

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Priscilla Gomes Ferreira Dias

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DE DESINFETANTES DE  
ALTO NÍVEL REGISTRADOS E COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2017

Priscilla Gomes Ferreira Dias

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DE DESINFETANTES DE  
ALTO NÍVEL REGISTRADOS E COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Tutora: Maria Helena Simões Villas Bôas  
Preceptora: Bruna Peres Sabagh

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Dias, Priscilla Gomes Ferreira

Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes de alto nível registrados e comercializados no Brasil. / Priscilla Gomes Ferreira Dias – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

49 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptora: Bruna Peres Sabagh

Tutora: Maria Helena Simões Villas Bôas

1. Desinfetantes. 2. Antibacterianos. 3. Controle de Qualidade. 4. Micobactérias não Tuberculosas. I. Título

Priscilla Gomes Ferreira Dias

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DE DESINFETANTES DE  
ALTO NÍVEL REGISTRADOS E COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde da  
Fundação Oswaldo Cruz como requisito para  
obtenção do título de Especialista em  
Vigilância Sanitária

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Aline da Silva Soares Souto (Mestre)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Célia Maria Carvalho Araújo Pereira Romão (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Bruna Peres Sabagh (Mestre) - Preceptora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora) - Tutora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por colocar as pessoas certas no meu caminho que me ajudaram a conquistar meu objetivo, sem ELE nada seria possível.

À minha família, especialmente, minha mãe Neide e meu pai José pela paciência e pelo grandioso apoio em todos os projetos da minha vida e em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À minha tutora, Maria Helena Simões Villas Bôas, e preceptora, Bruna Peres Sabagh, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, pelas ideias, dicas e correções que proporcionaram a realização deste trabalho.

Aos amigos residentes que tornaram a caminhada mais leve com conversas descontraídas, festas de confraternização e boas risadas.

A todos do Setor de Saneantes que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Esterilização e do Setor de Meio de Cultura que me ajudaram imensamente através do fornecimento dos materiais necessários à execução da parte prática do trabalho.

## RESUMO

A partir de 2004, um grande número de notificações de infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido (MCR) eclodiu no Brasil. O aspecto comum, em todos os hospitais que apresentaram casos suspeitos e confirmados, foi a desinfecção de alto nível de artigos cirúrgicos pela imersão em solução de glutaraldeído a 2% por 30 minutos. Além disso, foram observadas quebras de protocolos nos processos de limpeza e esterilização e inconsistências nos tempos de exposição a desinfetantes. As análises laboratoriais identificaram *Mycobacterium massiliense* (hoje denominado *M. abscessus* subsp. *bolletii*) como a micobactéria predominante nos surtos. Os surtos de infecções por MCR no país levaram a publicação por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) de resoluções para auxiliar na prevenção e no controle dessas doenças. Uma das resoluções, a RDC nº 51/2009, inseriu *M. massiliense* como microrganismo de referência na legislação pertinente à comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos. Após a publicação desta RDC, não foi realizado, por parte da autoridade sanitária competente, um controle efetivo, como, por exemplo, um programa de análise prévia, para verificar se as indústrias de saneantes estão atendendo ao disposto nos regulamentos publicados. O único controle realizado, durante os procedimentos de registro junto à Anvisa, é a análise dos laudos de eficácia expedidos por laboratórios prestadores de serviço nacionais. Assim existe a necessidade premente de realização de ensaios, envolvendo o maior número possível de produtos desinfetantes de alto nível, a fim de se verificar a qualidade desses produtos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade micobactericida de desinfetantes de alto nível à base de Glutaraldeído, de Ácido peracético e de Peróxido de hidrogênio e de Glucoprotamina por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, conforme POP INCQS nº 65.3240.009, utilizando *M. bovis* cepa BCG Moreau e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, como cepas de referência preconizadas pela legislação vigente. O desinfetante à base de Glutaraldeído não foi capaz de eliminar *M. bovis* e nem *M. abscessus* subsp. *bolletii*. O desinfetante à base de Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio foi eficaz frente aos microrganismos testes. O produto contendo Glucoprotamina não conseguiu matar *M. bovis*. Ensaios adicionais serão necessários para avaliação da atividade micobactericida desse produto frente a *M. abscessus* subsp. *bolletii*. É necessária a adoção de biocidas alternativos ao Glutaraldeído devido à tolerância de MCR que aumenta o risco de infecção hospitalar. Para a promoção da saúde da população é fundamental o monitoramento da qualidade de produtos desinfetantes de alto nível atualmente registrados e comercializados no país.

Palavras-chave: Micobactérias de Crescimento Rápido. Desinfetantes de Alto Nível. Avaliação da Atividade Micobactericida.

## ABSTRACT

As of 2004, a large number of reports of post-operative infections by rapidly growing mycobacteria (RGM) broke out in Brazil. The common aspect in all hospitals that presented suspected and confirmed cases was high-level disinfection of surgical articles by immersion in 2% glutaraldehyde solution for 30 minutes. In addition, there were protocol breaks in the cleaning and sterilization processes and inconsistencies in the times of exposure to disinfectants. Outbreaks of MCR infections in the country led to the publication by the National Agency of Sanitary Surveillance (Anvisa) of resolutions to assist in the prevention and control of these diseases. One of the resolutions, CDR No. 51/2009, inserted *M. massiliense* as the reference microorganism in legislation to prove the efficacy of hospital disinfectants for semi-critical articles. Following the publication of this CDR, effective control, such as a prior examination program, has not been carried out by the competent health authority to verify that the sanitation industries are complying with the provisions of the published regulations. The only control performed during Anvisa registration procedures is the analysis of the efficacy reports issued by national service providers. Thus, there is an urgent need for testing, involving as many high-level disinfectants as possible, in order to verify the quality of these products. The aim of this study was to evaluate the mycobactericidal activity of high level disinfectants based on Glutaraldehyde, Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide and Glucoprotamine by means of the Confirmative in vitro Test for Determining Mycobactericidal Activity of Disinfectants, according to POP INCQS nº 65.3240.009, using *M. bovis* BCG Moreau and *M. abscessus* subsp. *bolletii*, as reference strains recommended by the current legislation. Glutaraldehyde disinfectant was ineffective for *M. bovis* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*. The disinfectant based on peracetic acid and hydrogen peroxide was effective against the test microorganisms. The product containing Glucoprotamine was ineffective for *M. bovis*. Further assays are required for mycobactericidal evaluation of this product against *M. abscessus* subsp. *bolletii*. It is necessary to adopt alternative biocides to Glutaraldehyde due to the tolerance of MCR that increases the risk of nosocomial infection. In order to promote the health of the population, it is essential to monitor the quality of high-level disinfectant products currently registered and marketed in the country.

Key-words: Rapidly Growing Mycobacteria. High Level Disinfectants. Evaluation of Mycobactericidal Activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Mudanças referentes à classificação taxonômica e a nomenclatura do complexo <i>M. abscessus</i> de 1992 a 2013 .....	14
---	----



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Avaliação da atividade micobactericida dos diferentes desinfetantes utilizando <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> INCQS 00594 .....	38
Quadro 2 Avaliação da atividade micobactericida dos diferentes desinfetantes utilizando <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau INCQS 00062.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CEN	Comitê Europeu de Normalização
CME	Centro de Material e Esterilização
DISAD	Divisão Nacional de Produtos Saneantes Domissanitários
<i>Erm</i>	indução da eritromicina metilase
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
K	meio de Kirchners
MCL	micobactérias de crescimento lento
MCR	micobactérias de crescimento rápido
MD 7H9	Middlebrook 7H9
mL	mililitro
mm	milímetro
MNT	micobactérias não causadoras de tuberculose
MOTT	<i>mycobacteria other than tubercle bacilli</i>
nm	nanômetro
PB	Proskauer-Beck
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC	unidades formadoras de colônias
° C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 MICOBACTÉRIAS.....	11
1.2 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO.....	12
1.3 INFECÇÕES POR MCR NO BRASIL .....	15
1.4 SURTOS E MUDANÇAS NAS LEGISLAÇÕES .....	18
1.5 LEGISLAÇÕES DE SANEANTES.....	19
1.6 PRINCÍPIOS ATIVOS DE SANEANTES COM AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	21
1.7 JUSTIFICATIVA .....	22
<b>2 OBJETIVO</b> .....	24
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 CEPAS BACTERIANAS .....	25
3.2 MANUTENÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS.....	25
3.2.1 Manutenção de <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau INCQS 00062 .....	25
3.2.2 Manutenção de <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> INCQS 00594.....	26
3.3 DESINFETANTES.....	26
3.4 MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS DESINFETANTES.....	27
3.4.1 Preparo da cultura teste de <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau INCQS 00062 .....	27
3.4.2 Preparo da cultura teste de <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> INCQS 00594 .....	27
3.4.3 Realização do Método.....	28

