



Especialización en Esterilización Año 2019

Análisis de la actividad bactericida de algunas marcas comerciales de glutaraldehído y orto-ftalaldehído sobre células planctónicas y biofilms de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*: bacterias aisladas frecuentemente en Servicios de Endoscopia Digestiva

Alumno

Farm. Palacios Faiad, Juan Pablo.

Tutores

Dra. Aiassa, Virginia.

Farm. Esp. González, Fernando D.

Dedicatoria y agradecimientos

De principio a fin, a mis compañeros, colegas, amigos y profesores. Ellos contribuyeron a mi crecimiento profesional y humano.

A mi familia, por haberme enseñado que la vida es bella si nos animamos a descubrirla cada día más y por haberse permitido dejarme ir de su cercanía física.

A Anita, por su amor incondicional.

Índice

Resumen.....	4
1. Introducción.....	6
1.1. El endoscopio.....	6
1.2. Productos médicos: Clasificación, limpieza, desinfección, esterilización e implicancias.....	8
1.3. Biofilm.....	11
1.4. Desinfectantes	13
1.4.1. Glutaraldehído (GLU).....	13
1.4.2. Orto-ftalaldehído (OPA).....	14
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo general.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. Materiales y métodos.....	16
3.1. Reactivos y cepas.....	16
3.2. Efecto de los desinfectantes en células planctónicas.....	17
3.2.1. Suspensión bacteriana.....	17
3.2.2. Evaluación del efecto de los desinfectantes en células planctónicas.....	18
3.2.3. Formación de biofilms y tratamientos.....	19
3.2.4. Ensayo XTT cuantificación de viabilidad celular.....	20
3.2.5. Análisis estadístico.....	21
4. Resultados e interpretación.....	22
4.1. Eficacia bactericida de los desinfectantes en estudio sobre los cultivos planctónicos.....	22
4.2. Ensayo de la eficacia bactericida de los desinfectantes sobre los biofilms.....	23
5. Discusión y conclusión.....	26
6. Bibliografía.....	28

Resumen

La endoscopia es una técnica médica moderna utilizada para una gran diversidad de procedimientos con finalidad preventiva, de diagnóstico y de tratamiento. Para los mencionados procedimientos se utiliza el instrumento médico conocido como endoscopio, categorizado *material semi-crítico* según la clasificación de Spaulding, requiriendo de esterilización, o al menos, una desinfección de alto nivel (DAN). La DAN es la completa eliminación de microorganismos vegetativos a excepción de algunas esporas bacterianas.

En Estados Unidos, los dos desinfectantes más utilizados para el reprocesamiento de los endoscopios son el glutaraldehído y el ácido peracético. La Sociedad Americana de Endoscopia Gastrointestinal, recomiendan el uso de soluciones de glutaraldehído sin surfactante debido a que complica el enjuague.

Actualmente, el desinfectante orto-ftalaldehído está quitándole protagonismo al glutaraldehído porque tiene unas cuantas ventajas sobre el mismo (no irrita los ojos ni las fosas nasales, no requiere activación y el tiempo de contacto necesario para la DAN es menor).

El correcto lavado siempre debe preceder a la esterilización o a la DAN. Una falla en el lavado y enjuague puede resultar en una falla del proceso de esterilización o desinfección, produciendo así un riesgo de infección para el resto de los pacientes o incluso dar lugar a la aparición de un brote infeccioso.

Además, no proceder de la manera correcta favorece la formación de biofilms dentro de los canales del endoscopio.

El término biofilm, o biopelícula, hace referencia a los microorganismos que tiene la capacidad de adherirse y acumularse en superficies de distinta naturaleza donde forman verdaderos ecosistemas, comunidades sésiles, sedentarias, con una estructura arquitectónica particular que les confiere una gran resistencia a ataques externos de distintos tipos de agentes (como, por ejemplo, los desinfectantes).

La experiencia como farmacéutico de hospital vivida en distintas instituciones de salud y la observación constante en pos de buscar mejoras en todos los procesos sobre los que interviene el profesional farmacéutico, despertó la duda sobre el reprocesamiento de endoscopios; puntualmente la pregunta que surge es: ¿qué encontramos si los procedimientos sugeridos por los fabricantes de los desinfectantes no se implementan correctamente?

El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad bactericida de 2 (dos) marcas de glutaraldehído y 2 (dos) marcas de orto-ftalaldehído comercializadas en Argentina sobre células planctónicas y biofilms de bacterias clínicamente relevantes para el Servicio de Endoscopia Digestiva a distinta concentración y a distinto tiempo de uso.

El número de bacterias viables se determinó por triplicado mediante el “*drop plate method*” de acuerdo al método descrito por Naghili y col. Para la interpretación de los resultados se utilizó el método de suspensión cuantitativa de la Unión Europea descrito en la norma BS-EN-1276. Se formaron biofilms para realizar los mismos tratamientos que se aplicaron sobre las células planctónicas. Una vez tratados se evaluó el efecto de los desinfectantes sobre el biofilm mediante el ensayo de viabilidad celular con XTT.

Se realizó una estadística descriptiva (media y desviación estándar) de los valores obtenidos en cada ensayo.

Los resultados demostraron que todos los tratamientos con los desinfectantes utilizados erradicaron el 100 % del inóculo bacteriano de las dos cepas bajo estudio (*Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) en estado planctónico.

En cuanto a los tratamientos aplicados sobre el biofilm de ambas cepas, ningún desinfectante resultó ser totalmente eficaz al momento de erradicar esta estructura de resistencia.

Se concluye que la mejora continua y la actualización permanente de los protocolos y procedimientos, tanto de limpieza como de desinfección es primordial para garantizar la seguridad del paciente.

1. Introducción

La endoscopía es una técnica médica moderna utilizada para una gran diversidad de procedimientos con finalidad preventiva, de diagnóstico y de tratamiento (1). Para los mencionados procedimientos se utiliza el instrumento médico conocido como endoscopio (Figura 1).



Figura 1. Endoscopio semi-flexible.

1.1. El endoscopio

Un endoscopio (*endo-* adentro, *-scopio* mirar) es un instrumento (equipo o producto médico) que se utiliza para mirar dentro del cuerpo. Los endoscopios pueden cambiar su constitución básica según el modelo y finalidad con la que se fabrica y pueden ingresar al organismo a través de un orificio natural (como por ejemplo la boca, ano, uretra) o a través de una incisión quirúrgica (como, por ejemplo, en las artroscopias).

Este dispositivo reúne las siguientes características:

- Tiene forma de tubo.
- Puede ser rígido o semi-flexible según el material del que esté fabricado, lo que le puede otorgar termo-resistencia.
- Son productos médicos **REUTILIZABLES**.

