métodos para comprobar su eficacia, entre los que se pueden mencionar el de diluciones seriadas, la filtración por membrana y el método de placas de contacto.¹⁹ Este último se empleó en este trabajo para evaluar la efectividad de un desinfectante indicado para la limpieza y desinfección de laboratorios farmacéuticos.

Método de placa por contacto, RODAC

El control microbiológico de superficie nos proporciona información sobre la cantidad de microorganismos presentes sobre una superficie. Este método generalmente se utiliza para determinar la calidad microbiológica de superficies planas e impermeables, se recomienda para obtener datos cuantitativos. Idealmente la placa se debe utilizar sobre superficies que han sido previamente sometidas a limpieza y desinfección, ya que en lugares con un alto grado de contaminación, resultará un crecimiento masivo en las placas que dificultará el recuento.^{4,8}

Laboratorios Decon, Inc. fue el proveedor del desinfectante. LopHene ST. Es un concentrado multifenólico, que contiene como parte de su composición compuestos de cloro y grupos alcohólicos. Controla un espectro ancho de organismos patógenos, presenta un pH bajo, tiene gran efecto sobre cualquier tipo de superficie sin dejar interferencia de residuos en un tiempo de exposición de 10 min.

En el presente trabajo se evaluó la actividad microbicida a tres lotes de este desinfectante. Para ello se utilizaron réplicas de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404, mantenidas en el banco de trabajo del laboratorio por congelación a -70 °C en leche descremada al 20 %.⁴

Las suspensiones de microorganismos se obtuvieron a partir de un vial del *stock* de las cepas, que se sembraron con hisopos estériles en forma de césped en placas que contenían medio de cultivo triptona soya agar (TSA) para bacterias y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) para hongos y levaduras; se incubaron por un periodo de 18 a 24 h a temperatura de 30 °C a 35 °C el TSA y de 24 a 48 h a temperatura de 20 °C a 25 °C el SDA; transcurrido el periodo de incubación se colectó la biomasa con un hisopo estéril y se transfirió a un tubo que contenía 3 mL de solución salina peptonada; se agitó en vortex para homogeneizar y se procedió a leer en el espectrofotómetro a 620 nm hasta ajustar a un recuento inicial de 1×10^8 UFC/mL.

Desarrollo del método

Se tomó 1 mL de la suspensión de los microorganismos y se esparció sobre una superficie de 25 cm × 25 cm de material análogo al material donde se aplica el desinfectante. En posiciones aleatorias en réplicas de tres por cada medio se realizó el muestreo de superficie con placas RODAC listas para su uso de la casa comercial Liofilchem de Italia; estas placas contenían TSA y SDA, más neutralizante. Se procedió a su incubación según tiempo y temperatura indicada para cada medio (32 ± 2 °C y 22 ± 2 °C respectivamente). Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las UFC en las placas. Se procedió a calcular la media y se multiplicó por el factor de dilución, considerándose como control positivo. Los resultados se expresaron en UFC/mL.

Sobre una superficie de igual dimensión se aplicó el desinfectante preparado según instrucciones del fabricante, concentración del 4 %-10 min de exposición. Se procedió de igual manera que para el control positivo.⁸

Criterios de aceptación: actividad bactericida y/o fungicida si el producto tiene la capacidad de reducir la concentración de los microorganismos testados en al menos 3 logaritmos.

Se realizaron los cálculos de: reducción logarítmica empleando la fórmula.

$$\text{Red Log} = \text{Log } [N_0] - \text{Log } [N]$$

donde:

N_0 : número de bacterias recuperadas sin exponer

N: número de bacterias recuperadas luego de la exposición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados de la evaluación de la eficacia microbicida de los lotes del desinfectante diluidos al 4 % y evaluados en superficies tratadas por 10 min de contacto (concentración y tiempo previsto de acuerdo con las instrucciones del fabricante) frente a suspensiones de cepas de referencias.

Se evidenció que el método de placas de contacto empleado resultó válido para la evaluación de la efectividad de los lotes del desinfectante. Las placas RODAC recuperaron las UFC al tiempo cero y a los 10 min de exposición, lo que mostró la reducción de las colonias crecidas. Un resultado similar a este se obtuvo al emplear este método por parte de los autores para evaluar la efectividad de un desinfectante indicado para la desinfección de superficies críticas.⁸

Tabla 2. Eficacia microbicida de los lotes de desinfectante frente a suspensiones de cepas de referencias bacterianas

Microorganismos	Tiempo de contacto y concentración testada		
	Concentración 4 %		
	0 min	10 min	Reducción logarítmica
	Microorganismos recuperados (UFC/mL)	Microorganismos recuperados (UFC/mL)	Log [No] - log [N]
Lote 1			
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,9 \times 10^8$	$5,9 \times 10^3$	4,82
<i>Bacillus subtilis</i>	$9,3 \times 10^8$	$6,0 \times 10^1$	7,19
<i>Escherichia coli</i>	$1,6 \times 10^8$	$2,9 \times 10^3$	5,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^3$	4,64
Lote 2			
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4,1 \times 10^8$	$3,9 \times 10^3$	5,02
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^3$	5,15
<i>Escherichia coli</i>	$1,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^3$	5,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^3$	5,22
Lote 3			
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^3$	5,24
<i>Bacillus subtilis</i>	$1,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^3$	5,25
<i>Escherichia coli</i>	$3,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^3$	5,39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^2$	6,12

Tabla 3. Evaluación de la actividad fungicida de tres lotes de desinfectante frente a suspensiones de cepas de referencias