3.4.4 Controles .....	29
3.4.4.1 <i>Controles dos meios de cultura</i> .....	29
3.4.4.2 <i>Controles de esterilidade</i> .....	29
3.4.4.3 <i>Contagem de bactérias viáveis nos cilindros carreadores</i> .....	31
3.4.5 Leitura dos resultados .....	32
3.4.6 Validação do procedimento do ensaio .....	32
3.4.7 Interpretação dos resultados .....	33
3.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN .....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS DESINFETANTES À BASE DE GLUTARALDEÍDO, DE ÁCIDO PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E GLUCOPROTAMINA ATRAVÉS DO MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA .....	34
4.1.1 Produto à base de Glutaraldeído a 2% .....	34
4.1.2 Produto à base de Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio a 2% .....	35
4.1.3 Produto à base de Glucoprotamina a 5% .....	36
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* caracteriza-se por bacilos aeróbicos, imóveis, não esporulados e não encapsulados. Os bacilos são denominados álcool-ácido resistentes (BAAR), pois a parede celular micobacteriana não é descorada por solução de álcool e ácido clorídrico após coloração com solução corante de fucsina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Diferentemente das demais bactérias, que possuem lipopolissacarídeos na camada externa da parede celular, as micobactérias possuem uma camada espessa de lipídios, formada principalmente por ácido micólico (BRITO, 2008). Essa constituição de parede celular com elevado teor de lipídios altera a permeabilidade, conferindo a este microrganismo maior resistência a estresses ambientais, aos desinfetantes, aos antibióticos, às temperaturas elevadas e à luz ultravioleta (FONTANA, 2008). Além disso, as micobactérias têm capacidade de formar biofilme (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

De acordo com a taxa de crescimento em meio sólido, as micobactérias são classificadas em dois grupos: micobactérias de crescimento lento (MCL) que necessitam de 7 dias ou mais de incubação para formação de colônias com tempo de geração acima de 16 horas e micobactérias de crescimento rápido (MCR) que formam colônias em menos de 7 dias de incubação com tempo de geração de 3 a 4 horas. As MCL incluem a maioria das micobactérias patogênicas como o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o complexo *Mycobacterium avium*. Os dois grupos também se diferenciam quanto a morfologia da colônia, virulência e sensibilidade a antibióticos e biocidas (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, BRITO, 2008, PITOMBO; LUPI; DUARTE, 2009).

Inicialmente, as micobactérias que não causavam tuberculose foram chamadas de micobactérias atípicas ou micobactérias ambientais ou, ainda, outras bactérias que não o bacilo da tuberculose (MOTT, do inglês: *mycobacteria other than tubercle bacilli*). Atualmente, são denominadas de micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) (FONTANA, 2008). Diferem dos agentes

etiológicos responsáveis pela tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e pela hanseníase (*Mycobacterium leprae*) pelo fato de não serem patógenos obrigatórios, sendo consideradas oportunistas. Podem ser encontradas como saprófitas, comensais e simbiontes (SOUTO et al., 2012).

Em 1954, Timpe e Runyon classificaram as micobactérias atípicas em quatro grupos, sendo os três primeiros formados por MCL e o quarto, por MCR (MACEDO; HENRIQUES, 2009):

- Grupo I: chamadas fotocromogênicas por produzirem pigmentos laranja ou amarelo quando as células em crescimento são expostas à luz;
- Grupo II: chamadas escotocromogênicas, produzem colônias com pigmento amarelo, tanto quando incubadas na presença de luz quanto na ausência de luz;
- Grupo III: chamadas não-fotocromogênicas, incluem as espécies que não produzem pigmentos e algumas espécies que produzem pequena quantidade de pigmento amarelo pálido, cuja cor não é intensificada pela exposição à luz;
- Grupo IV: formado pelas MCR, incluindo espécies pigmentadas e não pigmentadas.

Hoje, esta classificação não é mais usada, devido às técnicas de identificação por biologia molecular, com base nas sequências de regiões variáveis de genes conservados, tais como *rpoB*, *hsp65* e genes ribossomais. No entanto, ainda distinguem-se as MCL das MCR (GUGLIELMETTI et al., 2015).

## 1.2 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Estão presentes em diferentes substratos ambientais, podendo ser encontradas no solo, poeira, pedras, bioaerossóis e água, incluindo água potável, formando biofilmes em tubulações de sistemas de distribuição de água, piscina, esgoto e superfícies. Também encontram condições favoráveis em reservatórios e encanamento de hospitais, sendo difícil erradicá-las. Apresentam resistência antimicrobiana e algumas também são resistentes a desinfetantes e microbicidas clorados, mercuriais e ao glutaraldeído (MACEDO; HENRIQUES, 2009).

Algumas espécies de MCR podem infectar artigos médicos e causar doenças pulmonares, infecções de ferida cirúrgica, doenças de pele e de tecidos (FONTANA,

2008). As mais frequentemente associadas a doenças em seres humanos são *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum*. Essas infecções, geralmente, estão associadas a pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas, já que são microrganismos oportunistas que apresentam baixa patogenicidade (SOUTO et al., 2012).

As formas de transmissão de infecções por MNT em seres humanos ainda não estão completamente esclarecidas. Postula-se que os indivíduos sensíveis adquiram infecções pulmonares por inalação de aerossóis contaminados, embora a ingestão seja a provável fonte de contaminação para linfadenites em crianças. Em infecções cutâneas, acredita-se que ocorra a inoculação direta do patógeno por meio da água e outros materiais cirúrgicos. A transmissão direta entre humanos foi descrita apenas em infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística que frequentaram o mesmo centro de tratamento (GUGLIELMETTI et al., 2015).

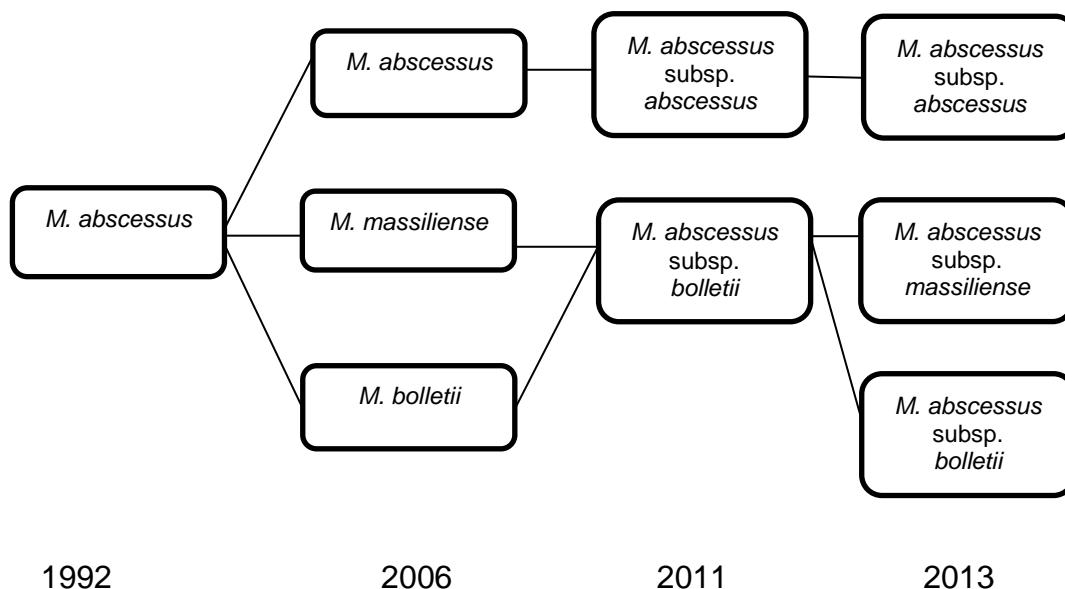
*M. abscessus* e *M. chelonae* foram originalmente considerados como pertencentes à mesma espécie ("*M. chelonae*" ou "*M. chelonae*"), mas em 1992, *M. abscessus* foi reclassificada como uma espécie individual (BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002). Isso é importante clinicamente, porque *M. chelonae* raramente está envolvido como causador de doença pulmonar crônica enquanto que *M. abscessus* é um importante agente patogênico pulmonar; e também porque *M. chelonae* não tem o gene de indução da eritromicina metilase (*Erm*), de modo que os macrolídeos são eficazes para o tratamento de infecções por essa micobactéria, o que geralmente não ocorre em infecções por *M. abscessus*, porque a maioria dos isolados tem esse gene ativo (NASH; BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2009).

Depois da reclassificação do *M. abscessus* como uma espécie independente, novas subespécies, incluindo *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bolletii* foram descobertas. Em 2011, foi proposta a união de *M. massiliense* e de *M. bolletii* como uma única subespécie denominada *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. Assim, a espécie *Mycobacterium abscessus* estaria dividida em duas subespécies: *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (LEÃO et al., 2011).

Estudos recentes argumentam contra a proposta mencionada acima e sugerem a divisão antiga em três subgrupos, espécies ou subespécies (*M. abscessus* ou *M. abscessus* subsp. *abscessus*; *M. massiliense* ou *M. abscessus* subsp. *massiliense*, e *M. bolletii* ou *M. abscessus* subsp. *bolletii*), clinicamente importantes, com base em diferenças na sequência de DNA, especialmente do gene

*rpoB* e a presença ou ausência de um gene *Erm* funcional (ADÉKAMBI et al., 2006, HEYDARI et al., 2013, BENWILL; WALLACE; 2014). Mudanças referentes à classificação taxonômica e a nomenclatura do complexo *M. abscessus*, de 1992 a 2013, são apresentadas na **Figura 1**(LEE et al., 2015).

