

Neutralización de los residuos de desinfectantes en salas limpias y aisladores

Dr. Rolf Müller, Dr. Ulrich Eikmanns: TSA-U+

Resumen:

En la industria farmacéutica es normal rotar los desinfectantes utilizados en las áreas críticas. Esta rotación ayuda a eliminar el máximo espectro de contaminaciones potenciales. A menudo, como mínimo uno de los desinfectantes utilizados contiene un **Compuesto de Amonio Cuaternario (CAC)** como componente activo. Los CAC, así como las biguanidas, no son volátiles, por lo que permanecen en las superficies después de realizar una desinfección. Ni siquiera después de enjuagar se puede excluir que queden residuos en concentraciones bajas sobre las superficies higienizadas. Al realizar pruebas de contacto posteriores con la placa de contacto de TSA+LTHT utilizada habitualmente, incluso esta baja concentración de residuos puede dar falsos negativos, dado que la placa recoge estos residuos además de cualquier otra contaminación potencial. Sobre la base de la placa de contacto TSA+LTHT ampliamente utilizada, se ha desarrollado un medio que es capaz de desactivar los CAC y las biguanidas incluso en concentraciones elevadas.

Problema:

En las áreas farmacéuticas asépticas se utilizan con mucha frecuencia desinfectantes que contienen CAC, compuestos de benzalconio y biguanidas, puesto que ofrecen una buena desactivación de todo tipo de diferentes microorganismos e incluso en concentraciones bajas siguen siendo muy activos contra microorganismos grampositivos. El inconveniente de los desinfectantes que contienen estos ingredientes activos son los residuos, que deben ser eliminados periódicamente mediante un proceso de lavado separado. En las superficies de fácil acceso el enjuagado se puede realizar fácilmente con agua estéril o alcohol; sin embargo, en superficies más complicadas cabe suponer que incluso después de realizar un enjuagado a fondo pueden quedar residuos. Estos residuos pueden ser recogidos por una placa de contacto e inhibir de este modo la detección de una contaminación potencial. Durante los últimos años hemos iniciado un proyecto para desarrollar un medio que debería poder neutralizar (desactivar) los residuos de desinfectantes que contienen CAC, compuestos de benzalconio y/ biguanidas.

Historia /Evolución:

Cuando utiliza desinfectantes, la industria farmacéutica debe demostrar, por un lado, la eficacia de los desinfectantes utilizados contra las contaminaciones potenciales, y por otro lado la neutralización de los residuos potenciales que dejan los medios nutritivos utilizados.

Durante un tiempo no se ha prestado atención a la desactivación de los residuos de los desinfectantes. En EP 2.6.12 se presenta una tabla de „Sustancias interferentes“ junto con los neutralizantes correspondientes („Método neutralizador potencial“). En esta lista se detallan todos los ingredientes activos más utilizados en los desinfectantes, junto con como mínimo un agente neutralizador para dichos ingredientes. Sobre la base de esta numeración, los medios TSA+LTHT utilizados habitualmente deberían neutralizar todos los residuos de desinfectantes. Sin embargo, los datos experimentales han revelado que especialmente los residuos de la nueva generación de desinfectantes no se neutralizan fácilmente. Los ingredientes típicos de estos desinfectantes modernos son los CAC o biguanidas, o incluso una mezcla de ambos componentes.

Para compensar esta desactivación limitada de los residuos lo obvio habría sido simplemente aumentar la concentración de los neutralizantes añadidos. Sin embargo, se demostró que ni siquiera un incremento marcado de la concentración de neutralizantes era suficiente para desactivar los desinfectantes modernos. Desde 2005 diferentes fabricantes han desarrollado medios nutritivos destinados a desactivar los desinfectantes que contienen CAC y biguanida. Aunque las placas desarrolladas en ese momento conseguían desactivar los CAC y las biguanidas parcialmente, no se impusieron en el mercado a causa de algunos inconvenientes importantes, como su corta vida útil, la creación de precipitados, malas tasas de recuperación de algunos microorganismos grampositivos o la turbidez del medio.