Microorganismos	Tiempo de contacto y concentración testada		
	Concentración 4 %		
	0 min	10 min	Reducción logarítmica
	Microorganismos recuperados (UFC/mL)	Microorganismos recuperados (UFC/mL)	log[No]-log[N]
Lote 1			
<i>Candida albicans</i>	$1,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^2$	4,74
<i>Aspergillus niger</i>	$2,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^3$	4,12
Lote 2			
<i>Candida albicans</i>	$3,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^2$	5,24
<i>Aspergillus niger</i>	$2,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^2$	5,27
Lote 3			
<i>Candida albicans</i>	$6,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^2$	5,39
<i>Aspergillus niger</i>	$5,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^2$	5,46

El análisis de los resultados que se presentan en la tabla 2 corroboran la capacidad de los lotes a prueba de reducir la concentración de las cepas bacterianas al mostrar en todos los casos valores de reducción por encima de 3,0 logaritmo (criterio de aceptación establecido), por lo que se puede plantear que el desinfectante muestra actividad bactericida.^{15,16}

En la tabla 3 se evidencia que el desinfectante posee también actividad fungicida, al lograr una reducción logarítmica frente a suspensiones de *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.¹⁷

Los resultados muestran que el desinfectante objeto de estudio es eficaz frente a las cepas de microorganismos ensayadas. Esto se debe a que en su composición presenta compuestos de cloro, el cual tiene como mecanismo de acción inhibir enzimas esenciales, al oxidar los grupos tiol (S-H).¹⁵ También puede producir cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Un resultado similar a este fue informado por *Echeverri* en el 2007 al evaluar la cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en la industria farmacéutica, en el que se logró evidenciar que los microorganismos probados eran susceptibles a la acción del cloro.¹⁸

Es necesario evaluar a los desinfectantes de forma periódica y frente a diferentes tipos de retos (carga microbiana presente en el área), para detectar a tiempo la presencia de nuevos agentes microbianos mutantes y/o comprobar frente a ellos su eficacia a fin de valorar la necesidad de realizar o no su rotación. Mientras un desinfectante se desempeña de manera eficaz, no procede su rotación.^{2,3}

El desinfectante LopHene ST es eficaz frente a las cepas de microorganismos ensayadas en el tiempo evaluado (10 min de contacto) y a la concentración probada (4 % diluido); con esto se demuestra su capacidad bactericida y fungicida en las condiciones estudiadas.

Se demostró que el método de placas de contacto empleado resultó válido para la evaluación de la efectividad de los lotes del desinfectante, al mostrar la reducción de las colonias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buenas prácticas para la fabricación de ingredientes farmacéuticos activos. Anexo No. 09. Resolución No.03/06 y Regulación No.16-2006. Directrices sobre Buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos. Ámbito regulador: Órgano Oficial Regulatorio. 2006 noviembre;6(Supl Especial):1-16. Disponible en: http://www.cecmed.sld.cu/Docs/Pubs/AmbReg/2006/AmbReg_SENov_06.pdf
2. Riera L, Botlale A, Savedra M, Ambrosio A. Importancia del establecimiento de programas de limpieza y desinfección en áreas donde se requiere un bajo nivel de contaminación. *Pharmaceutical Technology* (Edición Sudamericana). 2007; No. 86.
3. Russell AD. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. Russell AD. Hugo WB. Ayliffe GAJ. *Editions Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1992. p. 89-113.
4. Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2005;43(3):1-7.
5. Rossi L. Áreas limpias [tesis]. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 1998.
6. De Rossi L, Clavell L. Área limpias [tesis]. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2000.

7. Carlberg D. Cleanroom Microbiology for the Non Microbiologist. Illinois: Interpharm Press; 1995.
8. Burguet N, Cánovas I. Desinfección segura en laboratorios farmacéuticos. Evaluación de la efectividad del desinfectante NDP superficies críticas. Pharmaceutical Technology (Edición Sudamérica). 2011; No. 110:40-6.
9. NTP 429: Desinfectantes: características y usos más corrientes. Madrid: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 1997.
10. The Pharmacopeia of the United States of America. Cap 1116. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments. 31 ed. Rockville: Marc Printing; 2008.
11. Desinfectantes y antisépticos <1072>. USP 30. (Versión en español). Rockville: Marc Printing; 2007. p. 554
12. Sánchez-Saldaña L, Sáenz Anduaga E. Antisépticos y desinfectantes. Dermatología Peruana. 2005;2005;15(2):82-107.
13. The United States Pharmacopeia. 30th edition. The National Formulary 25th edition. USP30-NF25. Rockville: Mack Printing; 2007.
14. Riera L, Botlale A, Savedra M, Ambrosio A. Evaluación de la estabilidad de un amonio cuaternario. Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos. 1^{er} Congreso Argentino de Microbiología de Medicamentos. Buenos Aires; 2005.
15. Henao S. Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Medicina. 2003;51(3):136-42.
16. Shamil M. Studies on the evaluation of preservative efficacy V. Effect of concentration of microorganisms on the antimicrobial activity of phenol. Intern J Pharm. 1990;60(2):147-50.
17. Terleckyj B, Axler DA. Quantitative assay of fungicidal activity of disinfectants. Antimicrobial Agents Chemother. 1987;31(5):7948.
18. Echeverri LC, Cifuentes GC, Granado JM, Arias J, Fernández C. Cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en Industria farmacéutica. Rev Cubana Farm [Internet]. 2007 [citado 20 Oct 2012];41(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152007000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
19. Clavell L, Pedrique de Aulacio M. Microbiología. Manual de métodos generales. 2da ed. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 1992.

Recibido: 27 de diciembre de 2012.

Aprobado: 30 de enero de 2013.

Nancy Burguet Lago. Laboratorios Liorad. Ave. 27 A No. 26402 °/ 264 y 268, Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: nburguet@liorad.quimefa.cu