Pela análise completa da sequência do gene *16S rRNA*, os três subgrupos possuem 100% de identidade de sequência (NASH et al., 2005, NASH; BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2009). Por sequenciamento parcial do gene *rpoB*, no entanto, estas três subespécies diferem em mais de 3,5% de seus pares de base, uma diferença observada apenas entre isolados pertencentes a diferentes espécies (ADÉKAMBI et al., 2004).



**Figura 1.** Mudanças referentes à classificação taxonômica e a nomenclatura do complexo *M. abscessus* de 1992 a 2013.

Fonte: LEE et al., 2015

O sequenciamento do gene *Erm* mostrou que os microrganismos identificados como *M. massiliense*/*M. abscessus* subsp. *massiliense* têm uma grande deleção neste gene, ou seja, ele não é funcional e, portanto, o microrganismo é susceptível aos macrolídeos. Já nos isolados de *M. abscessus*/*M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. bolletii*/*M. abscessus* subsp. *bolletii* não existe essa deleção e o gene *Erm* é quase sempre funcional, atribuindo à essas micobactérias resistência aos macrolídeos (HEYDARI et al., 2013, BENWILL; WALLACE, 2014). Finalmente, mais recentemente, o sequenciamento completo do genoma mostrou grandes diferenças



entre os três grupos, porém uma definição de "espécie" ou "subespécie" por este método não foi estabelecida (TETTELIN et al., 2014).

Não existem designações taxonômicas oficiais para qualquer proposta de espécies ou subespécies de *M. abscessus* e, de fato, o conceito de nome oficial não existe no Código Internacional de Nomenclatura de Procariontes. Ademais, todos os nomes propostos para espécies e subespécies de *M. abscessus* têm sido validados por meio de publicações em artigos originais e/ou listas de validação na Revista Internacional de Microbiologia Sistemática e Evolucionária, a revista oficial de taxonomia microbológica, e, portanto, todos podem ser legitimamente usados em publicações (GRIFFITH et al., 2015).

### 1.3 INFECÇÕES POR MCR NO BRASIL

No Brasil, infecções por MCR após procedimentos invasivos eram pouco relatadas antes de 2004, geralmente como focos limitados ou casos isolados (LORENA et al., 2010). A primeira descrição detalhada sobre esse tipo de infecção no país ocorreu com surtos de ceratite causados por *M. abscessus* e *M. chelonae* em pacientes submetidos à cirurgia a laser para correção de miopia, entre 1998 e 2003, no estado do Rio de Janeiro e São Paulo. Todos esses focos estavam restritos a determinadas clínicas oftalmológicas e nenhuma fonte específica de transmissão foi detectada (ALVARENGA et al., 2002). Outros focos de infecção por MCR também foram relacionados a procedimentos estéticos, como a mesoterapia em 2000 e 2002, no estado de São Paulo (SAMPAIO et al., 2006). Entre 2002 e 2004, um surto de infecções pós-mamoplastia causado por *M. fortuitum*, na cidade de Campinas, estado de São Paulo, afetou 33 pacientes (PADOVEZE et al., 2007).

Em 2004, eclodiu um grande número de notificações (310) de infecção pós-operatória por MCR na cidade de Belém do Pará (MACEDO; HENRIQUES, 2009). As cepas isoladas de biópsia após mesoterapia foram identificadas como *M. bolletii*, pertencentes a vários clones, enquanto aquelas provenientes de pacientes submetidos a cirurgias de videolaparoscopia pertenciam à espécie *M. massiliense*, sendo 58 isoladas do mesmo clone chamado BRA100. As amostras foram coletadas de 16 hospitais privados. As infecções foram caracterizadas por hiperemia local e

formação de abscessos com aspecto inflamatório e secreções purulentas, além de não responderem à terapia antimicrobiana comum (VIANA-NIERO et al., 2008). Embora a fonte das infecções cirúrgicas não tenha sido identificada, alguns aspectos foram comuns a todos os casos relatados: todos os equipamentos de laparoscopia foram submetidos à desinfecção de alto nível pela imersão em glutaraldeído a 2% e foram descobertas inconsistências nos procedimentos de limpeza de equipamentos e tempos de exposição a desinfetantes (LORENA et al., 2010).

De agosto de 2006 a julho de 2007, 1.051 casos suspeitos de infecções pós-operatórias causadas MCR foram notificados em 63 hospitais no estado do Rio de Janeiro. As infecções estavam relacionadas a procedimentos videolaparoscópicos e acometeram principalmente a pele e o tecido celular subcutâneo. Apresentavam como principais características a formação de abscessos, nódulos e ulcerações nos sítios de incisão e não respondiam ao tratamento antimicrobiano padrão. A partir dos casos com confirmação por cultura, *M. massiliense* foi identificado em 97,2% dos casos, verificando-se a presença do clone BRA100, o mesmo encontrado e caracterizado no surto de Belém (DUARTE et al., 2009).

Muitas hipóteses para a ocorrência do surto foram formuladas tais como o tipo de material utilizado nas operações, falhas nos métodos de desinfecção ou esterilização, o processo de limpeza mecânica e desmonte dos artigos, o tempo de exposição aos saneantes, às condições nas quais os instrumentos foram imersos na solução e o possível aparecimento de uma cepa tolerante/não suscetível aos agentes de desinfecção (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

As hipóteses foram baseadas nas irregularidades encontradas nas investigações em diferentes hospitais como: ausência de registros efetivos de soluções de glutaraldeído comerciais utilizadas na desinfecção de alto nível quanto à marca, tempo de imersão dos instrumentos, validade, confirmação da concentração e pH, presença ou não de matéria orgânica; não utilização de recipientes adequados para armazenamento das soluções em uso e processo de desinfecção; ausência de uniformidade quanto ao profissional responsável pela limpeza e desinfecção e carência de treinamento específico; ausência de procedimentos operacionais padrão e/ou protocolos com detalhes das condutas a serem aplicadas na limpeza e desinfecção; reutilização de material descartável; ausência de controle microbiológico do funcionamento das autoclaves ou investigação microbiológica do

instrumental por amostragem e inadequado sistema de vigilância de infecções pós-cirúrgicas (PITOMBO; LUPI; DUARTE, 2009).

Os casos no Estado do Espírito Santo foram concentrados principalmente em 2007. Foram 248 casos notificados, dos quais 195 foram confirmados. Os casos notificados haviam sido submetidos a operações em 11 serviços privados de saúde. As análises laboratoriais identificaram *M. massiliense* como a micobactéria presente no surto. A vigilância sanitária do Estado realizou inspeções em cerca de 60 estabelecimentos da saúde, tendo observado quebra de protocolos nos processos de limpeza e esterilização (MACEDO; HENRIQUES, 2009).

Além desses três estados, de 2003 a 2008, foram registrados vários surtos de infecções por MCR em outros estados brasileiros, como Pernambuco, Roraima, Bahia, Mato Grosso do Sul, Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito Federal, São Paulo, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, entre outros, com estimativa de mais de 2.000 casos suspeitos. Entre os casos confirmados, a maioria havia sido submetida a operações abdominais, principalmente, videolaparoscopias e cirurgias plásticas (ANVISA, 2011).

O aspecto comum, em todos os hospitais que apresentaram casos suspeitos e confirmados, foi a desinfecção de alto nível de artigos cirúrgicos pela imersão em solução de glutaraldeído a 2% por 30 minutos. Um estudo formulou e testou a hipótese de tolerância das cepas do surto a esse agente. Os resultados demonstraram que apesar do glutaraldeído a 2% ter sido eficaz na erradicação de cepas de MCR propostas em protocolos oficiais e as de referência, o mesmo não ocorreu com as cepas de *M. massiliense* isoladas de lesões cirúrgicas, originadas do surto, pois essas foram recuperadas após exposição a todos os tempos indicados para desinfecção de alto nível (30 min e 60 min) e esterilização (6 h e 10 h), indicando particular tolerância do clone BRA100 a diferentes soluções comerciais de glutaraldeído a 2%. Assim, segundo os autores, a desinfecção de alto nível com glutaraldeído a 2% empregada nos instrumentais pode ter contribuído na disseminação do microrganismo pelos centros cirúrgicos de diferentes hospitais. Outros fatores importantes estão ligados à higienização inadequada dos instrumentais cirúrgicos, à formação de biofilme, à adesão bacteriana e ao reuso de artigos descartáveis (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

## 1.4 SURTOS E MUDANÇAS NAS LEGISLAÇÕES

Na tentativa de conter os surtos de infecções por MCR, algumas resoluções foram publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Em 23 de outubro de 2008, foi publicada a Resolução nº 75 que exigia no ato do registro a comprovação de eficácia antimicrobiana de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente às micobactérias *M. abscessus* e *M. massiliense*, além da cepa *Mycobacterium bovis BCG Moreau*, que já era recomendada pelo método. Também determinou que os laudos deveriam seguir a metodologia estabelecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (BRASIL, 2008).

Contudo, a publicação da Resolução RDC nº 51, em 21 de outubro de 2009, revogou a RDC nº 75/2008, estabeleceu novos critérios de comprovação de eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos. Esta resolução retirou a obrigatoriedade de comprovação de eficácia antimicrobiana frente a *M. abscessus*, mantendo, porém, essa obrigação frente a *M. massiliense* e a *M. bovis BCG Moreau*, seguindo a metodologia do INCQS (BRASIL, 2009b).

