

Revista de Saúde Pública

Journal of Public Health

Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar

Evaluation of bacterial contamination in disinfectants for domestic use

Fumie Miyagi, Jorge Timenetsky e Flávio Alterthum

*Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
São Paulo, SP, Brasil*

Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar*

Evaluation of bacterial contamination in disinfectants for domestic use

Fumie Miyagi, Jorge Timenetsky e Flávio Alterthum

Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Desinfetantes, análise[#]. Compostos de benzalcônio, farmacologia[#].

Burkholderia cepacia, efeito drogas[#]. *Alcaligenes xylosoxidans*, efeito drogas[#]. *Serratia marcescens*, efeito drogas[#]. Contaminação. Resistência microbiana a drogas.

Keywords

Disinfectants, analysis[#]. Benzalkonium compounds, pharmacology[#].

Burkholderia cepacia, drug effects[#]. *Alcaligenes xylosoxidans*, drug effects[#]. *Serratia marcescens*, drug effects[#]. Contamination. Drug resistance, microbial.

Resumo

Objetivo

Avaliar desinfetantes de uso domiciliar, identificando a presença de bactérias contaminantes, e conhecer o nível de tolerância dessas bactérias ao cloreto de benzalcônio.

Métodos

Foram adquiridas aleatoriamente no comércio da região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil, 52 amostras de desinfetantes de uso domiciliar para análise quanto à presença de bactérias contaminantes. O nível de tolerância dessas bactérias ao cloreto de benzalcônio foi determinado pelo método da macrodiluição em caldo.

Resultados

De 52 amostras, 16 (30,77%) estavam contaminadas por bactérias Gram negativas, com contagens variando entre 10⁴ e 10⁶ UFC/ml. Esses contaminantes foram identificados como *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* e *Serratia marcescens*. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM: mg/ml) do cloreto de benzalcônio para *S. marcescens*, *A. xylosoxidans* e *B. cepacia* foram: 2,48, 1,23 e 0,30, respectivamente.

Conclusões

Os desinfetantes de uso domiciliar à base de compostos de amônio quaternário são passíveis de contaminação por bactérias. As CIM do cloreto de benzalcônio para as bactérias contaminantes estavam abaixo das concentrações do princípio ativo presente nos desinfetantes, indicando que a tolerância ao biocida não é estável, podendo ser perdida com o cultivo das bactérias em meios de cultura sem o biocida.

Abstract

Objective

To evaluate disinfectants for domestic use for the presence of bacteria, identify them, and determine their tolerance level to benzalkonium chloride.

Methods

Fifty-two samples of commercially available disinfectants for domestic use were acquired at random in the metropolitan area of São Paulo, Brazil, and analyzed to detect the presence of bacterial contaminants. The isolated organisms were identified and their tolerance level to benzalkonium chloride was determined by broth macrodilution method.

Correspondência para/Correspondence to:

Flávio Alterthum
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária
05508-900 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: falterth@usp.br

*Parte da dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1999.

Edição subvencionada pela Fapesp (Processo nº 00/01601-8).

Recebido em 4/11/1999. Reapresentado em 2/6/2000. Aprovado em 27/6/2000.

Results

Sixteen (30.77%) of fifty-two disinfectants sampled were contaminated by Gram-negative bacteria, with counts varying between 10^4 and 10^6 UFC/ml. *Alcaligenes xylooxidans*, *Burkholderia cepacia* and *Serratia marcescens* were the predominant organisms found. The minimum inhibitory concentration (MIC: $\mu\text{g/ml}$) of benzalkonium chloride for these bacteria were 2.48, 1.23 and 0.30 to *S. marcescens*, *A. xylooxidans* and *B. cepacia*, respectively.

Conclusions

The disinfectant formulation containing quaternary ammonium compounds (QACs) may be exposed to contamination by Gram-negative bacteria. The MICs of benzalkonium chloride against the isolated bacteria were low, indicating that the bacteria grown in culture media without QACs lost their tolerance to this biocide.