En este informe describimos los resultados observados en un medio neutralizante de nuevo desarrollo que es capaz de desactivar residuos de desinfectantes incluso con una concentración muy elevada sin problemas y sin presentar ninguno de los inconvenientes mencionados anteriormente. Los resultados se obtuvieron utilizando una prueba de caso más desfavorable, en la que se aplicó la cantidad teóricamente más elevada posible de desinfectante directamente en la placa.

Procedimientos experimentales:

Para demostrar la desactivación de los desinfectantes normalmente se realiza una de las dos pruebas siguientes:

1. “Prueba de aislamiento directo“ independiente de la superficie
2. “Prueba práctica“ dependiente de la superficie

En la "Prueba de aislamiento directo" el desinfectante se aplica por igual sobre la superficie de la placa. Al cabo de 15 o 20 min se inocula en la placa una suspensión de una cepa de ensayo y se determina la tasa de recuperación en comparación con una placa no tratada con desinfectante. La „Prueba de aislamiento directo“ se compara con la "Prueba práctica“, que es menos elaborada y permite un mayor rendimiento de muestras por período. La „Prueba de aislamiento directo“ se puede considerar la prueba de caso más desfavorable, puesto que se aplica directamente en el medio la cantidad completa de desinfectante. Durante las pruebas de contacto normales, solamente se recogen pequeñas cantidades de residuos de las superficies, reduciendo la cantidad de sustancias activas que desafían la capacidad neutralizante del medio.

Al realizar la "Prueba práctica“, en un primer paso una superficie se trata con un desinfectante. Después de secar la superficie (p. ej. durante 3 horas) se realiza una prueba de contacto de la superficie tratada y al cabo de 15 o 20 min se inocula una suspensión de una cepa de ensayo y se determina la tasa de recuperación.

Los resultados presentados en este informe se obtuvieron con la "Prueba de aislamiento directo“, utilizando un sembrador en espiral para la inoculación de suspensiones de cepas. Los desinfectantes probados se especifican en la tabla 1. Los desinfectantes utilizados se compraron listos para su uso o se prepararon conforme a las instrucciones.

Tabla 1: Lista de desinfectantes probados (concentración de ingrediente activo en mg por 100 ml)

Desinfectante	CAC	Biguanida	Dióxido de cloro	Fenoxipropanol	Fenoxietanol	Glutaraldehído	Glíoxal	Aminopropil-diamina	Propanol / 2-Propanol
Gigasept AF (4%)	876			400					
Hexaquant forte (2%)	558								
Klercide Quat/Biguanida	500	200							
Microbac forte (2%)	498								
Terralin Protect (2%)	458				340				
Gigasept AF (1,5%)	329			150					
Klercide Sporicidal*	290		920						
Microbac forte (1%)	249								
Sterillium classic pur	200								75 ml
Lysoformin 3000 (2%)	192					190	150		
Melsept SF (2%)	150					90	64		
Hexaquant forte (0,5%)	140								
Microbac forte (0,5%)	125								
Kohrsolin FF (2%)	120					100			
Hexanios G+R	117	11,5							
Terralin Protect (0,5%)	115				85				
Amphospray 41 IP	109	96						33ml	
Incidin Rapid (0,75%)	75					74			
Lysoformin special (0,75%)	72	22							
Lysoformin 3000 (0,5%)	48					47,5	37,5		
Melsept SF (0,5%)	38					22,5	16		
Kohrsolin FF (0,5%)	30					25			
Incidin Rapid (0,25%)	25					25			
Lysoformin special (0,25%)	24	7							

*nombre completo: Klercide Sporicidal Chlorine/Quat

Se aplicaron 20, 50 y 100 µl del desinfectante correspondiente por placa de contacto. Para facilitar la claridad y comparabilidad, solo se presentan los resultados con 50 µl. 50 µl de desinfectante por placa de contacto (25cm²) corresponden aproximadamente a 20 ml por m². Sobre la base de este cálculo, la cantidad de desinfectante corresponde a aproximadamente el 50 % de la cantidad recomendada para su uso en superficies (aprox. 40 ml por m²)

Medios listos para usar utilizados:

1. Placas de contacto TSA + LTHT (p. ej. Ref. 100.0100): Para la desactivación, esta placa contiene la siguiente combinación de neutralizantes: 0,7 g de lecitina (L), 5 ml Tween 80 (T) = polisorbato 80, 0,5 g de histidina (H) y 0,1 g de tiosulfato de sodio (T) por litro de medio.
2. Placas de contacto TSA-U+ (Ref. 101.0100): Para la desactivación, esta placa contiene la siguiente combinación de neutralizantes: 3 g de lecitina (L), 20 ml Tween 80 (T), 0,5 g de histidina (H) por litro de medio. Además, se añadió el Neutralizer Plus de nuevo desarrollo.