Outra medida implantada pela Anvisa foi a publicação da Resolução RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009, a qual dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por MCR em serviços de saúde. Entre estas medidas, está a suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos para o instrumental cirúrgico e produtos para saúde utilizados nos procedimentos cirúrgicos e diagnósticos por videoscopias com penetração de pele, mucosas adjacentes, tecidos subepiteliais e sistema vascular, cirurgias abdominais e pélvicas convencionais, cirurgias plásticas com o auxílio de ópticas, mamoplastias e procedimentos de lipoaspiração. Esta norma não se aplica ao instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos para acesso às cavidades corporais por orifícios naturais, ou seja, a desinfecção de alto nível para artigos semicríticos com glutaraldeído continua liberada (BRASIL, 2009a).

O processamento de instrumental cirúrgico e de produtos para saúde deve ser realizado em Centro de Material e Esterilização (CME) ou por empresa terceirizada regularizada junto à Autoridade Sanitária. Nos dois casos, um profissional habilitado deve supervisionar todas as atividades (BRASIL, 2009a).

Além disso, foi publicada a RDC nº 31 de 04 de julho de 2011 que proibiu o registro de produtos saneantes na categoria “Esterilizante”, para aplicação sob a forma de imersão, com exceção dos produtos para uso exclusivo em dialisadores e linhas de hemodiálise registrados na Anvisa e dos produtos para uso exclusivo em equipamentos que realizam esterilização por ação físico-química, registrados na Anvisa (BRASIL, 2011).

## 1.5 LEGISLAÇÕES DE SANEANTES

Atualmente, os produtos saneantes com ação antimicrobiana são regulamentados pela Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007) e pela Resolução RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010). Estas resoluções foram publicadas visando a harmonização das ações dos países que compõem o Mercado Comum do Sul (Mercosul), em relação a avaliação da qualidade de produtos saneantes com ação antimicrobiana usados em assistência à saúde.

Esses Regulamentos determinam a exigência da comprovação da eficácia dos produtos desinfetantes e esterilizantes que deve ser realizada mediante metodologias da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou do Comitê Europeu de Normalização (CEN) (BRASIL, 2007, BRASIL, 2010).

A Resolução RDC nº 14/2007 tem como objetivo definir, classificar e regulamentar as condições para registro e rotulagem dos produtos com ação antimicrobiana a serem comercializados. Abrange os produtos com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos, sobre superfícies inanimadas e ambientes, em domicílios, em indústrias, em hospitais, estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde e em locais ou estabelecimentos públicos ou privados. Além disso, classifica esses produtos de acordo com o âmbito de aplicação em uso geral, em uso hospitalar, em uso em indústria alimentícia e afins, e os de uso específico (desinfetante para lactários, piscinas e água para consumo humano e sanitizante/desinfetante para tecidos, roupas comuns e roupas hospitalares) (BRASIL, 2007).

Segundo a RDC nº 14/2007, um desinfetante é definido como “um produto que mata todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas” (BRASIL, 2007).

A Resolução RDC nº 35/2010 substituiu e revogou, no seu art. 4º, a Portaria da Divisão Nacional de Produtos Saneantes Domissanitários (DISAD) nº 15, de 23 de agosto de 1988 (BRASIL, 2010). Alguns itens dessa portaria já tinham sido revogados pela Resolução RDC nº 14/2007, mantendo-se em vigor, até 2010, apenas os itens referentes aos produtos antimicrobianos destinados exclusivamente a áreas e artigos críticos, áreas e artigos semicríticos e esterilizantes (BRASIL, 2007).

A Resolução RDC nº 35/2010 tem por objetivo definir, classificar e regulamentar as condições para o registro e rotulagem dos produtos com ação antimicrobiana de uso em assistência à saúde para artigos críticos e semicríticos a serem comercializados. O artigo crítico é definido como aquele utilizado em procedimentos de alto risco, que penetra tecidos ou órgãos e requer esterilização para seu uso e os artigos semicríticos, como aquele que entra em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa do paciente e requer desinfecção de alto nível ou esterilização para seu uso (BRASIL, 2010).

Segundo esta resolução, os desinfetantes são classificados de acordo com o nível de desinfecção em:

- desinfetante de nível intermediário: produto que destrói bactérias vegetativas, micobactérias, a maioria dos vírus e fungos em um período de tempo comprovado;
- desinfetante de alto nível: produto que destrói todos os microrganismos em um período de tempo comprovado, exceto um número elevado de esporos bacterianos;
- esterilizante: produto que tem a capacidade de destruir todas as formas de vida microbiana, em um período de tempo comprovado, incluindo os esporos bacterianos (BRASIL, 2010).

## 1.6 PRINCÍPIOS ATIVOS DE SANEANTES COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

Os saneantes com ação antimicrobiana podem conter em suas formulações princípios ativos tais como glutaraldeído, ácido peracético e glucoprotamina.

Um dos princípios ativos mais utilizados para a desinfecção de alto nível para artigos semicríticos é o glutaraldeído a 2%. O glutaraldeído é um dialdeído saturado que age pela alquilação de grupos sulfidril, hidroxila, carboxila e amino dos microrganismos, alterando seu DNA, RNA e síntese proteica (PSALTIKIDIS et al., 2014). Ele é comercializado sob a forma de solução ácida que é ativada através de agentes alcalinizantes. O pH alcalino promove a conversão dos grupos amino na superfície das células em amins de forma livre, que logo reagem com o glutaraldeído, conduzindo a um efeito bactericida mais rápido. Após a ativação do produto, seu prazo de validade varia entre 14 e 28 dias conforme cada fabricante, devendo haver, um monitoramento da concentração da solução por meio de fitas indicadoras. Por ser volátil, o glutaraldeído deve ser manuseado em ambientes bem ventilados, já que seus vapores são considerados irritantes e tóxicos para a pele, mucosas e trato respiratório (MCDONNELL, 2007).

O Ácido Peracético está disponível em formulações aquosas ou em pó, para uso manual ou automatizado. Seu mecanismo de ação é a desnaturação proteica, aumento da permeabilidade da membrana celular pela ruptura dos radicais sulfidril e ligações de enxofre, oxidando as enzimas microbianas essenciais. Pode ser comercializado na forma concentrada, devendo ser diluído em água antes de ser utilizado. Dependendo de sua concentração pode ser usado para desinfecção de superfícies fixas, desinfecção de nível intermediário e desinfecção de alto nível. A atividade da solução em uso deve ser verificada com a fita teste do produto. Após sua diluição, a solução deve ser mantida pelo prazo máximo de 7 dias. A decomposição do Ácido Peracético não gera compostos tóxicos, porém é um produto corrosivo e considerado instável particularmente quando diluído. Assim como o glutaraldeído, é irritante para a pele, mucosas e trato respiratório (PSALTIKIDIS et al., 2014).

A glucoprotamina foi descoberta na década de 1990. É um composto ativo para desinfetantes desprovidos de aldeídos, produto da reação do ácido L-glutâmico e N-alkil-propileno-1,3-diamina obtido de óleo de coco. Seu mecanismo de ação não é conhecido. A glucoprotamina não é volátil, é facilmente dissolvida em água, com baixíssima toxicidade e facilmente biodegradada no meio ambiente. Dependendo da concentração pode ser utilizada para limpeza e descontaminação de artigos hospitalares, para desinfecção de nível intermediário e desinfecção de alto nível. Seu prazo de validade é de 14 dias, sendo necessário a verificação da concentração da solução através de fita indicadora (TYSKI et al., 2009, MEINKE et al., 2012, CHOJECKA et al., 2015).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Os surtos de infecções por MCR no país levaram a publicação por parte da Anvisa de resoluções para auxiliar na prevenção e no controle dessas doenças. Uma das resoluções, a RDC nº 51/2009, inseriu o *M. massiliense* como microrganismo de referência na legislação pertinente à comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos. Um dos métodos utilizados para tal comprovação é o Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, descrito no Procedimento Operacional Padrão (POP) INCQS nº 65.3240.009, (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016). Esse método é adotado no Brasil e proveniente da AOAC (TOMASINO, 2012). Nele é recomendada a utilização da cepa vacinal de micobactéria, cepa *M. bovis* BCG Moreau INCQS 00062, e da cepa *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 como microrganismos teste.

Após a publicação desta RDC, não foi realizado, por parte da autoridade sanitária competente, um controle efetivo, como, por exemplo, um programa de análise prévia, para verificar se as indústrias de saneantes estão atendendo ao disposto nos regulamentos publicados. O único controle realizado, durante os procedimentos de registro junto à Anvisa, é a análise dos laudos de eficácia expedidos por laboratórios prestadores de serviço nacionais.



Além disso, ao longo dos anos, novas edições da AOAC foram lançadas contemplando modificações nas metodologias. A mudança recente mais significativa, no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, foi a introdução da contagem de bactérias viáveis nos cilindros carreadores para validação do procedimento do ensaio. A partir da contagem, calcula-se a média geométrica da densidade de microrganismos nos cilindros carreadores, que deverá ser de pelo menos 4,0 e não passar de 6,0 para que haja validação do ensaio. Valor de média geométrica da densidade inferior a 4,0 e superior a 6,0 invalida o ensaio, exceto em dois casos não há necessidade de reteste: quando o produto estiver satisfatório e a média geométrica da densidade estiver acima de 6,0 e, quando o produto estiver insatisfatório e a média geométrica estiver abaixo de 4,0.

