

Inactivación de desinfectantes utilizando placas de contacto ICR con medio de cultivo TSA con diferentes neutralizantes

Resumen

Este estudio resume los resultados de las pruebas para tres desinfectantes fabricados por Laboratorios Anios¹. La eficiencia de neutralización se probó con placas listas para el uso del portafolio ICR por el método de siembra directa en placa. Se usaron placas TSA de contacto con lecitina y Tween® 80 (LT)² y la placa Neutralizante A.

Introducción

Para el monitoreo ambiental de superficies o personal en salas limpias³, RABS y aisladores, se usaron medios de cultivo no selectivos con buenas propiedades de promoción de crecimiento para una gama amplia de microorganismos.

Las razones para adicionar neutralizantes a los medios de cultivo se explican claramente en la USP <1116>⁴ y la Guía Aséptica de la FDA (2004)⁵ que establece: "Cuando sea apropiado, se deben usar agentes inactivadores para prevenir la inhibición del crecimiento por desinfectantes usados en las salas limpias o residuos de productos (por ejemplo, antibióticos) ", así como en la ISO 14698-1 donde se describe lo siguiente: "Se incluirán aditivos apropiados para superar o minimizar los efectos de actividad antimicrobiana residual en el punto de muestreo, cuando se sospeche de éstos".

La actividad antimicrobiana puede estar representada por:

- Residuos de desinfectantes o sanitizantes en superficies.
- Residuos de VHP después de los procedimientos de descontaminación.
- Antibióticos en el entorno de producción.

Para superar las actividades antimicrobianas y evitar resultados falsos negativos, los medios de cultivo se desarrollaron con los neutralizantes o enzimas adecuadas para facilitar el crecimiento de microorganismos.

La capacidad de los medios de cultivo para permitir que estos microorganismos se desarrollen depende de la actividad de los residuos de desinfectante en la superficie. Los residuos del desinfectante pueden reactivarse durante el proceso de muestreo de la superficie por la humidificación que genera la placa de contacto.

La carga de residuos, que está presente en una superficie seca después de la desinfección o sanitización, varía con el tipo de agente activo. Los ingredientes como alcohol o peróxido de hidrógeno se reducen significativamente debido a la evaporación o por la tendencia química a formar residuos no tóxicos, mientras que sustancias activas como componentes de amonio cuaternario, aldehídos o biguanidas dejan residuos estables en la superficie después de la desecación y pueden ser reactivados.

Neutralizantes recomendados para varios ingredientes activos (Tabla 1).

Tabla 1: Neutralizante adecuado para diferentes desinfectantes.

Desinfectante	Suitable Neutralizer
Alcohol (ejemplo IPA, etanol) (Volatile)	Tween® 80 o dilución
Aldehídos	Sodio hidrogeno sulfuro, tiosulfato de sodio, glicina, histidina
Hipoclorito de sodio	Tiosulfato de sodio
Biguanidas (ejemplo clorhexidina) (polihexametilen biguanidas no incluidas)	Lecitina
Componentes de Amonio Cuaternario (QAC)	Tween® 80
Fenólicos	Tween® 80, lecitina
Ácido Peracético	Tampón (ejemplo tampón fosfato)
Peróxido de Hidrógeno (VHP) (degradación de productos no tóxicos)	Piruvato, catalasa
Antibióticos, ejemplo antibióticos beta-lactámicos	Enzimas, ejemplo beta-lactamasas

Para obtener más información, ver también USP: <61> y <1227>; EP: 2.6.12 e ISO 18593.

En este estudio evaluamos la eficiencia de dos placas de contacto en el peor escenario posible, utilizando el "Método de siembra directa". Por lo tanto, los desinfectantes se extienden directamente sobre la superficie del agar de las placas de contacto (25 µL para placas de 55 mm).

Después de un tiempo de exposición estandarizado (15-20 min.) las placas tratadas y las placas control (sin desinfectante) son inoculadas con cepas de prueba. Las placas de prueba y las placas control son del mismo lote.

Con respecto a las pruebas realizadas previamente con compuestos de amonio cuaternario y polihexametileno biguanidas, se puede concluir que 25 µL de desinfectante por placa en la "Método de siembra directa" dará resultados comparables al método de prueba orientado a la práctica (datos no mostrados).