Cepas de prueba utilizadas:

Dado que se ha demostrado que los microorganismos grampositivos son especialmente sensibles a los desinfectantes con CAC, se han utilizado preferentemente las series de prueba de las cepas grampositivas de *B. subtilis* (ATCC 6633); *Staph. aureus* (ATCC 6538) y *Staph. epidermidis* (ATCC 14990). También se probaron *E. coli* (ATCC 8739); *Ps. aeruginosa* (ATCC 9027); *C. albicans* (ATCC 10231) y *A. brasiliensis* (ATCC 16404). -

Resultados:

Los resultados se presentan en las tablas siguientes. En la primera serie de pruebas se investigó qué desinfectante seguía desactivado al aplicar 50 µl por placa de contacto estándar (TSA+LTHT) utilizando la „Prueba de aislamiento directo“ (Tabla 2). Resultó evidente que solo los desinfectantes con concentraciones muy bajas de CAC se desinfectaban fácilmente. Al superar la concentración de alrededor de 30 mg de CAC por 100 ml, ya no era posible detectar una neutralización suficiente y por lo tanto se puede concluir que una placa de TSA+LTHT estándar es ineficaz para la neutralización de dichos desinfectantes.

Tabla 2: Desactivación de desinfectantes en medio de TSA-LTHT

Desinfección	Concentración en mg/100ml		Cepa de prueba		
	CAC	Biguanida	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. epidermidis</i>
			µl de desinfectante por placa de contacto TSA+LTHT		
			50	50	50
Gigasept AF (4%)	876		0	0	0
Hexaquart forte (2%)	558		0	0	0
Klercide Quat/Biguanida	500	200	0	0	0
Microbac forte (2%)	498		v. Microbac forte (0,5%)		
Terralin Protect (2%)	458		v. Terralin protect (0,5%)		
Gigasept AF (1,5%)	329		0	0	0
Klercide Sporicidal*	290		n.t.	n.t.	0
Microbac forte (2%)	249		n.t.	5	1
Sterillium classic pur	200		4	0	6
Lysoformin 3000 (2%)	192		v. Lysoformin 3000 (0,5%)		
Melsept SF (2%)	150		n.t.	0	0
Hexaquart forte (0,5%)	140		0	0	0
Microbac forte (0,5%)	125		n.t.	5	1
Kohrsolin FF (2%)	120		0	0	1
Hexanios G+R	117	12	n.t.	n.t.	0
Terralin Protect (0,5%)	115		n.t.	7	0
Amphospray 41 IP	109	96	0	0	0
Incidin Rapid (0,75%)	75		0	1	1
Lysoformin special (0,75%)	72	22	0	0	3
Lysoformin 3000 (0,5%)	48		n.t.	1	37
Melsept SF (0,5%)	38		n.t.	2	64
Kohrsolin FF (0,5%)	30		74	52	74
Incidin Rapid (0,25%)	25		81	59	69
Lysoformin special (0,25%)	24	7	33	1	0

*nombre completo: Klercide Sporicidal Chlorine/Quat

En la segunda serie de pruebas, se probó la placa de contacto de TSA-U+ de nuevo desarrollo con los mismos desinfectantes y bajo las mismas condiciones de prueba. Los resultados se muestran en la tabla 3. Con todas las cepas de prueba se demostró que se conseguía una tasa de recuperación por encima del 50%, demostrando que todos los desinfectantes quedaban neutralizados. Incluso los desinfectantes con la concentración más elevada se desactivaron sin problemas. No se probaron desinfectantes de concentraciones más bajas si se demostraba la desactivación de concentraciones más elevadas del mismo desinfectante (p. ej. Melsept, Lysoformin 3000).