El mismo consta de diversas secciones y accesorios para su total funcionamiento (Figura 2):

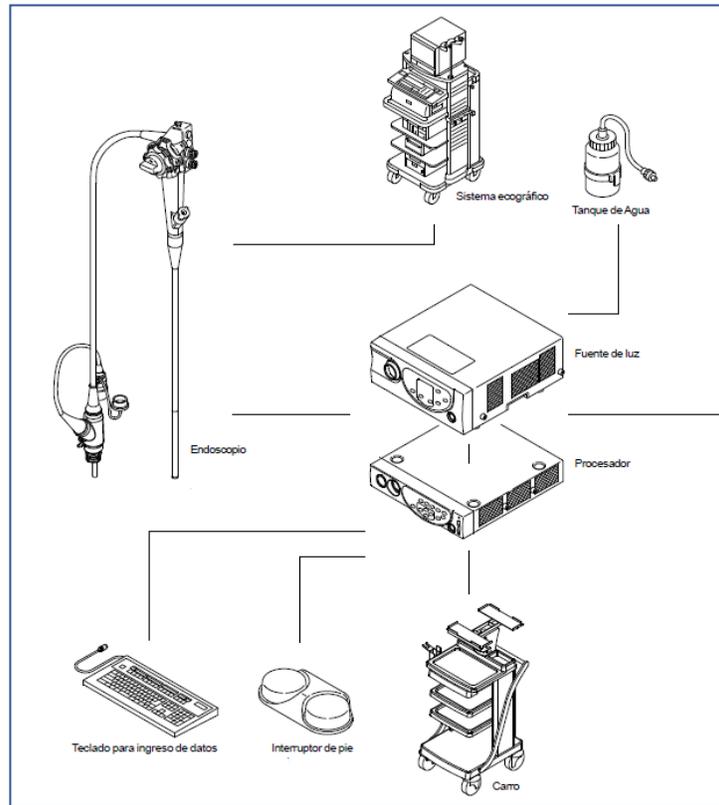


Figura 2. Endoscopio y sistema ecográfico.

- Parte de inserción en el paciente: Se inserta en las cavidades del cuerpo y contiene el extremo distal, la parte curva y la flexible:
 - Extremo distal: Contiene el lente objetivo, las boquillas de aire/agua, el conducto de fórceps, etc. El suministro de aire, agua y aspiración se controla con los botones de la parte de control (Figura 3).

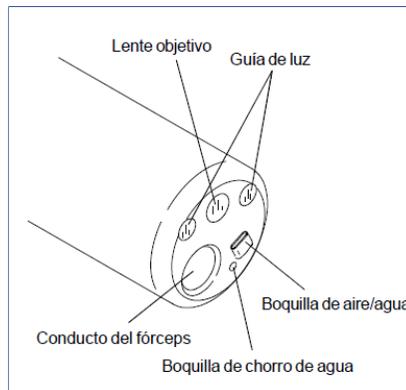


Figura 3: Extremo distal (Sección de inserción al paciente).

- De conexión a la fuente de luz.
- De mando o control del dispositivo (Figura 4).
- Conector al procesador de video.

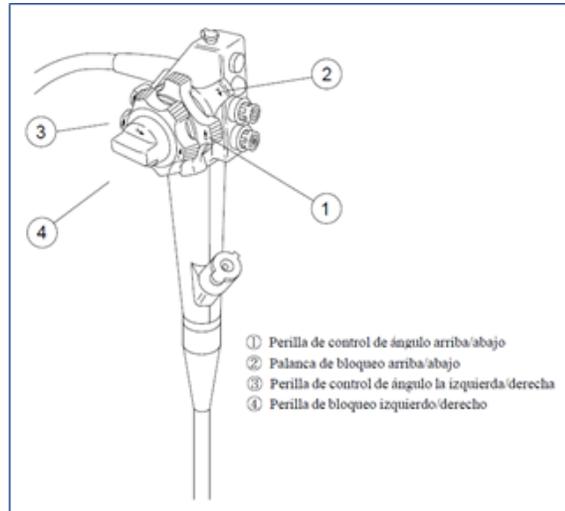


Figura 4. Control de mando.

Estas secciones forman entonces un sistema que ilumina el órgano o la cavidad que se desea inspeccionar con un conjunto de lentes para la visión (cámara) que entrega la imagen en un monitor y un canal extra que permite la entrada de instrumental quirúrgico. (1)

1.2. Productos médicos: Clasificación, limpieza, desinfección, esterilización e implicancias

Hace unos 35 años atrás, Earle Spaulding ideó una clasificación para decidir si los equipos o productos biomédicos debían desinfectarse o esterilizarse. Las categorías de la clasificación dependen del nivel de riesgo de infección que trae aparejado el uso de estos productos y son: material crítico (entra en contacto con cavidades o tejidos estériles incluyendo el sistema vascular), material semi-crítico (entra en contacto con mucosas o piel no intacta) y material no crítico (entra en contacto con piel intacta) (2).

En general, los endoscopios son considerados como material semi-crítico, requiriendo de esterilización, o al menos, una desinfección de alto nivel (DAN). La DAN es la completa eliminación de microorganismos vegetativos a excepción de algunas esporas bacterianas. Sin embargo, otros endoscopios, por ejemplo, los empleados en artroscopia o laparoscopia, requerirían esterilización como única alternativa para su reprocesamiento (2).

Estudios han demostrado que los endoscopios flexibles, luego de su uso, poseen una carga bacteriana que van desde 10^5 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) y hasta 10^{10} UFC/mL en los canales de succión (2).

En Estados Unidos, los dos desinfectantes más utilizados para el reprocesamiento de los endoscopios son el glutaraldehído y el ácido peracético. La Sociedad Americana de Endoscopia Gastrointestinal (American Society for Gastrointestinal Endoscopy -ASGE-), recomienda el uso de soluciones de glutaraldehído sin surfactante debido a que complica el enjuague.

Actualmente, el desinfectante orto-ftalaldehído está quitándole protagonismo al glutaraldehído porque tiene unas cuantas ventajas sobre el mismo siendo las más relevantes: no irrita los ojos ni las fosas nasales, no requiere activación y el tiempo de contacto necesario para la DAN es menor (2).

Los endoscopios semi-flexibles son particularmente difíciles de lavar, enjuagar, secar, desinfectar o esterilizar debido a su intrincado diseño tecnológico y a que están fabricados con materiales delicados (Figura 5). Generalmente, los endoscopios flexibles no pueden reprocesarse por el método de esterilización por calor húmedo y tampoco por el método que utiliza óxido de etileno, porque los ciclos son muy largos, y los procedimientos se realizan uno tras otro en la práctica clínica.

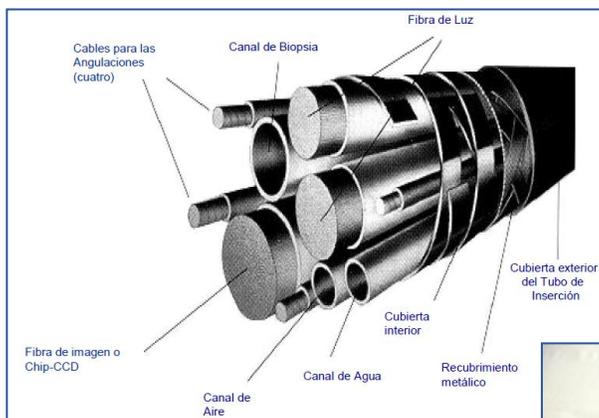


Figura 5. Arriba: Diseño interior del tubo de inserción. derecha: interior del control de mando.