INTRODUÇÃO

Os compostos de amônio quaternário (QAC) são largamente utilizados como antisépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbicida. Esses compostos são considerados antimicrobianos de pequeno espectro de ação, por agirem sobre bactérias não esporuladas, fungos e vírus com envoltório lipídico, inativando-os, não sendo, porém, capazes de inativar esporos bacterianos, micobactérias e vírus sem envoltório.⁷

A atividade antimicrobiana dos QAC foi descoberta por Domagk em 1935. A partir de então, esses compostos passaram a ter grande importância comercial, sendo sintetizados inúmeros derivados, com toxicidade e espectro de ação diversos.⁹

Dentre os QAC, comumente utilizados como antisépticos e desinfetantes, estão os sais de monoalquil trimetil amônio, monoalquil dimetil benzil amônio (cloreto de benzalcônio – BAC) e o amônio heteroaromático, entre outros.

Os produtos à base de QAC são largamente utilizados em indústrias de alimentos e domicílios por serem eficientes como desinfetantes de uso geral, com baixa toxicidade, além de não serem corrosivos e apresentarem ação surfactante.

Apesar de não se conhecer detalhadamente o mecanismo de ação dos QACs sobre a célula microbiana, é amplamente aceito que atuam sobre membranas, tendo como alvo predominante a membrana citoplasmática, causando perda estrutural na sua organização e integridade, junto a outros efeitos danosos para a célula microbiana, como o extravasamento dos componentes celulares devido ao rompimento da membrana, além de desnaturação de proteínas e enzimas.⁹

Entretanto, entre os QAC, particularmente os produtos à base de BAC têm apresentado problemas de contaminação por bactérias Gram-negativas, sendo citados isolamentos de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *Alcaligenes xylooxidans* de desinfetantes de uso hospitalar.^{10,12,13} No Brasil, há relato de isolamento de *Enterobacter* spp de desinfetante de uso domiciliar.¹⁴ Esses organismos são considerados patógenos oportunistas, podendo ser responsáveis por infecções hospitalares.

A menor suscetibilidade das bactérias Gram-negativas a esses compostos, em comparação às Gram-positivas, está relacionada à presença da membrana externa, de natureza lipoprotéica, que age como uma barreira, limitando a entrada de muitos tipos de agentes antibacterianos quimicamente não relacionados.

Entretanto, algumas bactérias Gram-negativas têm mostrado alto nível de resistência a muitos antisépticos e desinfetantes, como *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, e *Proteus* spp,⁷ havendo ainda relatos de sobrevivência de *S. marcescens* em clorexidina,⁶ *P. aeruginosa*² e *P. cepacia*¹ em soluções à base de iodo.

A maior resistência dessas bactérias parece estar relacionada a uma adaptação fisiológica em resposta à mudança no ambiente,⁷ principalmente com alterações na membrana externa das células. Em *P. aeruginosa*, observou-se que há uma diferença na composição do lipopolissacarídeo (LPS) e aumento no conteúdo do íon Mg^+ , que fortalece as ligações entre os LPS. Além disso, a presença de porinas de baixa eficiência impede a difusão de moléculas para o interior da célula. Em *B. cepacia*, o alto conteúdo de arabinose ligado ao fosfato no seu LPS parece diminuir a afinidade da membrana externa às moléculas catiônicas.⁷

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar alguns desinfetantes de uso domiciliar comercializados quanto à presença de contaminantes, quantificando e identificando-os, além de conhecer o nível de resistência dessas bactérias ao BAC. Procurou-se ainda avaliar esses desinfetantes contaminados quanto à sua atividade biológica.

MÉTODOS

A amostra constituiu-se de 52 desinfetantes de uso domiciliar adquiridos aleatoriamente no comércio da região metropolitana de São Paulo, SP, no período de 1997 a 1998.

Determinação da presença de bactérias nos desinfetantes

Para o isolamento e identificação de bactérias foram utilizados: ágar tripticase soy – TS (Oxoid); ágar Mc Conkey (Oxoid); ágar cetrimide (Oxoid); ágar Salmonella-Shigella (Oxoid); ágar triple sugar iron – TSI (Difco); tiras para prova de oxidase (NewProv).