O valor de média geométrica da densidade de microrganismos nos cilindros carreadores é influenciado diretamente pela carga bacteriana presente neles. Para padronizar essa carga bacteriana, a metodologia da AOAC determina, que no preparo da cultura teste, a suspensão bacteriana seja ajustada a 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, em espectrofotômetro. Com a introdução dessa contagem, observou-se por experimentos realizados no Setor de Saneantes, que o valor da média geométrica da densidade para *M. abscessus* subsp. *bolletii* ficava acima do permitido, indicando que o ajuste da suspensão dessa micobactéria a 20% de transmitância resultava em uma carga bacteriana maior que a preconizada. Para a adaptação da metodologia, uma série de ensaios foi realizada com diferentes valores de transmitância. Verificou-se que a transmitância ideal para o *M. abscessus* subsp. *bolletii* é 75 %. Essa adaptação foi incorporada ao POP INCQS n° 65.3240.009.

Assim existe a necessidade premente de realização de ensaios, envolvendo o maior número possível de produtos desinfetantes de alto nível, a fim de se verificar a qualidade desses produtos de acordo com o estabelecido no POP INCQS n° 65.3240.009.

## 2 OBJETIVO

Avaliar a atividade micobactericida de desinfetantes de alto nível por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, conforme Procedimento Operacional Padronizado (POP) INCQS nº 65.3240.009, utilizando *M. bovis* cepa BCG Moreau e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, como cepas de referência preconizadas pela metodologia e pela legislação vigente, respectivamente.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preservar os microrganismos através de abertura de ampola e reconstituir o líofilo em meios de cultura específicos;
  
- Realizar os ensaios de avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes à base de glutaraldeído a 2%, de ácido peracético e peróxido de hidrogênio a 2% e de glucoptamina a 5% por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, conforme Procedimento Operacional Padronizado (POP) INCQS nº 65.3240.009, utilizando *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062 e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas as cepas *Mycobacterium bovis* BCG Moreau INCQS 00062, que é a bactéria de crescimento lento de referência preconizada no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de desinfetantes pela *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) (TOMASINO, 2012) e *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, que foi incluída na metodologia estabelecida pelo INCQS, e aceita oficialmente, para avaliar a qualidade dos desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos de acordo com a RDC nº 51/2009 (BRASIL, 2009). Atualmente esses produtos são classificados como desinfetantes de alto nível segundo a RDC nº 35/2010 (BRASIL, 2010).

#### 3.2 MANUTENÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

##### 3.2.1 Manutenção de *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062

O conteúdo de uma ampola contendo o microrganismo liofilizado foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9. Alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para três tubos contendo ágar Middlebrook 7H9 inclinado. Os tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 20 dias. Após esse tempo, a pureza da cultura foi verificada e os tubos foram estocados a  $2-5^\circ\text{C}$ . No caso de contaminação, a cultura foi descartada e nova ampola com o microrganismo liofilizado foi aberta.

A manutenção da cultura estoque foi realizada a partir de repiques mensais em três tubos contendo ágar Middlebrook 7H9 inclinado; o repique permaneceu incubado por 20 dias a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  e estocado a  $2-5^\circ\text{C}$ .

A cultura estoque foi renovada a cada 12 meses com a abertura de uma nova ampola contendo o microrganismo liofilizado (TOMASINO, 2012; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

### 3.2.2 Manutenção de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594

O conteúdo de uma ampola contendo o microrganismo liofilizado foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9 e alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para três tubos com ágar Löwestein-Jensen inclinado. Os tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período entre 5 e 7 dias. Após verificação da pureza, esses tubos foram mantidos a  $2-5^\circ\text{C}$ .

A manutenção da cultura estoque foi realizada a partir de repiques mensais em três tubos com ágar Löwestein-Jensen, incubando os tubos a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período entre 5 e 7 dias; o estoque foi mantido a  $2-5^\circ\text{C}$ .

A cultura estoque foi renovada a cada 12 meses com a abertura de uma nova ampola contendo o microrganismo liofilizado (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

### 3.3 DESINFETANTES

Foram utilizados três desinfetantes com diferentes princípios ativos, sempre na concentração recomendada pelo fabricante do produto:

- Um produto à base de glutaraldeído que é comercializado pronto para uso, sem necessidade de ativação;
- Um produto contendo ácido peracético e peróxido de hidrogênio em sua formulação, o qual será ativado imediatamente antes do ensaio, obedecendo à recomendação de uso do fabricante;
- Um produto à base de glucoprotamina, o qual será ativado imediatamente antes do ensaio, obedecendo à recomendação de uso do fabricante.

### 3.4 MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBATERICIDA DOS DESINFETANTES

#### 3.4.1 Preparo da cultura teste de *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062

A partir da cultura estoque, foram inoculados 10 tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck modificado e esses tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 21-25 dias. Após esse período, foram adicionados, em cada tubo, 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato 80 estéril e pérolas de vidro estéreis, o conteúdo foi homogeneizado em agitador de tubos. Essa suspensão foi transferida para tubos de 25 mm x 150 mm, sendo deixada em repouso para que as partículas maiores sedimentassem. O sobrenadante foi transferido para erlenmeyer de 250 mL e a suspensão foi ajustada a 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando o mesmo meio de cultura. Essa suspensão bacteriana final foi utilizada para contaminar os cilindros de porcelana (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

#### 3.4.2 Preparo da cultura teste de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* INCQS nº 00594

A partir da cultura estoque, foram inoculados de 5 a 6 tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck modificado e esses tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5-7 dias. Após esse período, foram adicionados aos tubos pérolas de vidro estéreis para homogeneização em agitador de tubos. Essa suspensão foi transferida para tubos de 25 mm x 150 mm, sendo deixada em repouso para que as partículas maiores sedimentassem. O sobrenadante foi transferido para erlenmeyer de 250 mL e a suspensão foi ajustada a 75% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando o mesmo meio de cultura. Essa suspensão bacteriana final foi

utilizada para contaminar os cilindros de porcelana (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

### 3.4.3 Realização do Método

A avaliação da eficácia dos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético/peróxido de hidrogênio e glucoprotamina foi verificada através do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, segundo a AOAC (TOMASINO, 2012) e o POP INCQS nº 65.3240.009 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016). Quinze a vinte mL da suspensão bacteriana padronizada, anteriormente preparada, foram empregados para contaminar 12 cilindros de porcelana durante 15 minutos. Após esse tempo, os cilindros foram transferidos, com auxílio de um gancho flambado, e colocados verticalmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e levados a incubação para secar em estufa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. No ensaio propriamente dito, após a secagem dos cilindros, a intervalos de tempos de 1 minuto, cada um dos dez cilindros contaminados foi transferido, de forma cronometrada, para cada um dos 10 tubos contendo 10 mL do desinfetante a ser testado. Após o tempo de contato recomendado pelo fabricante no rótulo, os cilindros foram transferidos, obedecendo ao mesmo intervalo de tempo (1 minuto entre cada transferência), para os respectivos tubos contendo 10 mL de soro de cavalo e depois para os tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck (PB) modificado. A partir do tubo contendo soro de cavalo foram retiradas alíquotas de 4 mL, das quais 2 mL foram transferidos para dois meios de subcultura adicionais: meio Middlebrook 7H9 (MD 7H9) e meio de Kirchners (K), distribuídos em porções de 20 mL. Os tubos contendo os meios de cultura (caldo Proskauer-Beck modificado, meio Middlebrook 7H9 e meio de Kirchner) foram incubados inicialmente por 60 dias em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , e no caso de ausência de crescimento ou crescimento tênue, os tubos foram re-incubados por um tempo adicional de 30 dias (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

### 3.4.4 Controles

#### 3.4.4.1 *Controles dos meios de cultura*

Controle da viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9:

Um cilindro contaminado e seco foi adicionado a cada meio de cultura utilizado no ensaio. Os tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Após esse tempo de incubação, deve ocorrer crescimento bacteriano característico (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

Controle de esterilidade dos meios de cultura PB, K e 7H9:

A esterilidade dos meios de cultura foi verificada através da incubação de um tubo de cada meio de cultura, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

#### 3.4.4.2 *Controles de esterilidade*

Controle de esterilidade do soro de cavalo:

Uma alíquota de 2 mL de soro de cavalo estéril foi inoculada em um tubo de cada um dos meios de cultura. Os tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento

microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

Controle de esterilidade da água purificada:

Uma alíquota de 0,2 mL de água purificada utilizada para diluir o desinfetante foi adicionada a um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubada a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

Controle da esterilidade dos lotes de pipetas:

Com o auxílio de um pipetador automático, uma pipeta de cada lote utilizado no ensaio foi utilizada para aspirar o caldo Proskauer-Beck modificado acima da marcação da graduação e recolocado no tubo. Esse procedimento foi repetido três vezes e os tubos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

Controle de esterilidade dos cilindros de porcelana:

Um cilindro estéril, do lote utilizado no ensaio, foi adicionado a um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, conforme descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).