El correcto lavado siempre debe preceder a la esterilización o a la DAN. Una falla en el lavado y enjuague puede resultar en una falla del proceso de esterilización o desinfección, produciendo así un riesgo de infección para el resto de los pacientes o incluso dar lugar a la aparición de un brote infeccioso. Estudios con virus de la hepatitis B, con virus de la inmunodeficiencia humana y con *Helicobacter pylori* demuestran la importancia de lo mencionado (2).

Además, no proceder de la manera correcta favorece la formación de biofilms dentro de los canales del endoscopio (2).

Otros estudios han demostrado que efectivamente se producen infecciones asociadas a la endoscopia. Clínicamente, las consecuencias van desde una colonización asintomática hasta la muerte inclusive. En relación a la endoscopia digestiva, se han encontrado infecciones producidas de manera repetitiva por distintas especies de *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias atípicas y nuevamente *P. aeruginosa* fueron causa de infecciones transmitidas en endoscopías broncoscópicas. Entre las probables razones que dan origen a estas infecciones, se encuentran la incorrecta limpieza, la inadecuada selección del agente desinfectante, el no cumplimiento de las condiciones indicadas por el fabricante para que el agente desinfectante cumpla su cometido, la utilización incorrecta de los equipos de reprocesamiento automático e incluso la falta de educación o falta de guías y procedimientos para el personal que está a cargo de estas tareas (2).

Por lo expuesto, el personal a cargo de los procedimientos de lavado, desinfección o esterilización debe estar altamente entrenado y capacitado para evitar todo riesgo asociado al uso y reprocesamiento de este tipo de productos médicos, siguiendo normativas como así también protocolos e instructivos establecidos por las instituciones los cuales deben ser evaluados, con una frecuencia mínima de una vez al año.

Las infecciones asociadas a endoscopia se pueden clasificar en endógenas y exógenas. Las más comunes son las endógenas, es decir, aquellas infecciones que resultan de la propia flora del paciente, siendo las bacterias mayoritariamente aisladas *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., y *Enterococcus* spp. Algunos ejemplos de infecciones endógenas incluyen neumonía debido a la aspiración de flora oral debido a la sedación del paciente durante una broncoscopia. Otro ejemplo es la bacteriemia en pacientes con obstrucción biliar, producto de la colangiopancreatografía retrógrada. De cualquier forma, este tipo de infecciones no tienen que

ver con el reprocesamiento en sí de los endoscopios. Por su parte, en las infecciones exógenas están involucrados otros microorganismos y los más frecuentemente aislados son *P. aeruginosa* y también *Salmonella* spp. en los procedimientos de endoscopia digestiva, mientras que en las broncoscopías se aíslan *P. aeruginosa* y micobacterias. La inadecuada limpieza, enjuague, secado, desinfección y/o esterilización, promueve la transmisión de los microorganismos de un paciente a otro. La forma de prevenir estas infecciones es a través de la implementación y cumplimiento de estrictos protocolos de reprocesamiento (2, 3, 4).

La evidencia demuestra que la incidencia de infecciones asociadas a endoscopios es relativamente baja. Sin embargo, se ha logrado demostrar también que las bacterias tienen capacidad de formar biofilms en los canales de estos instrumentos y que, si no son correctamente tratados luego de su uso, pueden producir infecciones exógenas (5).

1.3. Biofilm

Las bacterias son organismos unicelulares, individuales, que existen en un estado libre, también conocido como estado planctónico. Alrededor del año 1995, Costerton y colaboradores introdujeron un término biofilm (biopelícula), que hace referencia a que estos microorganismos también se adhieren y se acumulan en superficies de distinta naturaleza donde forman verdaderos ecosistemas, comunidades sésiles, sedentarias, entre bacterias de diferentes géneros e incluso con otros tipos de microorganismos, como por ejemplo hongos. Estas superficies pueden incluir desde piedras en un río, tejidos vivos de plantas o la dentadura de animales hasta biomateriales con los que se fabrican productos médicos como implantes, catéteres urinarios y los ya mencionados endoscopios. Estos ecosistemas son altamente complejos y poseen todas las propiedades características de una comunidad de seres vivos que incluye comunicación, intercambio de sustratos, distribución y redistribución de metabolitos y la eliminación de productos finales del metabolismo. Un biofilm contiene entre 10 a 20 % de células. El resto corresponde a la matriz extracelular constituida por proteínas estructurales y polisacáridos extracelulares. En esta comunidad los microorganismos establecen relaciones íntimas e incluso de dependencia. Los microorganismos “habitantes” se comunican a través de señales químicas, proceso conocido como *quorum sensing* y así se regula la expresión de genes, distintos al de las células planctónicas, que responden a la formación del biofilm y su propagación.

Si bien cada especie tiene sus particularidades, en general los biofilms se forman en cinco etapas: la primera es la adhesión reversible inicial a una superficie (1º), la segunda es la unión irreversible (2º), la tercera y cuarta etapa son de maduración (3º – 4º) y la quinta etapa es dispersión (5º) como se muestra en la Figura 6 (6).

Aún más allá, los biofilms poseen una estructura arquitectónica particular que le confiere gran resistencia a los ataques externos de, por ejemplo, agentes antibióticos, desinfectantes, radiación e incluso del sistema inmunológico. En la Figura 7 se observan dos fotos. A la izquierda *P. aeruginosa* vegetativas (planctónicas) y a la derecha, la estructura arquitectónica de su biofilm con canales de agua en la matriz extracelular de polisacáridos (7).