Introducción

Medio de Cultivo

En este estudio, la eficiencia del neutralizante se ensayó con Placa de contacto Neutralizante A ICR+ y placa de contacto TSA+LT (Tabla 2)

Tabla 2: Placas de contacto analizadas

Producto	No Cat.	Descripción de Producto
Neutralizer A Contact – ICR+	146697	Placas de contacto con cierre para recuento total viable con Neutralizante A (mezcla) ⁶
Tryptic Soy Contact Agar +LT – ICR+	146552	Placas de contacto con cierre para recuento total viable con lecitina y Tween® 80 (LT) ⁷

Cepas analizadas

En la **tabla 3** se listan cepas y condiciones de incubación usadas para el análisis de la tasa de recuperación

Tabla 3: Lista de cepas analizadas (ATCC®)⁸ y condiciones de incubación

Cepas de prueba	Temperatura de Incubación (°C)	Tiempo de Incubación (días)
Bacillus subtilis (ATCC® 6633) (WDCM 00003)		
Pseudomonas aeruginosa (ATCC® 9027) (WDCM 00026)	30-35	≤ 3
Staphylococcus aureus (ATCC® 6538) (WDCM 00193)		
Staphylococcus epidermidis (ATCC® 14990) (WDCM 00132)		
Candida albicans (ATCC® 10231) (WDCM 00054)	20-25	≤ 5
Aspergillus brasiliensis (ATCC® 16404) (WDCM 00053)		

Desinfectantes

Los siguientes desinfectante fueron usados (**tabla 4**) para el análisis de la eficiencia de neutralización

Tabla 4: Lista de desinfectantes analizados en este reporte

Desinfectante	proveedor	ingredientes activos
Surfanios Premium IP estéril PAE ⁹	Anios	<ul style="list-style-type: none">• N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamino• Didecidimetilamonio cloruro• Propan-2-ol
niosurf ND Premium IP estéril PAE ¹⁰	Anios	<ul style="list-style-type: none">• Didecidimetilamonio cloruro• Propan-2-ol,• Ácido D-glucónico, componente con N,N'-bis (4-clorofenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecano diamidina (2:1) Aminas, N-C12-14-alquiltrimetiledi-
Anioxy Spore-Twin IP Concentrado estéril ¹¹	Anios	<ul style="list-style-type: none">• Peróxido de hidrógeno• Ácido acético• Ácido peracético

Método

Preparación de las cepas analizadas

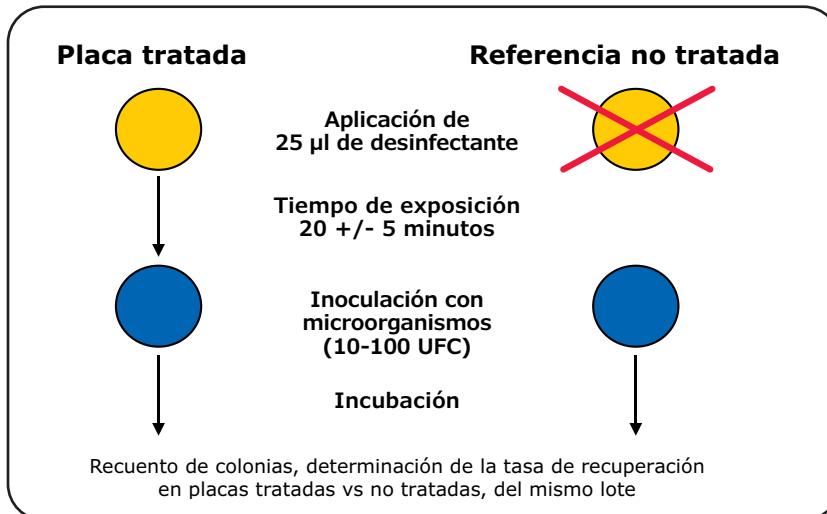
- Las cepas son recuperadas una vez a la semana desde cultivos de reserva en Agar Sangre Columbia (bacterias) o Agar Glucosa Sabouraud (levaduras y hongos)
- Los Sub-cultivos son preparados como cultivos de toda una noche antes de ser usados
- Las diluciones son preparadas en Solución tampón NaCl para tener una concentración de 10-100 UFC en el inóculo final.

Prueba de Inoculación Directa en superficie independiente

- Para analizar la eficiencia de inactivación a través de la prueba de inóculo directo, el desinfectante se esparció sobre la superficie del agar usando una espátula Drigalski (vidrio, 146 x 45 mm)
- Después de un tiempo de exposición de 20 +/- 5 minutos, las placas a analizar fueron inoculadas con la cepa recomendada, entre 10-100 UFC, usando la espátula Drisalski.
- Placas control del mismo lote fueron inoculadas e incubadas en paralelo, pero sin desinfectante.
- Las placas se incubaron como indica la **Tabla 2**.
- Cada condición experimental se repitió 5 veces
- La neutralización de los desinfectantes de las placas analizadas, se definió como suficiente si, la tasa de recuperación en las placas analizadas con 25 µl de desinfectante esta entre 50-200%, comparadas con placas control (sin desinfectante)

Un volumen de 25 µl por placa de contacto de 55 mm de diámetro corresponde a 10 ml de desinfectante por m². El flujo de trabajo se muestra a continuación en la **figura 1**.

