

# Evaluación in vitro de un proceso novedoso para reducir la contaminación bacteriana de superficies ambientales

Dwayne Baxa, PhD,<sup>a</sup> Lynne Shetron-Rama, PhD, MT(ASCP),<sup>b</sup> Marisabel Golembieski,<sup>a</sup> Michelle Golembieski,<sup>a</sup> Susmita Jain,<sup>b</sup> Milana Gordon, BS,<sup>a</sup> and Marcus Zervos, MD<sup>a</sup> Detroit and Ypsilanti, Michigan

Traducción simple por: M. Sc. Luis Alberto Cuevas Barrera. Microbiólogo médico.

**Antecedentes:** La desinfección de superficies contaminadas es un aspecto integral y desafiante de la prevención de infecciones. Evaluamos la capacidad de Goldshield 5 (GS; NBS Technology, Laurelton, NY), un surfactante antimicrobiano que recubre las superficies con iones de octadecildimetilamonio covalentemente unidos, para reducir la carga bacteriana en superficies contaminadas.

**Métodos:** Probamos el producto GS para determinar la actividad inhibidora contra aislados de pacientes de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) y *Escherichia coli* (EC) de acuerdo con el estándar de la industria de la confección estadounidense Protocolo 100 de la Asociación de Químicos y Coloristas Textiles. También probamos la actividad del producto contra estos mismos aislados en pruebas de superficie con un método de dilución-uso modificado de la Asociación de Oficiales Químicos Analíticos.

**Resultados:** En tela, la viabilidad de los aislados bacterianos se inhibió durante 14 días. GS también redujo la recuperación de MRSA, PA y EC viables de superficies de formica y acero inoxidable tratados con el producto.

**Conclusión:** Nuestros resultados demuestran que GS tiene actividad inhibidora y utilidad potencial como parte de un proceso de control de infecciones.

**Palabras clave:** surfactante antimicrobiano; *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; control de infección.

Copyright © 2011 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved. (Am J Infect Control 2011;n:1-5.)

Según el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales, casi el 60% de todos los *Staphylococcus aureus* son resistentes a la metilina (MRSA) y el 30% de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) son resistentes a las fluoroquinolonas<sup>1</sup>. La transmisión de infecciones nosocomiales, incluidos los organismos multirresistentes, es determinada por una población de personas vulnerables, una gran cohorte de individuos colonizados, utilización de antimicrobianos y adherencia a las prácticas de control de infecciones.<sup>2,3</sup>

El papel de las superficies contaminadas se ha controvertido en un área de gestión del control de infecciones. Para algunas infecciones, se cree que las superficies

contaminadas o el equipo movido entre individuos son los responsables. Incluso aunque se hace todo lo posible para reducir la contaminación en las superficies mediante prácticas adecuadas y reactivos de limpieza eficaces, la infección continúa. Entre los microbios de mayor preocupación son *S. aureus* y PA, particularmente si estos organismos han adquirido resistencia a los antibióticos.<sup>1,4</sup> Los estudios han informado que personas hospitalizadas con *S. aureus* resistente a los antibióticos tienen una mayor probabilidad de adquirir más infecciones sintomáticas.<sup>5</sup> Este riesgo mayor se asocia también con aumentos en duración de la estancia hospitalaria, morbilidad y mortalidad<sup>6,7</sup>.