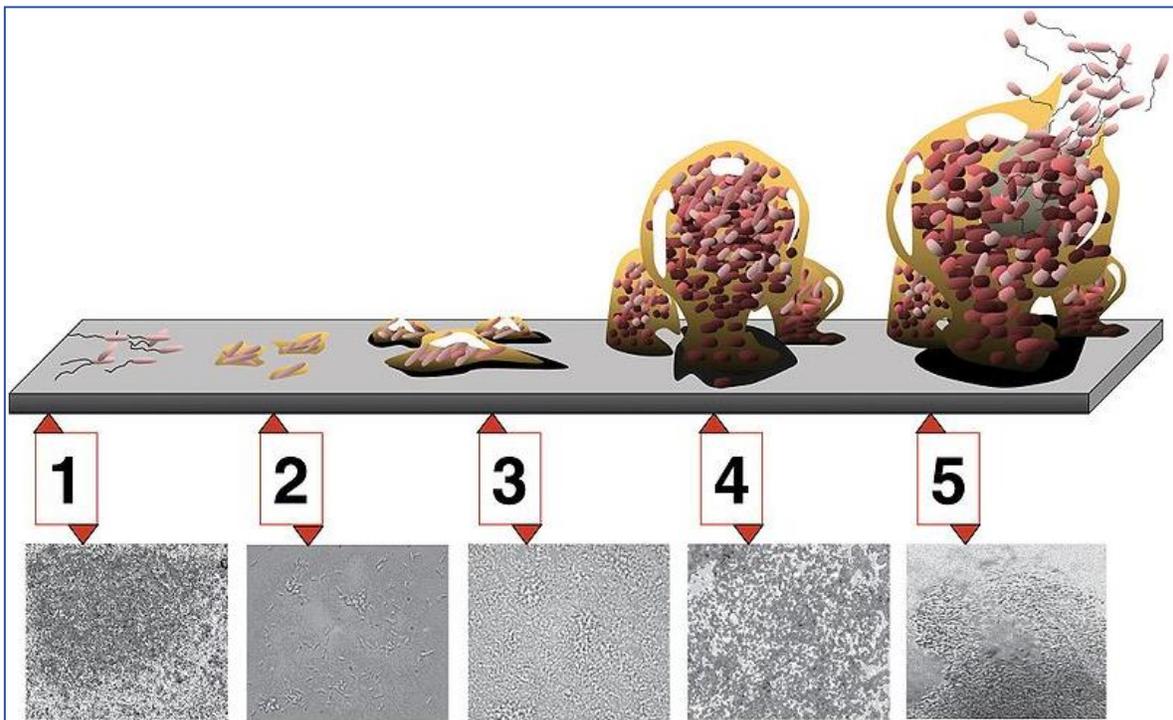


Figura 6. Proceso de formación del biofilm y fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las diferentes etapas.

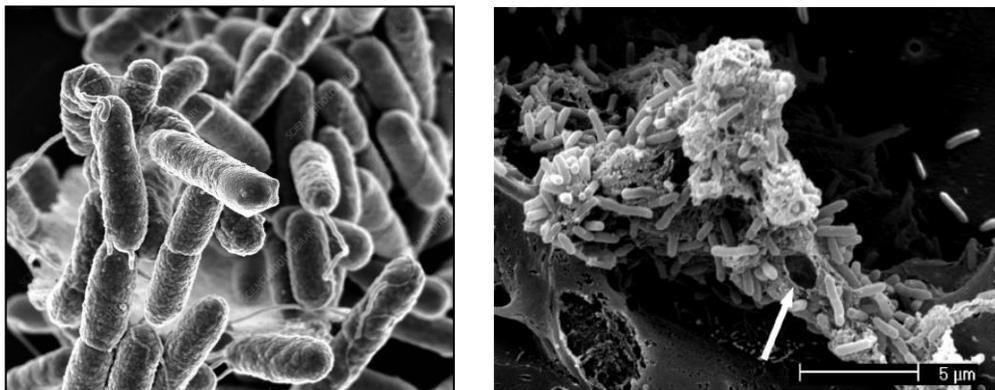


Figura 7. Izquierda. *P. aeruginosa* planctónica. Derecha. *P. aeruginosa* formando biofilm y canal de agua (flecha). (Extraído de: <https://www.sciencephoto.com/media/1003489/view>).

1.4. Desinfectantes

Los desinfectantes utilizados habitualmente en los Servicios de Endoscopia Digestiva son el glutaraldehído y el orto-ftalaldehído en concentraciones de 2 % durante 20-30 minutos y al 0,55 % durante 5-12 minutos respectivamente.

1.4.1. Glutaraldehído (GLU)

El glutaraldehído es un di-aldehído que se utiliza como desinfectante de alto nivel y como esterilizante químico. Las soluciones acuosas son ácidas y no poseen actividad esporicida, por lo que requieren “activación” para poder convertirse en soluciones útiles para las mencionadas funciones. Esta activación se logra alcalizando las soluciones, llevándolas a un pH de 7,5 – 8. A este pH las soluciones se polimerizan inactivando los grupos aldehídos que son los responsables de su actividad microbicida, por lo que estas soluciones tienen una vida útil de 14 días. Sin embargo, la vida útil de estas soluciones no solo depende del pH, sino también de las condiciones de uso, como la temperatura, la concentración y el estrés orgánico (presencia de materia orgánica).

La actividad microbicida resulta de la alquilación de los grupos sulfidrilos, hidroxilos, carboxilos y de grupos amino de los microorganismos alterando el ARN, ADN y la síntesis de proteínas.

1.4.2. Orto-ftalaldehído (OPA)

Las soluciones de orto-ftalaldehído utilizadas para DAN contienen 0,55% de 1,2-benceno-dicarboxi-aldehído. Estas soluciones son de color claro azuladas con un pH de 7,5.

El mecanismo de acción es similar al del glutaraldehído interfiriendo con la síntesis de proteínas y debido a su naturaleza lipofílica aromática interfiere también bloqueando el proceso de germinación de las esporas bacterianas.

El OPA tiene varias ventajas en comparación al glutaraldehído. Es estable en un amplio rango de pH (3-9), no irrita los ojos ni las fosas nasales, no requiere de monitorización ambiental y posee un olor apenas perceptible. Tampoco requiere activación y posee buena compatibilidad con una gran diversidad de materiales. Como una desventaja se puede mencionar que mancha la piel y que no se recomienda su uso en instrumental urológico por reacciones anafilácticas documentadas en pacientes de esta rama de la salud.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Analizar la actividad bactericida de 2 (dos) marcas de glutaraldehído y 2 (dos) marcas de orto-ftalaldehído comercializadas en Argentina sobre células planctónicas y biofilms de bacterias clínicamente relevantes para el Servicio de Endoscopia Digestiva.

2.2. Objetivos específicos

Evaluar sobre aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* en estado planctónico y sobre sus biofilms:

- El efecto bactericida del glutaraldehído y orto-ftalaldehído en las concentraciones de uso y tiempo de sumersión sugeridas por los fabricantes.
- El efecto bactericida del glutaraldehído y orto-ftalaldehído en las concentraciones y la mitad del tiempo de contacto sugeridas por los fabricantes.
- El efecto bactericida del glutaraldehído y orto-ftalaldehído en concentración mínima efectiva (la mitad de la concentración de uso, CU/2) con el tiempo sugerido por el fabricante.
- El efecto bactericida del glutaraldehído y orto-ftalaldehído en concentración mínima efectiva (la mitad de la concentración de uso, CU/2) con la mitad del tiempo sugerido por el fabricante.

3. Materiales y métodos

En este trabajo se realizó un estudio de la actividad bactericida de algunas marcas comercializadas en Argentina de los mencionados desinfectantes sobre células planctónicas y biofilms de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Se eligieron bacterias formadoras de biofilms aisladas frecuentemente en los Servicios de Endoscopia debido a la dificultad de reprocesamiento que posee este tipo de instrumental (8) (9) (10).

El estudio se llevó a cabo utilizando las concentraciones de uso de los desinfectantes sugeridas por los fabricantes y la concentración mínima efectiva (la mitad de la concentración de uso, CU/2) y también se utilizaron tiempos menores a los sugeridos para poner a prueba el poder desinfectante/bactericida. Dado que, la temperatura también es importante para lograr una eficiencia desinfectante óptima, ésta será una variable que se mantendrá constante, respetando la temperatura sugerida por los fabricantes durante todo el ensayo.

El poder bactericida de los desinfectantes en células planctónicas y biofilms se determinó mediante técnicas microbiológicas y espectrofotométricas respectivamente que se describen en materiales y métodos (11) (12).