Controle de esterilidade da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato:

Uma alíquota de 0,2 mL da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato 80, utilizada no preparo da suspensão bacteriana da cultura teste, foi adicionada a um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

#### 3.4.4.3 Contagem de bactérias viáveis nos cilindros carreadores

Paralelamente à realização do ensaio, foram selecionados aleatoriamente 3 cilindros de porcelana contaminados da placa de Petri após secagem por 30 minutos. Cada carreador contaminado foi transferido para 10 mL de caldo Proskauer-Beck e levado para um banho de ultrassom para sonicação por 10 min. Após a sonicação, os tubos contendo os cilindros foram agitados por 1 min em agitador de tubos. Depois da agitação, foram realizadas diluições seriadas dos conteúdos dos 3 tubos em 9 mL de caldo Proskauer-Beck. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em ágar Middlebrook 7H9 pela técnica do espalhamento em superfície. As placas foram incubadas na posição invertida a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 21-25 dias para *M. bovis* e 5 a 7 dias para *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias, sendo usadas para os cálculos as diluições que forneceram contagem de 0 a 300 colônias. Para o cálculo do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL foi empregada a seguinte equação:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{média UFC dil. } 10^x) + (\text{média UFC dil. } 10^y) + (\text{média UFC dil. } 10^z)}{10^x + 10^y + 10^z}$$

Foi feito um ajuste das diluições de acordo com o volume semeado (0,1 mL), multiplicando por 10. Para o cálculo do número de UFC/carreador, o número de UFC/mL foi multiplicado pelo volume de caldo Proskauer-Beck usado para sonicação de cada cilindro carreador (X 10, 10mL). Foi calculado o Log<sub>10</sub> da densidade microbiana para cada cilindro carreador. O Log da densidade média entre os carreadores foi o Log médio do ensaio. Este é a média geométrica da densidade de microrganismos nos cilindros carreadores para cada ensaio, que deverá ser de pelo menos 4,0 e não passar de 6,0. Valor de média geométrica da densidade inferior a 4,0 e superior a 6,0 invalida o ensaio, exceto em dois casos não há necessidade de reteste: quando o produto estiver satisfatório e a média geométrica da densidade estiver acima de 6,0 e, quando o produto estiver insatisfatório e a média geométrica estiver abaixo de 4,0 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

#### 3.4.5 Leitura dos resultados

Foi realizada através da presença ou ausência de crescimento microbiano. No caso de crescimento, este foi confirmado através da presença de BAAR (bacilos álcool – ácido resistentes), corando pelo Método de Ziehl-Neelsen (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

#### 3.4.6 Validação do procedimento do ensaio

Os procedimentos do ensaio foram considerados válidos quando os resultados dos controles de esterilidade e viabilidade estavam conformes e quando o log<sub>10</sub> da densidade microbiana média dos cilindros carreadores do ensaio foi no mínimo 4,0 e no máximo 6,0 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

### 3.4.7 Interpretação dos resultados

O desinfetante deve ser capaz de matar o microrganismo teste sobre os dez cilindros carreadores presentes no meio PB e não deve ocorrer crescimento microbiano nas alíquotas de 2 mL do soro de cavalo inoculadas nos meios de cultura de K e 7H9. Esses resultados demonstram ser a diluição testada segura para a desinfecção prática na presença de micobactérias.

No caso de resultado insatisfatório, deve ser realizado um segundo ensaio para confirmação. Um terceiro ensaio deve ser realizado caso os resultados dos dois primeiros sejam diferentes. O resultado final será aquele obtido em dois ensaios com o mesmo resultado (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

### 3.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO ZIEHL-NEELEN

Esta técnica foi utilizada para confirmar a presença de BAAR nos tubos com crescimento bacteriano. Uma alçada do micro-organismo foi transferida para a superfície de uma lâmina limpa e desengordurada. Após a secagem, o material foi fixado por meio de quatro passagens lentas em chama de bico de Bunsen. A lâmina foi coberta com solução de fucsina fenicada e aquecida até a emissão de vapores, com cuidado para que não fervesse. Após esse procedimento, a lâmina foi lavada abundantemente com água corrente e descorada com solução de álcool-ácido, lavando novamente com água corrente. Então, a lâmina foi coberta com solução de azul de metileno por aproximadamente 30 segundos, lavando em seguida com água corrente e secando à temperatura ambiente. As micobactérias se apresentam coradas em vermelho pela fucsina, contra um fundo azul claro (KANTOR, 1979).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS DESINFETANTES À BASE DE GLUTARALDEÍDO, DE ÁCIDO PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E GLUCOPROTAMINA ATRAVÉS DO MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA

#### 4.1.1 Produto à base de Glutaraldeído a 2%

Foi realizada a avaliação da atividade micobactericida de dois lotes diferentes (Lote A e Lote B) de uma única marca do produto à base de Glutaraldeído a 2%. No Lote A, o tempo de contato recomendado pelo fabricante era de 60 minutos. Já no Lote B, houve mudança no registro do produto e o tempo de contato recomendado foi alterado para 20 minutos. No ensaio para avaliação do Lote A utilizando *M. bovis*, foi observado crescimento em um tubo de cada meio de cultura (Proskauer-Beck, Kirchnners e Middlebrook 7H9). Além disso, o logaritmo da densidade microbiana média dos cilindros carreadores ( $\text{Log}^M$ ) foi de 4,40 e ficou dentro do intervalo preconizado pela metodologia. Não foi realizado um segundo ensaio porque não havia quantidade suficiente do produto (**Quadro 2**).

Na avaliação da atividade micobactericida do Lote B frente a *M. bovis*, foi utilizado o tempo de contato de 60 minutos, embora o preconizado pelo fabricante fosse de 20 minutos. Como na avaliação do Lote A houve crescimento do microrganismo após exposição ao produto por 60 minutos, optou-se por avaliar o Lote B também com esse tempo. Se o produto não for capaz de eliminar o microrganismo após 60 minutos, provavelmente, também não o fará com o tempo de contato de 20 minutos. No primeiro ensaio, foi observado crescimento em três tubos do caldo Proskauer-Beck e em um tubo do meio Middlebrook 7H9. No segundo ensaio, o número de tubos positivos aumentou, ocorreu crescimento em cinco tubos do caldo Proskauer-Beck e em três tubos do meio Middlebrook 7H9. Os resultados de  $\text{Log}^M$  para o primeiro e segundo ensaios foram 4,13 e 4,20; respectivamente (**Quadro 2**).

Em todos os ensaios, os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultados satisfatórios, conforme preconizado pela metodologia.

De acordo com os dados apresentados no **Quadro 1**, na avaliação da atividade micobactericida do Lote A do produto à base de Glutaraldeído a 2% utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii*, houve crescimento em todos os tubos de meio de cultura do primeiro ensaio realizado. Porém, esses dados foram considerados inválidos visto que os controles de esterilidade do soro de cavalo nos meios de cultura (Proskauer-Beck, Kirchners e Middlebrook 7H9) deram positivo, indicando contaminação. Além disso, o valor de  $\text{Log}^M$  ficou acima do intervalo preconizado (6,94), o que também invalidou o ensaio. Nos outros dois ensaios realizados, foi observado crescimento em todos os 30 tubos de meio de cultura empregados. Os resultados dos controles de esterilidade e viabilidade foram satisfatórios nos dois ensaios, assim como, os valores de  $\text{Log}^M$  ficaram dentro do intervalo recomendado (5,87 e 5,75).

Para a avaliação da atividade micobactericida do Lote B utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii*, foram realizados dois ensaios empregando o tempo de contato de 20 minutos recomendado pelo fabricante e outros dois ensaios empregando o tempo de contato de 60 minutos. Em todos os ensaios houve crescimento nos 30 tubos de meio de cultura utilizados. Os resultados dos controles de esterilidade e viabilidade foram satisfatórios nos quatro ensaios. Os valores de  $\text{Log}^M$  para o primeiro e segundo ensaios (tempo de contato de 20 minutos) foram de 5,93 e 5,84, respectivamente. Para os ensaios nos quais o tempo de contato foi de 60 minutos, os valores de  $\text{Log}^M$  foram 5,91 e 5,77 (**Quadro 1**).

#### 4.1.2 Produto à base de Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio a 2%

O desinfetante contendo Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio a 2% foi capaz de eliminar *M. bovis* nos dois ensaios realizados com tempo de contato de 30 minutos. Os resultados de  $\text{Log}^M$  foram satisfatórios para o primeiro experimento (4,39) e para o segundo (4,12) (**Quadro 2**).

O mesmo produto também foi eficaz frente ao *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Não houve crescimento em nenhum dos tubos dos dois ensaios realizados. Os valores obtidos para o  $\text{Log}^M$  no primeiro e segundo ensaios (6,20 e 6,02; respectivamente) ficaram acima do intervalo preconizado. Entretanto, os ensaios não foram considerados inválidos já que a metodologia não recomenda o reteste quando o produto estiver satisfatório e o  $\text{Log}^M$  estiver acima de 6,0. Isso significa que o desinfetante foi capaz de eliminar o microrganismo mesmo sendo testado com uma carga bacteriana maior que a recomendada (**Quadro 1**).

Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultados satisfatórios, conforme preconizado pela técnica.