Figura 1: Flujo de Trabajo de la prueba de inoculación directa.

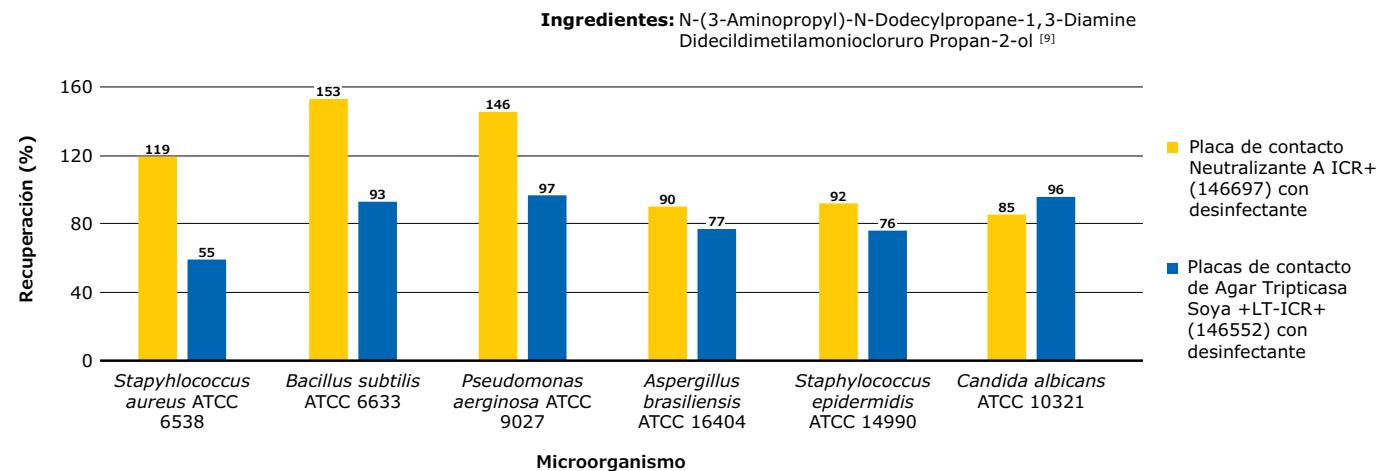


Resultados

La capacidad de neutralizar ingredientes activos de varios tipos de desinfectantes en placas de contacto, fué analizado por pruebas de inoculación directa

Neutralización de Surfanios Premium IP estéril PAE

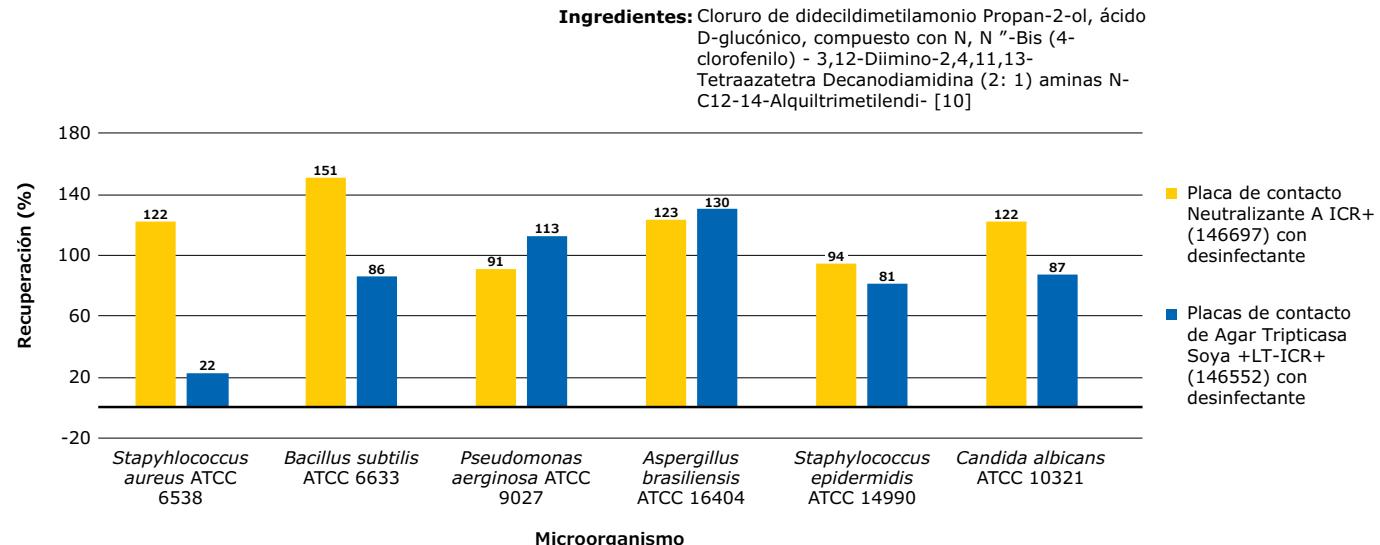
Figura 2. Recuperación de cepas en placas de contacto Neutralizante A ICR+ (146697) y Placas de contacto de Agar Trypticasa Soya- LT-ICR+ (146552) en presencia de 25 μ l del desinfectante Surfanios Premium IP estéril PAE