3.1. Reactivos y cepas

Se utilizaron dos marcas comerciales de glutaraldehído GLU A y GLU B (ambos libres de surfactantes y de nueva generación, lo que significa que no requieren de activación) y dos marcas comerciales de orto-ftalaldehído OPA 1 y OPA 2 (Figura 8).

Los ensayos tanto en estado planctónico como en biofilms fueron realizados con una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Pae 191150) y una cepa clínica de *K. pneumoniae* (Kpn 1) provistas por un centro de salud de la ciudad de Córdoba.

Los reactivos utilizados para los ensayos realizados en biofilms fueron, XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonilo]-2H-tetrazolium hydroxide y, phenazine methosulfate (PMS) (Sigma®).

Los medios de cultivo utilizados fueron agar tripteína soya (ATS) y caldo tripteína soya (CTS) (Britania, Buenos Aires, Argentina). El buffer fosfato (PBS, pH 7,4) se preparó utilizando NaCl, KCl, NaHPO₄.H₂O y KH₂PO₄ (Cicarelli) en agua MilliQ.



Figura 8. Muestras de los aldehídos utilizados

3.2. Efecto de los desinfectantes en células planctónicas

3.2.1. Suspensión bacteriana

Ambas cepas bacterianas fueron conservadas en CTS y glicerol en la relación 90:10 a -20°C. Para los experimentos, las cepas se cultivaron por 18 h a 35 °C (Figura 9), en ATS. Para los ensayos a partir de un cultivo *overnight* se realizó una suspensión en PBS para ajustar la concentración bacteriana a $\sim 10^8$ UFC/mL [correspondiente al 0,5 de la escala de Mc Farland (McF)].



Figura 9. Cultivos *overnight* de Pae 191150 y Kpn 1

3.2.2. Evaluación del efecto de los desinfectantes en células planctónicas

Suspensiones bacterianas, tanto de Pae 191150 como de Kpn 1, con densidad celular equivalente al 0,5 de Mc Farland fueron expuestas a los distintos tratamientos que se describen en la Tabla 1.

El número de bacterias viables se determinó por triplicado mediante el “*drop plate method*” para la enumeración del número de bacterias viables de acuerdo al método descrito por Naghili y col. 2013 (11).

Tabla 1. Esquema de tratamientos evaluados frente a cultivos planctónicos de Pae 191150 y Kpn 1.

DESINFECTANTE	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN Desinfectante	VOLUMEN Inóculo 0,5 McF	TIEMPO INCUBACIÓN
GLU A	CU	0,9 mL	0,1 mL	10 min
				20 min
	CU/2			10 min
				20 min
GLU B	CU			10 min
				20 min
	CU/2			10 min
				20 min
OPA 1	CU	3,5 min		
		7 min		
	CU/2	3,5 min		
		7 min		
OPA 2	CU	3,5 min		
		7 min		
	CU/2	3,5 min		
		7 min		

Luego de cada tratamiento se procedió a neutralizar* (Tabla 2) durante 5 minutos el desinfectante. Pasados estos 5 minutos de incubación, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 3 gotas de 10 µl de la última dilución en ATS para, finalmente, llevar a cabo el recuento de UFC/mL de los microorganismos estudiados.

Tabla 2. Composición del Neutralizante utilizado.

* NEUTRALIZANTE	
Glicina	5 gr.
Tiosulfato de sodio	1,25 gr.
Agua	c.s.p. 100 mL

Paralelamente se procesaron los siguientes controles:

- Control A: 0,9 mL de PBS + 0,1 mL de suspensión bacteriana. Realizar dilución seriada y sembrar en ATS. Este es el control positivo del ensayo.
- Control B: 0,9 mL del neutralizante + 0,1 mL de suspensión bacteriana. Realizar dilución seriada y sembrar en ATS. Este control permite evaluar si el neutralizante posee actividad inhibitoria.
- Control C: Colocar 0,9 mL del neutralizante + 0,1 mL del desinfectante. Luego de 5 minutos de contacto a temperatura ambiente, colocar 0,1 mL de la suspensión bacteriana + 0,9 ml de la dilución anterior. Luego de 5 minutos realizar dilución seriada y sembrar en ATS. Este control permite evaluar si el desinfectante ha sido neutralizado.

En cuanto a la interpretación de los resultados de acuerdo al método de suspensión cuantitativa de la Unión Europea BS EN 1276 (1997). El índice de reducción del log decimal, el efecto microbicida (ME) o el efecto germicida (GE) pueden ser calculados usando la fórmula:

$$GE = \log N_c - \log N_d$$

- N_c es el número de UFC que desarrollaron en el control en la serie control en la cual el desinfectante es reemplazado por PBS.
- N_d es el número de UFC después de la exposición al desinfectante.
- Para que una determinada concentración de desinfectante sea bactericida, tiene que producir una reducción de 10^5 en el recuento de bacterias (5 log).
- Para que el neutralizante sea efectivo, el recuento bacteriano en el control C no debe ser inferior al 50% del recuento del control A.

3.2.3. Formación de biofilms y tratamientos

Los biofilms se formaron en placas de 96 pocillos conteniendo la suspensión de Pae 191150 o Kpn 1 (10^6 UFC/mL) en CTS suplementado con glucosa al 0,5 % (utilizada para promover la

formación del biofilm). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en un agitador orbital (130 rpm, Ferca).

Finalmente, las células planctónicas se retiraron cuidadosamente y el biofilm se lavó dos veces con 200 μ L de PBS.

Luego del lavado se procedió a realizar los mismos tratamientos que se les realizaron a las células planctónicas y una vez tratados se evaluó el efecto de los desinfectantes sobre el biofilm mediante el ensayo de viabilidad celular con XTT.

3.2.4. Ensayo XTT cuantificación de viabilidad celular

Luego del lavado de los biofilm para eliminar el desinfectante se añadieron 250 μ L de una solución 200 mg/L de XTT y 20 mg/L de PMS a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 3 h a 37 °C en oscuridad y se determinó la absorbancia a 490 nm en un lector multimodo Biotek Synergy 2 (Figura 10) (12).



Figura 10: Lector de placas Biotek Synergy 2 con placa de ensayo de XTT.

3.2.5. Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva (media y desviación estándar) de los valores obtenidos en cada ensayo. Los gráficos representan los resultados expresados como media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados por comparación de medias usando el test de *t de Student* con un nivel de significancia del 95%. Las diferencias * $p < 0,05$ fueron consideradas significativas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

4. Resultados e interpretación

4.1. Eficacia bactericida de los desinfectantes en estudio sobre los cultivos planctónicos

Los resultados obtenidos, luego de tratar las suspensiones bacterianas de las cepas clínicas Pae 191150 (6,40 Log UFC/mL) y Kpn 1 (6,47 Log UFC/mL) con las distintas concentraciones y los diferentes tiempos de GLU y OPA se presentan en la Tabla 3 donde se puede observar que los cuatro desinfectantes utilizados erradicaron el 100 % del inóculo bacteriano de las dos cepas bajo estudio en estado planctónico.

Tabla 3. Evaluación de la actividad bactericida de los cuatro desinfectantes a diferentes tiempos y concentraciones en cultivos planctónicos.