Tabla 3: Desactivación de desinfectante en medio de TSA-U+

Desinfectante	Concentración en mg/100ml		Cepa de prueba						
			S. aureus	B. subtilis	S. epidermidis	E. coli	Ps. aeruginosa	C. albicans	A. brasiliensis
	CAC	Biguanida	µl de desinfección por placa de contacto de TSA-U+						
			50	50	50	50	50	50	50
Gigasept AF (4%)	876		92	76	83	116	97	123	99
Hexaquart forte (2%)	558		86	106	79	92	101	97	108
Klercide Quat/Biguanide	500	200	111	109	126	105	95	112	89
Microbac forte (2%)	498		103	98	104	75	99	90	107
Terralin Protect (2%)	458		111	122	97	61	103	106	94
Gigasept AF (1,5%)	329		v. Gigasept AF 4%						
Klercide Sporicidial*	290		89	74	109	65	97	102	92
Microbac forte (2%)	249		103	98	104	75	99	90	107
Sterillium classic pur	200		102	106	102	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Lysoformin 3000 (2%)	192		116	87	92	86	99	104	104
Melsept SF (2%)	150		110	60	131	76	93	106	133
Hexaquart forte (0,5%)	140		v. Hexaquart forte 2%						
Microbac forte (0,5%)	125		v. Microbac forte 2%						
Kohrsolin FF (2%)	120		64	94	82	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Hexanios G+R	117	11,5	105	106	123	99	131	103	72
Terralin Protect (0,5%)	115		v. Terralin Protect 2%						
Amphospray 41 IP	109	96	87	93	89	85	127	127	119
Incidin Rapid (0,75%)	75		99	95	92	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Lysoformin special (0,75%)	72	22	85	72	92	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Lysoformin 3000 (0,5%)	48		109	77	107	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Melsept SF (0,5%)	37,5		v. Melsept SF 2%						
Kohrsolin FF (0,5%)	30		v. Kersolin FF 2%						
Incidin Rapid (0,25%)	25		v. Incidin Rapid 0,75%						
Lysoformin special (0,25%)	24	7	v. Lysoformin special 0,75%						

*nombre completo: Klercide Sporicidial Chlorine/Quat

El autor de este estudio realizó pruebas adicionales con cantidades de desinfectante más elevadas.

Conclusión:

Sobre la base de la placa de contacto estándar de TSA –LTHT utilizada habitualmente con los neutralizantes lecitina (0,7g/L), Tween 80 (50L/L), histidina (0,5g/L) y tiosulfato de sodio (0,1g/L), se desarrolló un nuevo medio que desactiva incluso altas concentraciones de ingredientes activos de los desinfectantes. La placa de contacto TSA-U+ de nuevo desarrollo es capaz de desactivar CAC y biguanidas a una concentración como mínimo 20 veces más elevada en comparación con las placas de contacto con TSA+ LT o TSA+LTHT utilizadas habitualmente. Se mantuvieron sin cambios los buenos resultados de desactivación obtenidos hasta ahora respecto a otros ingredientes activos de desinfectantes.

El desarrollo de la placa TSA-U+ es un hito que permite obtener resultados fiables en el control ambiental de salas limpias y aisladores, reduciendo drásticamente el riesgo de obtener falsos negativos. Se pueden detectar microorganismos incluso aunque se hayan recogido residuos de desinfectantes durante el proceso de monitorización. Comparadas con otras placas de neutralizantes, las placas de TSA-U+ tienen varias ventajas, como la larga vida útil (se están realizando pruebas de vida útil de 8 a 9 meses), el medio transparente sin precipitados, y las buenas tasas de recuperación de todas las cepas de prueba, incluyendo microorganismos grampositivos como *B. subtilis*.

Autor:

El Dr. Rolf Müller tiene un Doctorado en Química. Cuenta con más de 40 años de experiencia en el desarrollo y la fabricación de medios nutritivos listos para usar. Al finalizar sus estudios de Química, en 1973 fundó Heipha Dr. Müller GmbH, empresa que dirigió durante más de 35 años. En 2013 fundó PMM (PharmaMedia Dr. Müller GmbH), donde se ocupa, entre otros aspectos, de I+D.

El Dr. Ulrich Eikmanns tiene un Doctorado en Microbiología. Tiene una prolongada experiencia en el desarrollo de productos de medios listos para usar. Desde 2013 se ocupa de las ventas y el marketing en PMM.