Se ha puesto mayor énfasis en las medidas de control de infecciones para reducir el creciente número de infecciones resistentes a los antibióticos. Un estudio de la transmisión de enterococos resistentes a la vancomicina dentro de un hospital encontró que el 10.6% de las áreas encuestadas fueron contaminadas a través de las manos de los trabajadores de la salud que se pusieron en contacto con sitios contaminados preexistentes<sup>8</sup>. Los estudios subrayan la importancia del lavado de manos y la prevención de la contaminación bacteriana en superficies ambientales. Fuimos contratados para evaluar el surfactante antimicrobiano (Goldshield 5 [GS en adelante]; NBS Technology, Laurelton, NY) en nuestro laboratorio por su utilidad para reducir la carga bacteriana de las superficies contaminadas con protección continua, en contraste con los desinfectantes actuales. El producto principal de GS es una sal de amonio cuaternario que inhibe eficazmente el crecimiento de moho, hongos, algas y bacterias en una amplia variedad de materiales, según el fabricante. GS no es un limpiador, sino que es un surfactante que brinda una actividad antimicrobiana en superficies ya limpiadas. El producto es la primera aplicación comercial de la tecnología desarrollada en la Universidad de Emory que ha recibido 3 Patentes de EE. UU. (Números de patente US5,959,014, US6,221,944 y US 6.632.805). El producto está registrado en la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (83075-1). En este estudio, probamos el producto GS en batas de pacientes en una formulación al 5% con un detergente no iónico al 10%, como se formularía para su uso en la lavandería, para determinar su actividad antimicrobiana contra aislados de pacientes de *MRSA*, *PA* y *Escherichia coli* (EC). También probamos una formulación al 1% del producto GS que contiene un detergente no

iónico al 10% contra estos aislados utilizando un procedimiento de prueba de portador. Nuestros datos indican que GS podría ser útil para la reducción a largo plazo de la contaminación bacteriana en superficies ambientales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo**

Aislamientos obtenidos de pacientes hospitalizados entre 2005-2006 se congelaron y almacenaron a 270 ° C. Siete aislados de MRSA, 7 de PA y 8 de EC los cuales se cultivaron en placas de agar de soya tripticasa (TSA) o placas de infusión cerebro-corazón durante 18-24 horas a 35°C. Las colonias de cada aislado fueron utilizadas para inocular 3 mL de caldo Mueller-Hinton. Los cultivos se hicieron crecer durante toda una noche a 35°C. La densidad óptica se midió con un Espectrofotómetro 100 Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) a una longitud de onda de 600 nm. Los cultivos líquidos se diluyeron según fuera apropiado.

### **Prueba de tejido**

GS y sus formulaciones son comercializadas por HyGenesis ([www.HyGenesis.com](http://www.HyGenesis.com)). Las pruebas de tejidos se realizaron de acuerdo con la Asociación Estadounidense de Químicos Textiles y Protocolo de coloristas 100.<sup>9</sup> Las primeras muestras circulares de 2 pulgadas de tela se cortaron de una bata de paciente que constaba de una mezcla 50% algodón. Todas las muestras se lavaron a mano en agua destilada tibia con detergente no iónico y dejaron secar al aire por completo. Las muestras se trataron para la prueba con 5% GS empapando bien la tela en el producto. El material se dejó secar al aire completamente antes de la inoculación. Cuatro muestras apiladas de tela sin tratar se

inocularon con 4 mL de MRSA, PA o EC a 0.5 en escala McFarland y un control adicional de material no tratado y no infectado. El muestreo se realizó colocando a cada pila de 4 muestras en 100 mL de solución salina estéril y agitando durante 1 minuto. Se retiró una alícuota de muestra, con diluciones equivalentes a 100, 101, y 102. Luego se colocaron 100 ml de cada dilución en placas de TSA o infusión de cerebro corazón y se

### Prueba de superficie

Las pruebas de superficie se realizaron de acuerdo con la Asociación de Oficiales Químicos Analíticos por el método de dilución-uso.<sup>10</sup> Superficies de fórmica (1 cm X 2.5 cm) y acero inoxidable (arandelas de 15 mm) fueron preparadas remojando durante 30 minutos en lejía al 50% y luego enjuagando varias veces con agua des ionizada estéril. Luego se almacenaron en etanol al 70% hasta su uso. Las superficies tratadas se sumergieron en GS durante 15 minutos, se dejaron secar al aire y luego se inocularon con 100 µl de  $1 \times 10^6$  de MRSA, PA o EC en gotitas de 10 ml. Las superficies quedaron a temperatura ambiente (rango, 21-24°C) durante 30 minutos y luego se colocaron 10 ml de tampón de fosfato estéril salino (pH 7,2) y se agitó en vórtex durante 2 minutos. Entonces 100 µl de esta solución se sembraron en placas TSA. Diluciones de 1:10 y 1: 100 también se prepararon a partir de esta solución y plaquearon. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas, y se enumeraron las colonias.