MICROORGANISMO	CONTROL A Log UFC/mL	GLU A Log UFC/mL		GLU B Log UFC/mL		OPA 1 Log UFC/mL		OPA 2 Log UFC/mL	
Pae 191150	6,40 ± 0,04	CU 10 min	0	CU 10 min	0	CU 3,5 min	0	CU 3,5 min	0
		CU 20 min	0	CU 20 min	0	CU 7 min	0	CU 7 min	0
		CU/2 10 min	0	CU/2 10 min	0	CU/2 3,5 min	0	CU/2 3,5 min	0
		CU/2 20 min	0	CU/2 20 min	0	CU/2 7 min	0	CU/2 7 min	0
Kpn 1	6,47 ± 0,04	CU 10 min	0	CU 10 min	0	CU 3,5 min	0	CU 3,5 min	0
		CU 20 min	0	CU 20 min	0	CU 7 min	0	CU 7 min	0
		CU/2 10 min	0	CU/2 10 min	0	CU/2 3,5 min	0	CU/2 3,5 min	0
		CU/2 20 min	0	CU/2 20 min	0	CU/2 7 min	0	CU/2 7 min	0

Control B: Los controles B en los cuatro desinfectantes arrojaron en promedio un valor de $6,1 \pm 0,4$ log UFC/mL lo cual indica que el neutralizante **NO** produjo actividad inhibitoria sobre los microorganismos.

Control C: Los controles C dieron en promedio $6,07 \pm 0,04$ log UFC/mL lo que indica que los desinfectantes han sido correctamente neutralizados.

4.2. Ensayo de la eficacia bactericida de los desinfectantes sobre los biofilms

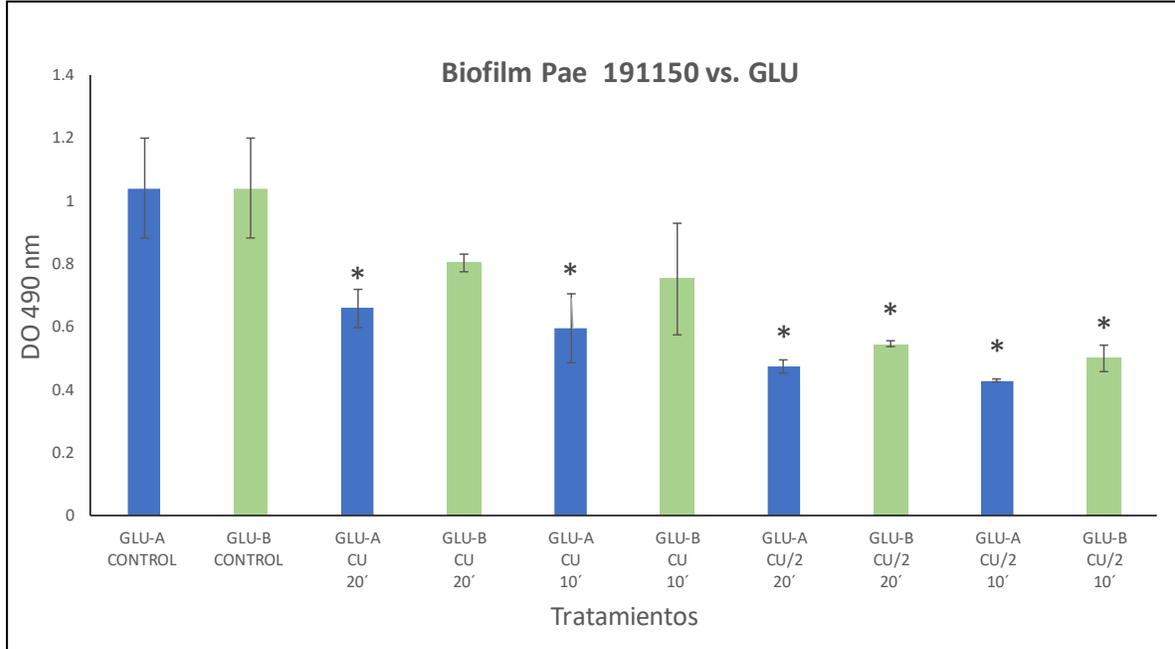
Los resultados obtenidos luego de tratar los biofilms bacterianos de las cepas clínicas Pae 191150 y Kpn 1 con las distintas concentraciones y los diferentes tiempos de GLU y OPA se presentan en el Gráfico 1 y en el Gráfico 2, donde se puede observar que los biofilm no fueron erradicados por los desinfectantes ni en las CU ni en concentración mínima efectiva (CU/2) en los tiempos ensayados.

En el caso de Pae 191150, GLU A produjo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a la CU y a la que la CU/2 a ambos tiempos siendo la CU/2 sorpresivamente un poco más efectiva en la desinfección (58,8 % de reducción de viabilidad), pero sin lograr la erradicación del biofilm. GLU B no resultó efectivo a las CU y redujo significativamente el biofilm cuando se utilizó a las CU/2 a ambos tiempos. OPA sólo disminuyó significativamente el biofilm cuando se lo utilizó a la CU/2.

En el caso de Kpn 1 todos los desinfectantes mostraron significativa actividad antibiofilm, en el peor de los casos la disminución de la viabilidad fue del 31% con GLU A a la CU 20', cabe destacar que GLU B logró la mayor disminución de la viabilidad siendo máxima a la CU y a la CU/2 (85 %), siendo significativa no solamente frente al control sino también frente a GLU A, además OPA redujo notablemente el biofilm, siendo mas marcada esta reducción en OPA B.

Sin embargo, como se mencionó al principio, ningún desinfectante resultó ser totalmente eficaz al momento de erradicar esta estructura de resistencia.

A)



B)