As amostras dos desinfetantes foram semeadas por estria nos quatro meios de cultura e incubadas a 37°C por 24h a 48h. Em caso de aparecimento de colônias, essas foram isoladas para os seguintes testes: coloração de Gram, teste de oxidase e formas de utilização de carboidratos em ágar TSI. O isolamento e as identificações foram realizados em amostras com bactérias viáveis na ocasião da primeira contagem.

A contagem das bactérias presentes nos desinfetantes foi realizada utilizando-se 1 ml das amostras e plaqueando, pelo método de *pour plate* das suas diluições decimais, em duplicatas. As placas foram incubadas a 37°C por 24h a 48h. Realizaram-se duas contagens, na mesma amostra, num intervalo de um ano.

Avaliação da eficiência dos desinfetantes

Foram utilizados cilindros carreadores de aço inox tipo 304. Os microrganismos-teste foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

As amostras foram analisadas conforme o método da diluição com carreadores, adotado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS),⁴ simplificado.¹⁴ Esse método consiste no uso de dez cilindros carreadores subcultivados em conjunto, após contato com o desinfetante. Para a

análise dos desinfetantes contaminados, as amostras foram previamente filtradas em filtro Millipore, com porosidade de 0,22 mm.

Determinação da concentração inibitória mínima ao QAC

Foi utilizado cloreto de benzalcônio Empigen BAC 80 (Albright & Wilson).

Foram testadas as bactérias isoladas dos desinfetantes, além de duas padrão (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). As bactérias isoladas dos desinfetantes foram conservadas em caldo nutriente e glicerol (1:1) e congeladas a -70°C, sendo mantidas sem contato com QAC. Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o método da macrodiluição em caldo.¹⁵

RESULTADOS

Determinação da presença de bactérias nos desinfetantes

Cinquenta e duas amostras de desinfetantes de uso domiciliar, todas dentro do prazo de validade indicado pelos fabricantes, foram analisadas quanto à presença de bactérias contaminantes. Constatou-se a presença de bactérias em dezesseis produtos (30,77%) provenientes de seis fabricantes.

Isolamento e identificação. Na triagem das bactérias isoladas, constatou-se que todas eram bacilos Gram-negativos, não fermentadoras e oxidase-positivas. Apenas uma amostra acusou a presença de bactérias oxidase-negativas, fermentadoras de glicose e lactose-negativas, o que permitiu a divisão das bactérias isoladas em dois grupos: (1) Gram-negativas, oxidase-negativas, fermentadoras de glicose e lactose-negativas; (2) Gram-negativas, oxidase-positivas e não fermentadoras. As bactérias isoladas foram identificadas como pertencentes a três espécies, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* e *Serratia marcescens*, associadas em uma mesma amostra ou isoladas (Tabela 1).

Contagem. O número de bactérias viáveis variou entre 10⁴ e 10⁶ UFC/ml nas duas contagens realizadas, e não foram constatados indícios de crescimento desses microrganismos nos desinfetantes analisados (Tabela 2). As amostras 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15 e 16 não apresentaram alterações significativas nas duas contagens, e as amostras 2 e 11 tiveram redução de um log. As bactérias detectadas nas amostras 1, 4 e 5 não permaneceram viáveis até a ocasião da primeira contagem, e na amostra 14 perderam viabilidade até a ocasião da segunda contagem.

Tabela 1 – Identificação das bactérias isoladas dos desinfetantes contaminados. São Paulo, SP.

Amostra	Bactérias isoladas Identificação	Conf.(%)
2	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	92
	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
3	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	95
	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
6	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
7	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
8	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
9	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	(PB) 45
	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
10	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	99
	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
11	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
12	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	(PB) 99
	<i>Burkholderia cepacia</i>	99
13	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	99
14	<i>Burkholderia cepacia</i>	60
15	Não identificada	99
16	<i>Serratia marcescens</i>	97/84
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	(PB)

Conf.: percentual de confiabilidade da identificação
(PB): provável identificação de acordo com as provas bioquímicas

Tabela 2 – Contagem total (UFC/mL) de bactérias presentes nos desinfetantes contaminados. São Paulo, SP.