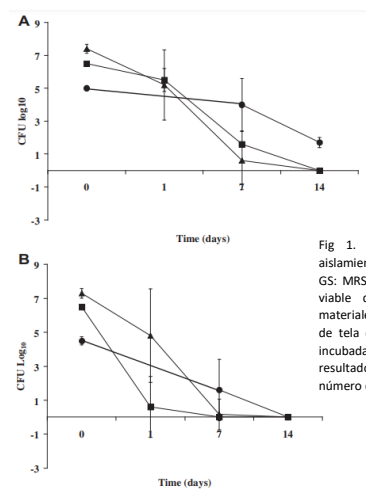
## RESULTADOS

### Pruebas de tejidos

Para determinar el impacto de GS se utilizó la tela de la bata de un paciente para la prueba. Se utilizó el producto GS en una solución al 5% a solicitud del distribuidor. Esta es la formulación que la empresa recomienda para

incubaron a 35°C durante 18-24 horas. Las colonias resultantes fueron contadas con el método apropiado. Las muestras se recolectaron el día 0, el día 1, el día 7 y día 14 sin lavar entre muestreos. La tela se dejó reposar a temperatura ambiente (rango, 21-24°C; humedad, 20% -40%) y estuvo expuesto al aire para el período entre muestreos. Las muestras fueron diluidas, sembradas e incubadas durante 48 horas a 35°C.

materiales lavados en condiciones normales de uso. Es más probable que las batas de los pacientes se almacenen durante varios días a semanas después del lavado antes de su uso. Para simular una aplicación más práctica, la tela se inoculó con bacterias y luego se mantuvo a temperatura ambiente expuesta al aire durante 14 días. Se realizó la recolección bacteriana inmediatamente después de la inoculación y luego en los días 1, 7, y 14 después de la inoculación. Los resultados se muestran en Figura 1. En este experimento, el material sin tratar demostró una descomposición mucho más lenta en el número de organismos recuperados en comparación con el material tratado. Además, la recuperación de PA y EC del material tratado tuvo una descomposición más lenta en comparación con los aislados de MRSA. Estos datos demuestran que GS es eficiente para reducir la cantidad de organismos viables en tejido contaminado.



## Pruebas de superficies

La capacidad del producto GS para inhibir la presencia de bacterias en superficies de formica y de acero inoxidable fue evaluada utilizando pruebas de portadores.<sup>10</sup> Las superficies estériles se prepararon con placas lavadas de formica y acero inoxidable. Para este experimento, se usó GS a una dilución del 1% que contenía un detergente no iónico al 10%, según lo solicitado por el distribuidor. Esta es la formulación que la empresa comercializa actualmente para su uso en superficies ambientales. Se descubrió que GS reduce la viabilidad de la carga bacteriana de MRSA en 2.4 log<sub>10</sub> en formica y en 0.5 log<sub>10</sub> en acero inoxidable, de PA se redujeron las cargas bacterianas en 0.6 log<sub>10</sub> y 0.8 log<sub>10</sub> respectivamente, y de CE se redujeron las cargas bacterianas en 0.9 log<sub>10</sub> y 0.6 log<sub>10</sub> respectivamente (Tabla 1). A diferencia de los desinfectantes que se deben volver a aplicar continuamente, el producto GS supuestamente ejerce un efecto antimicrobiano activo entre aplicaciones. Para detectar la actividad residual en las superficies, se volvieron a aplicar mediciones de cargas bacterianas 4 días después del último muestreo. Todavía se observó actividad inhibidora, aunque con una reducción del efecto. Para la contaminación por MRSA, la superficie de formica tuvo una reducción significativa de 2 log<sub>10</sub>, similar al resultado anterior. Sin embargo, las reducciones de MRSA viable en superficies de acero inoxidable y de PA viable en ambas superficies no alcanzó significación estadística. Por el contrario, la re aplicación de EC a estas superficies resultó en una reducción estadísticamente significativa de 0.2 log<sub>10</sub> en formica y 0.5 log<sub>10</sub> en acero inoxidable.