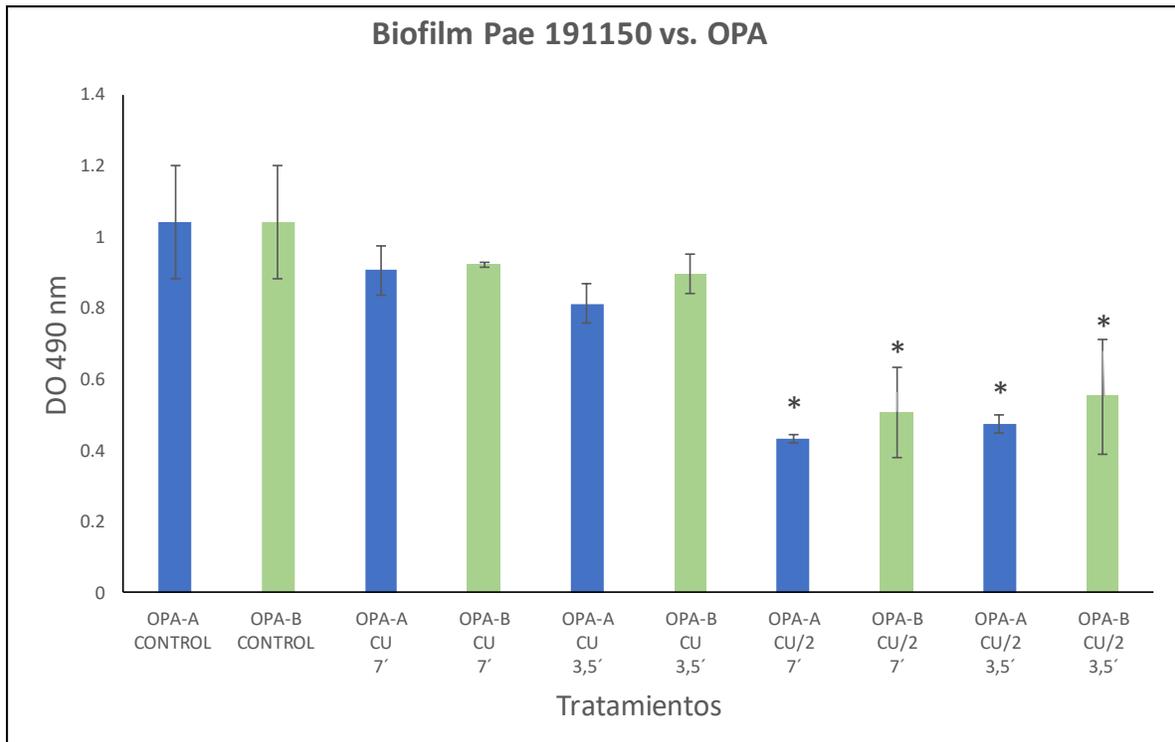
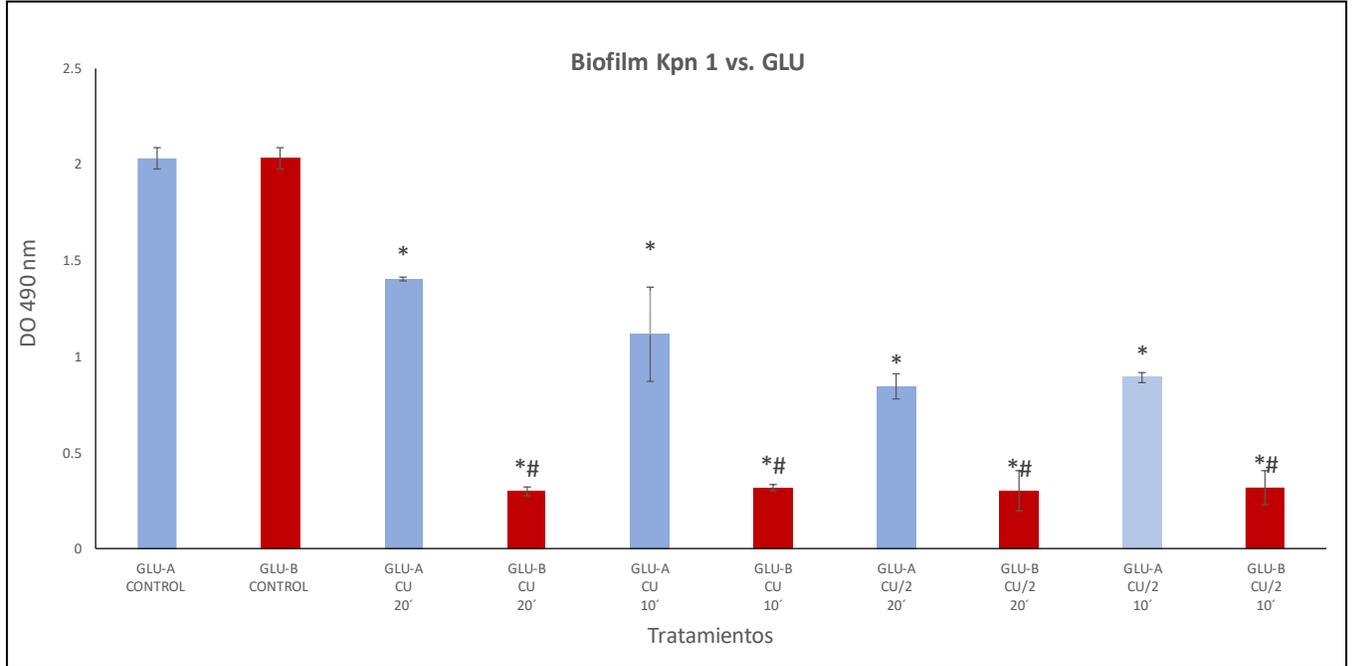


Gráfico 1. Efecto de tratamientos de A): Pae 191150 BIOFILM vs GLUTARALDEHÍDO. B): Pae 191150 BIOFILM vs ORTO-FTALALDEHÍDO. * $p < 0,05$ respecto al control.

A)



B)

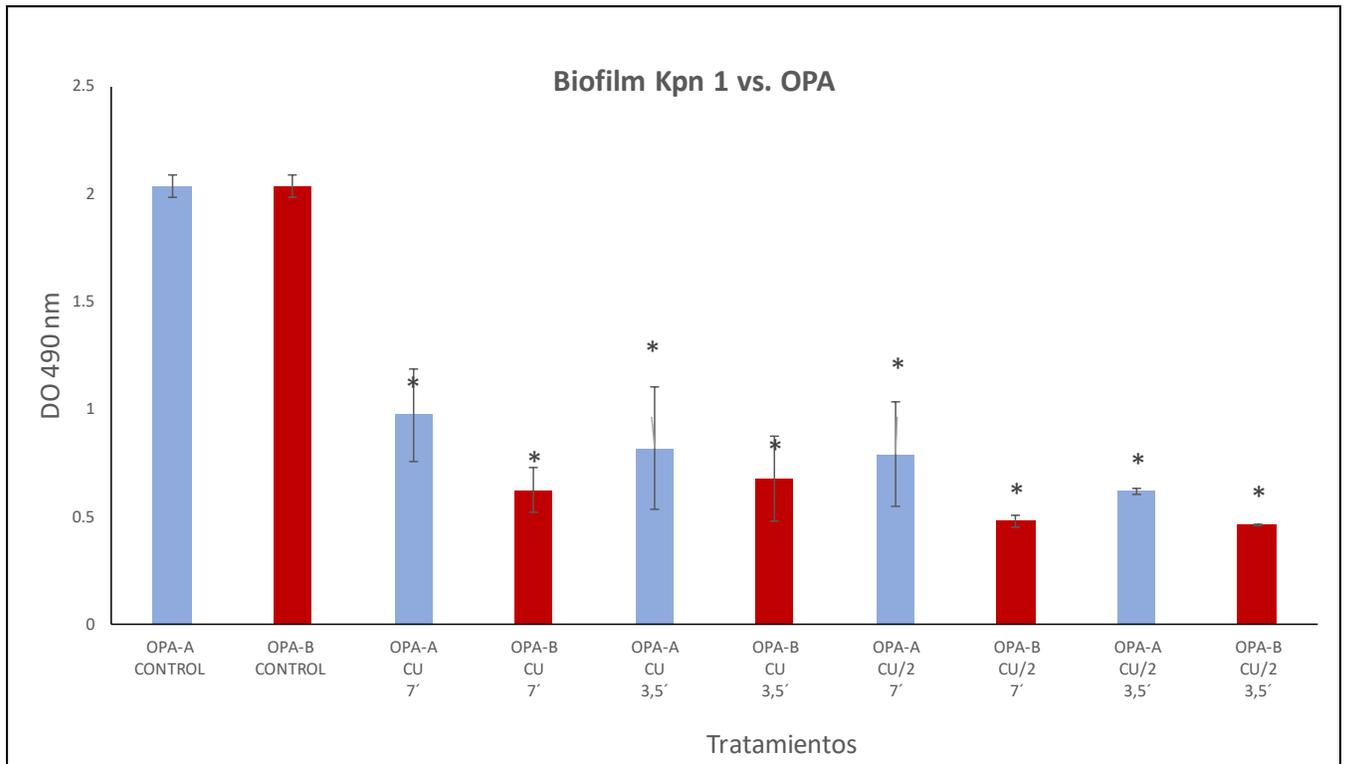


Gráfico 2. Efecto de tratamientos de A): Kpn 1 BIOFILM vs GLUTARALDEHÍDO. B): Kpn 1 BIOFILM vs ORTO-FTALALDEHÍDO. * $p < 0,05$ respecto al control, # $p < 0,05$ respecto a GLU A