Los resultados muestran que todos los microorganismos analizados pueden ser recuperados en presencia de 25 μ l del desinfectante Surfanios Premium IP Estéril PAE (Fig. 2), indicando la eficiencia de neutralización de residuos activos del desinfectante por neutralizantes incluidos.

Neutralización del desinfectante Aniosurf ND Premium IP estéril PAE

Figura 3: Recuperación de las cepas analizadas en placas de contacto Neutralizante A ICR+ (146697) y Agar Tryptic Soya +LT-ICR+ (146552) en presencia de 25 μ l del desinfectante Aniosurf ND Premium IP estéril PAE

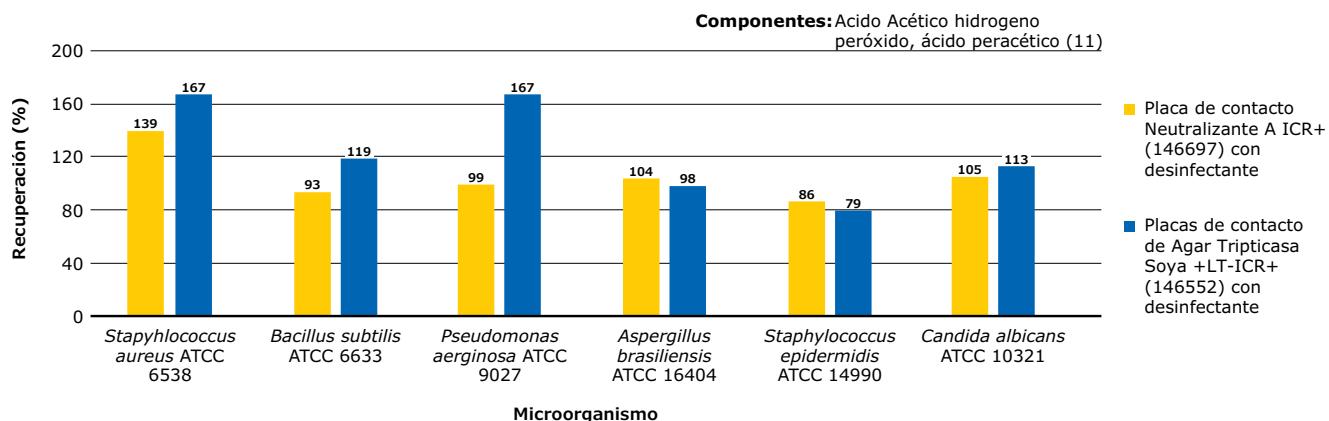


Los resultados muestran que todos los microorganismos analizados pueden ser recuperados en presencia de 25 μ l del desinfectante Aniosurf ND Premium IP estéril PAE. (Figura 3)

Las tasas de recuperación para *Staphylococcus aureus* son bajas en agar TSA con LT, mientras que en las placas con Neutralizante A, muestra propiedades de inactivación excelente. Los resultados confirman, que para altas concentraciones de componentes de amonios cuaternarios combinados con digluconato clorhexidina, los neutralizantes Lecitina y Tween® 80 no son suficientes. Para este tipo de componentes se necesita neutralizantes adicionales presentes en la mezcla de la placa Neutralizante A, como previamente se reportó por Hedderich y Kless¹²

Neutralización del concentrado de Anioxy Spore-Twin IP estéril

Figura 4: Recuperación de cepas en placas de contacto Neutralizante A ICR+ (146697) y Agar Trypticasa Soya +LT-ICR (146552) en presencia de 25 μ l de concentrado estéril de Anioxy Spore-Twin IP (dilución de acuerdo a las instrucciones del fabricante)



Los resultados muestran que todos los microorganismos usados pueden ser recuperados en presencia de 25 μ l del desinfectante estéril concentrado Anioxy Spore-Twin IP, indicando la eficiencia de neutralización de los residuos activos del desinfectante por los neutralizantes adicionados (figura 4).