## DISCUSIÓN

El creciente número de organismos resistentes a los antibióticos que contribuyen a la infección, es una preocupación importante. Evaluamos un producto comercial conocido como GS en una solución al 5% para aplicación en tejidos y al 1% de dilución para su uso como tensioactivo antimicrobiano a instancias de un distribuidor comercial. GS es un organosilano a base de agua que forma un polímero de silicio-nitrógeno-carbono que se seca después de ser aplicado a una superficie. La supervivencia del organismo en superficies contaminadas se evita mediante rotura mecánica de membranas microbianas, induciendo así la lisis de los organismos. Este producto ha sido probado para citotoxicidad utilizando el método de con células de fibroblastos de ratón L-929 por NAMS Laboratorios (Northwood, OH) en agarosa de la Organización Internacional de Estandarización. Los resultados de esta prueba no publicada encontraron que el producto tiene una ligera reactividad, definida como una zona de lisis celular de 0 mm con algunas células malformadas o degeneradas. Esto se considera toxicidad de grado 1 y cae por debajo del estándar de grado 2 como agente citotóxico.<sup>11</sup> Estudios in vitro previos no publicados han encontrado que GS es capaz de reducir la carga bacteriana viable hasta en un 99.9% en material de algodón contaminado con cepas de la Colección Americana de tipos de cultivos (ATCC) *S. aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger* ([http://queenmar.net/resources/GTB-50\\_washesproject.pdf](http://queenmar.net/resources/GTB-50_washesproject.pdf)). Otro estudio in vitro no publicado realizado por la Universidad de Arizona, Departamento de Ciencia del Suelo, Agua y el Medio Ambiente encontró una reducción a largo plazo de las cepas ATCC de MRSA y enterococos resistentes a la vancomicina en la aplicación de GS utilizando

**Tabla 1. Organismos recuperados de superficies de formica y acero inoxidable tratados con GS**

Organism	Surface	Number of isolates	Log <sub>10</sub> untreated ± SD	Log <sub>10</sub> GS ± SD	Log <sub>10</sub> reduction <sup>*,†</sup>
MRSA	Formica	7	5.6 ± 0.18	3.1 ± 0.14	2.4 (P <.001)
MRSA	Stainless	5	3 ± 0.38	2.6 ± 0.19	0.5 (P = .03)
PA	Formica	6	3.8 ± 0.7	3.2 ± 0.86	0.6 (P = .05)
PA	Stainless	6	3.8 ± 0.7	3 ± 0.75	0.8 (P = .03)
EC	Formica	8	6.1 ± 0.021	5.9 ± 2.11	0.9 (P = .20)
EC	Stainless	8	6.3 ± 0.28	5.8 ± 0.18	0.6 (P <.001)
Rechallenge <sup>‡</sup>					
MRSA	Formica	4	5.4 ± 0.13	3.5 ± 0.13	2 (P <.001)
MRSA	Stainless	5	3 ± 0.15	2.3 ± 1.32	0.8 (P = .26)
PA	Formica	4	4.2 ± 0.37	4 ± 0.55	0.2 (P = .14)
PA	Stainless	4	4 ± 0.56	3.8 ± 0.44	0.2 (P = .71)
EC	Formica	8	6.2 ± 0.12	6.1 ± 0.11	0.2 (P = .01)
EC	Stainless	8	6.3 ± 0.27	5.8 ± 0.47	0.5 (P = .05)

Los resultados se expresan como la media del número de aislados que se muestran analizados por duplicado.

\* Reducción del crecimiento bacteriano informado como log<sub>10</sub> después de 30 minutos de contacto con GS.

† Valores de p calculados con la prueba t.