#### 4.1.3 Produto à base de Glucoprotamina a 5%

No primeiro ensaio para a avaliação da atividade micobactericida do desinfetante à base de Glucoprotamina a 5% utilizando *M. bovis*, foi observado crescimento em dez tubos do caldo Proskauer-Beck e em um tubo do meio de Kirchners. O valor de  $\text{Log}^M$  foi de 4,53. No segundo ensaio, houve crescimento em seis tubos do caldo Proskauer-Beck, um tubo do meio de Kirchners e um tubo do meio Middlebrook 7H9. O valor de  $\text{Log}^M$  foi de 5,02 (**Quadro 2**).

Durante a avaliação da atividade micobactericida do produto utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii*, houve crescimento em dez tubos de cada meio (Kirchners e Middlebrook 7H9). O valor de  $\text{Log}^M$  foi de 5,97. Os controles de esterilidade do soro de cavalo nos três meios de cultura empregados deram positivo, invalidando o ensaio. Na repetição, foi observado crescimento em sete tubos do caldo Proskauer-Beck, um tubo do meio de Kirchners e dois tubos do meio Middlebrook 7H9. O ensaio também foi considerado inválido pois o  $\text{Log}^M$  ficou acima do intervalo determinado pela metodologia (6,01). No terceiro ensaio, houve crescimento em cinco tubos do caldo Proskauer-Beck, dois tubos do meio de Kirchners e dois tubos do meio Middlebrook 7H9. O valor de  $\text{Log}^M$  foi de 5,58. No quarto ensaio, não foi observado crescimento em nenhum tubo dos meios de cultura empregados. O valor de  $\text{Log}^M$  foi de 5,24. Um quinto ensaio foi realizado, alterando o tempo de contato do microrganismo com o produto para 40 minutos, em vez do tempo recomendado pelo

fabricante de 30 minutos. Neste último experimento, houve crescimento em dois tubos do meio de Kirchners e dois tubos do meio Middlebrook 7H9. O valor de Log<sup>M</sup> ficou dentro do intervalo recomendado (5,42) (**Quadro 1**).

Com exceção dos controles de esterilidade do soro de cavalo no primeiro ensaio frente a *M. abscessus* subsp. *bolletii*, nos demais ensaios, os controles de esterilidade e viabilidade foram feitos e apresentaram resultados satisfatórios, condizente com o preconizado pela metodologia.

**Quadro 1** Avaliação da atividade micobactericida dos diferentes desinfetantes utilizando *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594

Produtos	Ensaio <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	Nº de tubos positivos			Controles	Log <sup>M</sup>
		Meios de cultura				
		PB	K	MD 7H9		
Glutaraldeído Lote A*	Ensaio 1	10	10	10	Não conforme (Positivo para esterilidade do soro de cavalo)	6,94 (Não conforme)
	Ensaio 2	10	10	10	Conforme	5,87
	Ensaio 3	10	10	10	Conforme	5,75
Glutaraldeído Lote B**	Ensaio 1	10	10	10	Conforme	5,93
	Ensaio 2	10	10	10	Conforme	5,84
Glutaraldeído Lote B*	Ensaio 1	10	10	10	Conforme	5,91
	Ensaio 2	10	10	10	Conforme	5,77
Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio	Ensaio 1	0	0	0	Conforme	6,20 (Não conforme)
	Ensaio 2	0	0	0	Conforme	6,02 (Não conforme)
Glucoprotamina	Ensaio 1***	0	10	10	Não conforme (Positivo para esterilidade do soro de cavalo)	5,97
	Ensaio 2***	7	1	2	Conforme	6,01 (Não conforme)
	Ensaio 3***	5	2	2	Conforme	5,58
	Ensaio 4***	0	0	0	Conforme	5,24
	Ensaio 5****	0	2	2	Conforme	5,42

PB: Proskauer Beck; K: Kirchner; MD 7H9: Middlebrook 7H9; UFC: unidades formadoras de colônias; M: *Mycobacterium*; Log<sup>M</sup>: Log da densidade microbiana média dos cilindros carregadores; \* tempo de contato de 60 minutos; \*\* tempo de contato de 20 minutos; \*\*\* tempo de contato de 30 minutos; \*\*\*\* tempo de contato de 40 minutos.



**Quadro 2** Avaliação da atividade micobactericida dos diferentes desinfetantes utilizando *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062

Produtos	Ensaio <i>M. bovis</i>	Nº de tubos positivos			Controles	Log <sup>M</sup>
		Meios de cultura				
		PB	K	7H9		
Glutaraldeído <b>Lote A*</b>	Ensaio 1	1	1	1	Conforme	4,40
Glutaraldeído <b>Lote B*</b>	Ensaio 1	3	0	1	Conforme	4,13
	Ensaio 2	5	0	3	Conforme	4,20
Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio	Ensaio 1	0	0	0	Conforme	4,39
	Ensaio 2	0	0	0	Conforme	4,12
Glucoprotamina	Ensaio 1	10	1	0	Conforme	4,53
	Ensaio 2	6	1	1	Conforme	5,02

PB: Proskauer Beck; K: *Kirchner*; MD 7H9: Middlebrook 7H9; M: *Mycobacterium*; Log<sup>M</sup>: Log da densidade microbiana média dos cilindros carreadores; \* tempo de contato de 60 minutos.

## 5 DISCUSSÃO

Ao longo da última década, o número de casos de infecções, em ambientes hospitalares e clínicos, causadas por MNT de crescimento rápido, principalmente, do grupo *Mycobacterium abscessus* aumentou acentuadamente em todo o mundo (GROOTE et al., 2014, LEE et al., 2015). As espécies de MCR mais relacionadas às doenças no homem são *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Essas espécies causam infecções em pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas (SOUTO et al., 2012). Embora o complexo *M. abscessus* cause mais comumente infecções pulmonares e infecções de pele e tecidos moles, também pode causar doença em quase todos os órgãos humanos. Essas infecções são difíceis de tratar devido à resistência aos antimicrobianos. Além disso, o complexo *M. abscessus* também é resistente a determinados desinfetantes (LEE et al., 2015).

Entre 2004 a 2008, no Brasil, ocorreram vários casos e surtos de infecções pós-operatórias causadas por MCR, com mais de 2 mil casos notificados, a maioria dos surtos foi relacionada a procedimentos cirúrgicos e estéticos, como videocirurgias, lipoaspiração, implantes de prótese mamária e mesoterapia. O aspecto comum foi a desinfecção de alto nível com Glutaraldeído a 2% por 30 minutos, além de falhas nos processos de limpeza e desinfecção de artigos médicos. A fim de conter o surto, foram aplicadas medidas pela Anvisa como a suspensão da esterilização química por imersão e o aumento das exigências para o registro de desinfetantes e esterilizantes (SOUTO et al., 2012).

Após as publicações por parte da Anvisa na tentativa de conter os surtos e as modificações nas metodologias da AOAC, não foi realizado um controle efetivo, como, por exemplo, um programa de análise prévia, para verificar se as indústrias de saneantes estão atendendo ao disposto nos regulamentos publicados. Por isso, é essencial o monitoramento da qualidade de produtos desinfetantes de alto nível atualmente comercializados.

No presente trabalho, a cepa de referência *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 apresentou alta tolerância aos dois lotes do desinfetante à base de Glutaraldeído a 2% testados. Foi observado crescimento em todos os tubos dos meios de cultura nos ensaios realizados. Essa cepa de referência é representante do surto de infecções cirúrgicas que ocorreu em Belém em 2004 e se disseminou

para outros estados do Brasil, sendo inserida na legislação referente à comprovação da eficácia de desinfetantes de alto nível para artigos semicríticos, por meio da Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009b).

Estudos anteriores utilizando teste em suspensão mostraram que cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* de origem clínica pertencentes ao clone BRA 100 sobreviveram quando expostas a concentrações crescentes de Glutaraldeído, com tempo de contato de 30 minutos (LORENA et al., 2010) e quando expostas ao Glutaraldeído a 2%, em um tempo de contato que variou de 30 minutos a 10 horas (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009). Essa alta tolerância também foi evidenciada em outro trabalho utilizando a metodologia da AOAC quando a cepa de referência *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 foi testada frente ao Glutaraldeído a 2% (SOUTO et al., 2012). Este clone específico, provavelmente, possui mecanismos biológicos de resistência não partilhados por outras cepas ou até mesmo por outras espécies (LORENA et al., 2010).

No presente estudo, o produto à base de Glutaraldeído a 2% não foi capaz também de eliminar *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062, cepa de referência preconizada pela metodologia da AOAC. Outro estudo também demonstrou essa ineficácia frente ao *M. bovis* (SOUTO et al., 2012). Ambos os trabalhos utilizaram o método oficial de avaliação da eficácia de desinfetantes no Brasil. Já em estudos utilizando o teste em suspensão, *M. bovis* mostrou-se suscetível ao Glutaraldeído (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009, LORENA et al., 2010). Essa diferença nos resultados obtidos pode ser explicada pelo tipo de metodologia empregada. O método oficial preconiza o uso de carreador (cilindro de porcelana). No teste com carreador, as bactérias se aderem a uma superfície, dificultando o acesso pelos biocidas. No teste em suspensão, a ação do produto analisado é facilitada pelo contato direto com o microrganismo em uma suspensão homogênea (SOUTO et al., 2012).

Apesar da proibição da esterilização química por imersão pela Resolução RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009, a desinfecção de alto nível para artigos semicríticos com Glutaraldeído continua liberada já que esta norma não se aplica ao instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos (BRASIL, 2009a). O Glutaraldeído ainda é largamente utilizado para este fim, porém, a tolerância de MCR e a toxicidade ocupacional pressionam por adoção de biocidas alternativos (PSALTIKIDIS et al., 2014).