Amostra	Bactérias viáveis	Contagem total (UFC/mL) ^a		Fabricante
		1 ^a contagem	2 ^a contagem	
1	+	s/ cresc. ^b	s/ cresc. ^b	a
2	+	2,5 x 10 ⁵	6,1 x 10 ⁴	b
3	+	1,6 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	b
4	+	s/ cresc. ^b	s/ cresc. ^b	a
5	+	s/ cresc. ^b	s/ cresc. ^b	a
6	+	7,5 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴	b
7	+	8,9 x 10 ⁴	5,9 x 10 ⁴	b
8	+	1,0 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	b
9	+	8,8 x 10 ⁵	5,1 x 10 ⁵	c
10	+	6,3 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵	c
11	+	1,6 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁴	c
12	+	2,9 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁵	d
13	+	5,4 x 10 ⁵	7,5 x 10 ⁵	b
14	+	6,4 x 10 ⁵	s/ cresc. ^b	e
15	+	3,9 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁵	f
16	+	1,8 x 10 ⁵	8,2 x 10 ⁵	c

a: as contagens foram realizadas em intervalos de um ano
b: não detectado presença de bactérias viáveis após período de um ano

Avaliação da eficiência dos desinfetantes

Conforme a Portaria Nº 15 de 23/08/1988 do Ministério da Saúde, os desinfetantes de uso domiciliar devem ser avaliados quanto a sua ação antimicrobiana, utilizando-se como padrão o *Staphylococcus aureus* e a *Salmonella choleraesuis*. No presente estudo, foi incluído também a *Pseudomonas aeruginosa*, recomendada na avaliação de desinfetantes hospitalares para superfícies fixas.⁴

Desinfetantes não contaminados. Foram analisadas 33 amostras de desinfetantes não contaminados quanto a sua eficiência para uso domiciliar. Quatorze desinfetantes (42,42%) foram eficientes e dezenove (57,58%)

não foram capazes de inativar as bactérias-teste.

Dos desinfetantes eficientes para uso domiciliar, 9 amostras inativaram as 3 bactérias-padrão, e 5 foram eficazes contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. Em relação aos desinfetantes que foram classificados como ineficazes para uso domiciliar, 3 inativaram apenas *S. aureus*, 5 agiram somente contra *S. choleraesuis*, 8 foram eficazes contra *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*, e 3 não tiveram ação sobre nenhum dos padrões.

Desinfetantes contaminados. Dentre os desinfetantes contaminados, foram analisados 11 produtos quanto a sua eficiência após descontaminação por filtração. Seis (54,5%) foram capazes de inativar *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *S. aureus* ou os dois últimos. Assim, apesar de permitirem a viabilidade de alguns tipos de bactérias, os desinfetantes analisados após descontaminação foram eficientes contra microrganismos-padrão, indicando que o biocida ainda continuava ativo. As demais (45,5%) foram consideradas ineficazes por permitirem o crescimento de *S. choleraesuis* ou *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*.

Determinação da concentração inibitória mínima ao QAC. As CIM (mg/mL) do cloreto de benzalcônio foram 2,48, 1,23 e 0,30, para *S. marcescens*, *A. xylosoxidans* e *B. cepacia*, respectivamente. Esses valores foram dezenas de vezes maiores em relação aos encontrados para as bactérias utilizadas como referência: 0,0196 para *E. coli* e <0,0011 para *S. aureus*.

DISCUSSÃO

As bactérias isoladas já são conhecidas na literatura como contaminantes em antisépticos e desinfetantes à base de compostos de amônios quaternários, em que são citadas também outras espécies do gênero *Pseudomonas* por outros autores^{10,12,13} com contagens na faixa de 10² e 10⁷ UFC/ml,^{10,12-14} mas sem evidências de metabolização desses compostos.^{5,11}

As CIM do cloreto de benzalcônio para as bactérias isoladas dos desinfetantes estavam bem abaixo das concentrações do princípio ativo presente nos mesmos, indicando perda de tolerância ao biocida após cultivo em meios de cultura sem o princípio ativo.