5. Discusión y conclusión

En el presente trabajo se evaluó la actividad de GLU y OPA sobre células planctónicas y biofilms de Pae 191150 y Kpn1 para determinar si existe variación en su actividad bactericida y antibiofilm bajo distintas condiciones de uso.

La elección de las cepas mencionadas se realizó teniendo en cuenta que éstas son frecuentemente aisladas en Servicios de Endoscopia, y que potencialmente se pueden hallar contaminando los endoscopios.

Las condiciones de uso se idearon a partir de la observación de que en la práctica no siempre se respetan las condiciones sugeridas por los fabricantes de los productos desinfectantes. De esta manera, se plantearon “peores situaciones” utilizando la mitad de la concentración del desinfectante y disminuyendo el tiempo de contacto también a la mitad.

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad de los desinfectantes frente a las bacterias planctónicas indicaron que tanto GLU como OPA resultaron efectivos aún en las peores condiciones (CU/2 y mitad del tiempo indicado por el fabricante) lo cual indicaría que llevar a cabo una DAN de acuerdo a las especificaciones entre una endoscopia y otra liberaría el endoscopio de microorganismos planctónicos.

Sin embargo, no ocurrió lo mismo contra el biofilm, encontrando que no logró ser eliminado en ninguno de los casos, incluso utilizando las condiciones sugeridas por los fabricantes.

El efecto bactericida de OPA se debe a su naturaleza aromática lipofílica que hace que sea fácil penetrar las capas externas de bacterias Gram negativas. A pesar de que OPA es un químico con dos grupos aldehído, es menos potente agente de reticulación que otros aldehídos como GLU (13). Simões y col. (14) demostraron que en células planctónicas en presencia de albúmina sérica bovina (BSA), incluso a una concentración de OPA de 300 mg/mL no se observó inactivación celular total. BSA es una proteína que contiene residuos de aminas primarias capaces de reaccionar con grupos aldehído libres. Como consecuencia, reduce la disponibilidad de grupos necesarios para la actividad biocida y también pueden disminuir la accesibilidad del biocida a sus sitios blanco formando un recubrimiento alrededor de la célula microbiana (15). BSA contiene lisina, histidina y glicina. La glicina puede usarse para neutralizar aldehídos y hacer que sea seguros para su eliminación (16). Estos mismos autores vieron que las células bacterianas atrapadas en biofilms eran más resistentes que las células planctónicas, ya que la concentración necesaria del biocida para lograr la inactivación completa fue mayor para el biofilm. Puede haber

varias razones para este comportamiento, como la fisiología alterada de las células en el biofilm, la estructura diferente del biofilm, o por reacción del biocida con componentes de la matriz (17).

Los resultados sugieren que después de la aplicación de los desinfectantes, aunque los biofilms pueden ser inactivados en un alto porcentaje no logran ser erradicados en un 100 %. La acumulación es un problema en estas situaciones donde la eliminación de los microorganismos de las superficies es esencial. Por lo tanto, para promover la eliminación de biofilms, se deben emplear dispersantes y tensioactivos en combinación con biocidas (18), además de hacer una limpieza protocolizada después de cada uso del endoscopio y antes de cada DAN.

Por lo antes expuesto, es que se debe apuntar a la mejora continua y a la actualización permanente de los protocolos de limpieza y desinfección, realizando las tareas responsablemente, teniendo como principal objetivo garantizar la seguridad del paciente.

6. Bibliografía

1. Wikipedia. Endoscopy. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Endoscopy>. 2019.
2. Rutala WA, Ph D, Weber DJ. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities , 2008.
3. Kovaleva J, Peters FTM, van der Mei HC, Degener JE. Transmission of infection by flexible gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):231–54.
4. Alborno H, Guerra S. Manual de prevención de infecciones en procedimientos endoscópicos. *Sist Control Infecc Hosp - Uruguay* [Internet]. 2008.
5. Kovaleva J. Infectious complications in gastrointestinal endoscopy and their prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2016;30(5):689–704.
6. Koning JW. Interactions between *Streptococcus mutans* and *Veillonella dispar*. 2012;U600611(September):1.
7. Woodworth BA, Tamashiro E, Bhargava G, Cohen NA, Ph D, Palmer JN. An in vitro model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on viable airway epithelial cell monolayers. 2014;(c):235–8.
8. Kenters N, Huijskens EGW, Meier C, Voss A. Infectious diseases linked to cross-contamination of flexible endoscopes. *Endosc Int open* [Internet]. 2015;3(4):E259-65.
9. Gastmeier P, Vonberg RP. *Klebsiella* spp. in endoscopy-associated infections: We may only be seeing the tip of the iceberg. *Infection.* 2014;42(1):15–21.
10. Ofstead CL, Dirlam Langlay AM, Mueller NJ, Tosh PK, Wetzler HP. Re-evaluating endoscopy-associated infection risk estimates and their implications. *Am J Infect Control* [Internet]. 2013;41(8):734–6.
11. Naghili H, Tajik H, Mardani K, Razavi Rouhani SM, Ehsani A, Zare P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet Res forum an Int Q J* [Internet]. 2013;4(3):179–83.
12. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2013;31(10):655–9.
13. Simons C, Walsh SE, Maillard JY, Russell AD. A note: ortho-phthalaldehyde: proposed mechanism of action of a new antimicrobial agent. *Letters in Applied Microbiology.* 2000 Oct;31(4):299-302.
14. Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of different concentrations of ortho-phthalaldehyde on biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* under different flow conditions. *Biofouling.* 2003 Oct 1;19(5):287-95.
15. Fraud S, Maillard JY, Russell AD. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. *The Journal of hospital infection.* 2001 Jul;48(3):214-21.
16. Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of different concentrations of ortho-phthalaldehyde on biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* under different flow conditions.

Biofouling. 2003 Oct 1;19(5):287-95.

17. Pereira MO, Morin P, Vieira MJ, Melo LF. A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions. *Letters in Applied Microbiology*. 2002 Jan;34(1):22-6.
18. Paulus W (2012) *Microbiocides for the Protection of Materials – a Handbook*. Springer Science & Business Media.