‡ El desafío con bacterias se realizó 4 días después del muestreo inicial.

metodología de prueba en superficies, con una reducción del 99.99% en bacterias viables durante una evaluación de 14 días. En ambos estudios, sin embargo, la aplicación del producto difiere de nuestra metodología. El estudio anterior aplicó el producto a material usando una lavadora comercial, mientras que este último aplicó el producto con un spray botella. Por el contrario, nuestro método de aplicación implicó remojo de todos los materiales en el producto. Otra diferencia en nuestra metodología es que usamos aislados clínicos obtenido de pacientes atendidos en nuestras instalaciones, mientras que los otros estudios evaluaron cepas de control ATCC. Bajo las condiciones de nuestro estudio, GS produjo reducciones considerables en MRSA viable y, en menor grado organismos PA. Una posible explicación para este hallazgo puede residir en la biología de *Pseudomonas*. PA es conocido por tener densidades de polisacáridos variables en la superficie de su pared estructural.<sup>12</sup> Puede ser que, bajo nuestras condiciones de cultivo, *Pseudomonas* se volvió más resistente a la interrupción mecánica por el producto GS. Otra explicación podría ser un efecto más débil del producto en la viabilidad de gramnegativas, como lo demuestran las reducciones menos significativas en los

aislados de EC en comparación con aislados de MRSA. Los estudios inéditos mencionados anteriormente se realizaron predominantemente en organismos grampositivos. Creemos que nuestro estudio, aunque limitado, proporciona más información sobre la utilidad del producto GS en cepas gramnegativas. Nuestras pruebas de superficies mostraron una inhibición menos pronunciada de organismos viables en comparación con las pruebas de tejidos. Los resultados de la prueba de superficie demuestran un efecto probado con una mayor inhibición observada en las superficies de formica (y en las telas) en comparación con las superficies de acero inoxidable. Estos hallazgos sugieren que la metodología utilizada para evaluar la eficacia de los tensioactivos antimicrobianos es de gran importancia y debe ser considerada cuidadosamente al analizar datos para la actividad antimicrobiana. Los análisis comparativos son necesario para determinar los procedimientos de aplicación óptimos y herramientas de evaluación para maximizar la inhibición bacteriana en varias superficies. Nuestros resultados demuestran que GS tiene actividad inhibidora. El beneficio adicional del producto es la composición amigable con el medio ambiente lo que puede fomentar su

uso en lugares inadecuado para otros agentes tóxicos. Basado en nuestro tejido y pruebas de superficies, parece que la actividad inhibidora de GS depende del organismo y quizás también de la composición de la superficie. La evaluación adicional es necesaria para verificar adecuadamente las afirmaciones de longevidad del producto sobre superficies tratadas con una mayor variedad de organismos grampositivos y gramnegativos.

**Los autores agradecen a Mary Perri, tecnóloga senior de laboratorio, Megana Hedni, Kylie Huitsing y la Dra. Laura Johnson, MD, epidemióloga de la División de Enfermedades Infecciosas del Hospital Henry Ford por su asistencia técnica y revisión de este manuscrito.**

## **Bibliografía**

1. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
2. Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med* 2006;166: 1945-51.
3. Merrer J, Santoli F, Appere de Vecchi C, Tran B, De Jonghe B, Outin H. Colonization pressure and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;11:718-23.
4. Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* 1998;4: 416-20.
5. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis* 2006;39:776-82.
6. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis* 2006;42(Suppl 2):S82-9.
7. Roberts RR, Scott RD 2nd, Cordell R, Solomon SL, Steele L, Kampe LM, et al. The use of economic modeling to determine the hospital costs associated with nosocomial infections. *Clin Infect Dis* 2003;36: 1424-32.
8. Duckro AN, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med* 2005;165:302-7.
9. American Association of Textile Chemists and Colorists. AATCC test method 100-1999, assessment of antibacterial finishes on textile materials: technical manual. Research Triangle Park, NC: American Association of Textile Chemists and Colorists; 2002.
10. Tomasino SF, Fiumara RM, Cottrill MP. Enumeration procedure for monitoring test microbe populations on inoculated carriers in AOAC use-dilution methods. *J AOAC Int* 2006;89:1629-34.
11. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, part 5: tests for in vitro cytotoxicity; 1999.
12. Misumi H, Umeda A, Eguchi K, Okada K, Sawae Y, Niho Y, et al. Characterization of the external surfaces of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human blood and respiratory tract. *J Med Microbiol* 1994;40:282-7.