Apesar de não se conhecer o mecanismo exato de resistência dessas bactérias aos compostos de amônio quaternário, supõe-se que ocorre uma regulação metabólica induzida pela presença do biocida, principalmente na membrana externa das células, ou seja, na camada lipopolissacarídica. Em *Enterobacter cloacae* tolerante ao cloreto de tetradecil dimetilbenzil amônio,

foi observado alto conteúdo lipídico, crescimento de bactérias com cápsulas grandes e colônias viscosas.¹¹ Para *P. aeruginosa* adaptada em brometo de didecildimetil amônio, foi observado aumento nos ácidos graxos hidroxilados, sugerindo modificações também no lipídeo A, limitando a penetração do biocida pela membrana externa e mantendo a fluidez da membrana para a sobrevivência e crescimento da célula em presença do biocida.⁸ Em *B. cepacia*, não foram verificadas alterações nas características nutricionais ou bioquímicas entre isolado clínico, resistente a 0,05% de cloreto de benzalcônio e com resistência induzida a 16% do biocida, observando-se apenas redução da virulência entre os três grupos.³

As alterações na camada lipopolissacarídica foram observadas também em relação às bactérias resistentes a outros antimicrobianos. Em *S. marcescens* resistente à clorexidina, foi constatada a presença de material polissacarídico formando matriz fibrosa que protegeria a célula bacteriana.⁶ Esse material

extracelular foi observado também em *P. cepacia*¹ e *P. aeruginosa*² resistentes a soluções à base de iodo.

Esses organismos adaptados têm suscetibilidade reduzida a compostos relacionados, como o cloreto de benzalcônio e clorexidina. Porém, são mais sensíveis a outros compostos como o cloro e os compostos fenólicos, cujos modos de ação são completamente diferentes dos compostos de amônio quaternário.^{5,8}

Seis amostras, apesar de contaminadas, foram eficientes quando avaliadas utilizando-se bactérias-padrão para desinfetantes de uso domiciliar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldemar Francisco, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e ao Laboratório Fleury (São Paulo), pelo auxílio na identificação das bactérias.

REFERÊNCIAS

- Anderson RL, Vess RW, Panlilio AL, Favero MS. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:3598-600.
- Berkelman RL, Anderson RL, Davis BJ, Highsmith AK, Petersen NJ, Bond WW et al. Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution: investigation of the implicated manufacturing plant. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:752-6.
- Geftic SG, Heymann H, Adair FW. Fourteen year survival of *Pseudomonas cepacia* in a salts solution preserved with benzalkonium chloride. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:505-10.
- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. *Manual de saneantes*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1991.
- Langsrud S, Sundheim G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J Appl Microbiol* 1997;82:705-12.
- Marrie TJ, Costerton JW. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 1981;42:1093-102.
- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-79.
- Méchin L, Dubois-Brissonnet F, Heyd B, Leveau JY. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cell. *J Appl Microbiol* 1999;86:859-66.
- Merianos JJ. Quaternary ammonium compounds. In: Block SS. *Disinfection, sterilization, and preservation*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 225-55.
- Nakashima AK, Highsmith AK, Martone WJ. Survival of *Serratia marcescens* in benzalkonium chloride and in multiple-dose medication vials: relationship to epidemic septic arthritis. *J Clin Microbiol* 1987;25:1019-21.
- Nishikawa K, Oi S, Yamamoto T. A bacterium resistant to benzalkonium chloride. *Agric Biol Chem* 1979;43:2473-8.
- Oie S, Kamiya A. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. *Am J Infect Control* 1996;24:385-95.
- Oie S, Kamiya A. Microbial contamination of antiseptic-soaked cotton balls. *Biol Pharm Bull* 1997;20:667-9.
- Timenetsky J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. *Rev Saúde Pública* 1990;24:47-50.
- Woods GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington (DC): ASM Press; 1995. p. 1331-4.