Discusión y Conclusión

Este estudio resume los resultados de la eficiencia de neutralización en placas de contacto TSA que contienen lecitina y tween® 80, o mezcla de Neutralizante A como agentes inactivantes. La eficiencia de neutralización para inactivar el desinfectante, es suficiente cuando la tasa de recuperación de los microorganismos es mayor a 50%, en pruebas de inoculación directa.

Los tres desinfectantes analizados surfanios premium IP estéril PAE, Aniosurf ND Premium IP estéril PAE, y concentrado de Anioxy Spore-Twin IP estéril pueden ser neutralizados por placas de contacto Neutralizante A ICR+, mientras que las placas de contacto TSA +LT ICR+ son adecuadas para inactivar las diluciones de trabajo recomendadas de Anioxy spore Twin y Surfanios, pero no es eficiente para inactivar el desinfectante Aniosurf ND en las concentraciones analizadas.

Neutralización del concentrado de Anioxy Spore-Twin IP estéril

1. Laboratoires Anios
Pavé du moulin
59260 Lille-Hellemmes
France
2. Tween es una marca registrada de Croda International PLC, Reino Unido
3. Salas limpias y entornos controlados asociados -
Control de biocontaminación - Parte 1:
Principios y métodos generales (ISO 14698-1: 2003)
4. Farmacopea de los Estados Unidos 40 NF 35<1116> Control microbiológico y
monitoreo de entornos de procesamiento aséptico
5. Orientación de la FDA para la industria (2004):
Productos de drogas estériles producidos por procesamiento aséptico -
Buenas prácticas de fabricación actuales
6. Contacto neutralizador A - ICR + Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, 2016 Ficha
técnica Neutralizador A - Contacto - ICRplus Número de pedido: 1.46697.0020 / 1.46697.0200
7. Tripticasa Soja Contacto Agar + LT ICR+
Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2016
Ficha Técnica
Trríptico Soja Contacto Agar + LT - ICRplus
Número de pedido: 1.46552.0020 / 1.46552.0200
8. ATCC® es una marca registrada de American Type Culture Collection (ATCC) 10801
University Boulevard Manassas, VA 20110 EE. UU.
9. LABORATOIRES ANIOS, 11.05.2015
HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (REGLAMENTO (CE) n ° 1907/2006 - ALCANCE)
SURFANIOS PREMIUM IP ESTERILE CONCENTRE - 2590000 Versión 6.1
10. LABORATOIRES ANIOS, 12.03.2015
HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (REGLAMENTO (CE) n ° 1907/2006 - ALCANCE)
ANIOSURF ND PREMIUM - 2436000 Version 4.2
11. LABORATOIRES ANIOS, 26.05.2015
HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (REGLAMENTO (CE) n ° 1907/2006 - ALCANCE)
CONCENTRO ESTÉREO IP TWIN DE ANIOXY-SPORE - 2343000 Versión 2.1
12. Hedderich R. and Klees A.-G. (2012):
Neutralización de desinfectantes por medios de cultivo utilizados en monitoreo
ambiental; Monitoreo ambiental: un manual completo, volumen 6; 159-180.

Merck entrega información y asesoramiento a nuestros clientes sobre tecnologías de aplicación y asuntos regulatorios según nuestro mejor conocimiento y capacidad, pero sin obligación o responsabilidad. Las leyes y regulaciones existentes para cada caso, deben ser revisadas por nuestros clientes. Esto también aplica respecto a cualquier derecho de terceros. Nuestra información y asesoramiento no exime a nuestros clientes de su propia responsabilidad de verificar la idoneidad de nuestros productos para el fin previsto. ATCC® es una marca registrada de ATCC, Manassas, VA, EE. UU. Tween® 80 (LT) es una marca registrada de Croda International PLC, Reino Unido.

Merck KGaA
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, Germany

Para hacer ordenes de compra o recibir asistencia técnica. Por favor contactar a su distribuidor local Merck.

Para consultas técnicas también puede contactar: Merckmillipore.com/techservice

MerckMillipore.com