O ideal seria a suspensão da desinfecção de alto nível por produtos à base de Glutaraldeído para diminuir a seleção e disseminação das cepas tolerantes e o risco de infecção hospitalar, visando a promoção da saúde da população (SOUTO et al., 2012).

Uma alternativa seria a utilização de desinfetantes à base de Ácido peracético. Alguns estudos já mostraram a eficácia desse produto frente a MCR na desinfecção de alto nível de equipamentos médicos (LORENA et al., 2010, SOUTO et al., 2012). Esses estudos estão em concordância com os resultados apresentados nesse trabalho, pois tanto *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 quanto *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062 se mostraram sensíveis frente ao desinfetante contendo Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio em sua formulação.

Como os instrumentais ópticos são equipamentos delicados e de alto custo, há o receio de se adotar novos desinfetantes, principalmente quando não há autorização expressa dos fabricantes, podendo levar ao cancelamento da garantia dos equipamentos. Muitos fabricantes recomendam apenas o uso de Glutaraldeído, outros autorizam o uso de Ácido peracético, contudo, de formulação e marca específicas (PSALTIKIDIS et al., 2014).

O Glutaraldeído ainda é o desinfetante mais usado devido à alta compatibilidade com todos os materiais e o baixo custo. Entretanto, sua ação na fixação de material orgânico pode levar à obstrução dos canais dos equipamentos, caso não seja realizada limpeza eficiente, favorecendo a formação de biofilme (PSALTIKIDIS et al., 2014).

As principais desvantagens do Ácido Peracético são o custo elevado e a compatibilidade variável, podendo ser corrosivo para algumas ligas e metais. Suas vantagens são menor capacidade de fixação de proteína residual em relação ao glutaraldeído e, como dito anteriormente, eficácia micobactericida comprovada (PSALTIKIDIS et al., 2014).

Outra alternativa seria a Glucoprotamina que não é corrosiva, é compatível com a maioria dos instrumentos usados em hospitais e não é volátil, o que diminui o risco de irritação para olhos, nariz e garganta. Ao contrário dos aldeídos, a estrutura química da Glucoprotamina não promove a fixação de proteínas na superfície dos equipamentos (TYSKI et al., 2009, MEINKE et al., 2012, CHOJECKA et al., 2015).

Existem alguns estudos mostrando a eficácia bactericida da Glucoprotamina frente a cepas de referência e cepas clínicas multirresistentes, assim como, a eficácia bactericida sem a prévia lavagem dos instrumentos (WIDMER; FREI, 2003, TYSKI et al., 2009). Mas escassos são os estudos de avaliação da atividade micobactericida desse ativo.

Os resultados deste trabalho mostram que a Glucoprotamina não foi capaz de eliminar *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062. Um terceiro ensaio utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 com tempo de contato de 30 minutos seria necessário já que a metodologia preconiza dois ensaios com o mesmo resultado para a obtenção de um resultado final. Assim como, seria necessário um segundo ensaio com o tempo de contato de 40 minutos.

Apesar dos resultados inconclusivos frente a *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, este trabalho mostrou certa tolerância de *M. bovis* à Glucoprotamina. Através de um teste de suspensão quantitativo, um estudo mostrou a eficácia micobactericida de um desinfetante contendo Glucoprotamina a 25% frente à MCL e MCR, inclusive frente a amostras de *M. chelonae* resistentes ao glutaraldeído (MEYER; KLUIN, 1999). No presente trabalho, também foi usada a Glucoprotamina concentrada a 25%. Porém, de acordo com as instruções do fabricante o produto foi diluído em água para uma concentração de 5% para desinfecção de alto nível. O estudo utilizando o teste em suspensão não apresentou a etapa de diluição do produto o que pode explicar a diferença nos resultados.

## 6 CONCLUSÕES

- O lote A do desinfetante à base de Glutaraldeído não foi capaz de eliminar *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062 e nem *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 com tempo de contato de 60 minutos recomendado pelo fabricante. O lote B da mesma marca também não foi capaz de matar os microrganismos teste durante a avaliação da atividade micobactericida, nem com o tempo de contato alterado para 20 minutos e nem com 60 minutos.
- O Glutaraldeído ainda é largamente utilizado na desinfecção de alto nível de instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos, porém, é necessária a adoção de biocidas alternativos devido à tolerância de MCR que aumenta o risco de infecção hospitalar.
- Durante a avaliação da atividade micobactericida pelo método oficial, o produto que contém Ácido peracético e Peróxido de hidrogênio em sua formulação mostrou-se eficaz frente a *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS 00062 e frente a *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, o que pode representar uma alternativa ao uso do Glutaraldeído.
- Na avaliação da atividade micobactericida do produto à base de Glucoprotamina, foi observada tolerância de *M. bovis* cepa BCG Moreau. Porém, ensaios adicionais serão necessários para determinar a eficácia do produto frente *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594.
- Para a promoção da saúde da população é fundamental o monitoramento da qualidade de produtos desinfetantes de alto nível atualmente registrados e comercializados no país.

## REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 12, p. 5493-5501, 2004.

ADÉKAMBI, T. et al. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 56, p. 133-143, 2006.

ANVISA–Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório descrito de investigação de casos de infecções por Micobactérias Não Tuberculosas de Crescimento Rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009.** 2011.

Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/relatorio\\_descrito\\_mcr\\_16\\_02\\_11.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/relatorio_descrito_mcr_16_02_11.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2015.

ALVARENGA, L. et al. Infectious post-LASIK crystalline keratopathy caused by nontuberculous mycobacteria. **Cornea**, v. 21, p. 426-429, 2002.

BENWILL, J.L.; WALLACE, R.J., Jr. *Mycobacterium abscessus*: challenges in diagnosis and treatment. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 27, p. 506–10, 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 mar. 2007. Disponível

em:<http://www.anvisa.gov.br/saneantes/legis/especifica/desinfetante.htm>. Acesso em: 25 out. 2015.

BRASIL. Resolução nº 75, de 23 de outubro de 2008. Dispõe sobre a comprovação de eficácia de Esterilizantes e Desinfetantes Hospitalares para Artigos Semi-Críticos frente às micobactérias *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium massiliense* e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 out. 2008. Disponível

em:<<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=33819&word=resolu%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 15 out. 2015.

BRASIL. Resolução nº 8, de 27 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido – MCR em serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 fev. 2009a. Disponível em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0008\\_27\\_02\\_2009.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0008_27_02_2009.html)>. Acesso em: 22 set. 2015.

BRASIL. Resolução RDC nº 51 de 21 de outubro de 2009. Dispões sobre a comprovação da eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria *Mycobacterium massiliense* e dá outras

providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 out. 2009b. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0051\\_21\\_10\\_2009.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0051_21_10_2009.html). Acesso em 15 out. 2010.

BRASIL. Resolução nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 ago. 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 31, de 04 de Julho de 2011. Dispõe sobre a indicação de uso dos produtos saneantes na categoria "Esterilizante", para aplicação sob a forma de imersão, a indicação de uso de produtos saneantes atualmente categorizados como "Desinfetante Hospitalar para Artigos Semicríticos" e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 jul. 2011.

BRITO, A.C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2008.

BROWN-ELLIOT, B. A.; WALLACE, R.J., Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 716–746, 2002.

CHOJECKA, A. et al. Glucoprotamin antimicrobial activity against selected standard antibiotic-resistant bacteria and reference strains used in the assessment of disinfection efficacy. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 66, n. 3, p. 281-288, 2015.

DUARTE, R.S. et al. An epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 7, p. 2149-2155, 2009.

FONTANA, R.T. As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Rev Bras Enferm**, v. 61, n. 3, p. 371-376, 2008.

GRIFFITH, D.E. et al. *Mycobacterium abscessus*: "Pleased to Meet You, Hope You Guess My Name..." **An Am Thorac Soc.**, v.12, n.3, p.436-9, 2015.

GROOTE, M.A. et al. Analyses of a panel of rapidly growing mycobacteria for resistance to aldehyde-based disinfectants. **Am J Infect Control.**, v. 42, p. 932-934, 2014.

GUGLIELMETTI, L. et al. Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view. **Future Microbiol.**, v.10, n.9, p.1467-83, 2015.2015.

HEYDARI, H. et al. MabsBase: a *Mycobacterium abscessus* genome and annotation database. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e62443, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3210.009**: Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida de



desinfetantes. Rev. 00. Rio de Janeiro, 2016. 25p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KANTOR, I. N. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, 1979. 63 p. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas, 11).

LEAO, S.C. et al. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 61, n. 9, p. 2311-2313, 2011.

LEE, M-R. et al. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, n. 9, p. 1638-1646, 2015.

LORENA, N.S.O.; DUARTE, R.S.; PITOMBO, M.B. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos – a hipótese do glutaraldeído. **Rev Col Bras Cir.**, v. 36, n. 3, p. 266-267, 2009.

LORENA, N.S.O. et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. **Acta Cir Bras.**, v. 25, n. 5, p. 455-459, 2010.

MACEDO, J.L.S.; HENRIQUES, C.M.P. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 24, n. 4, p. 544-551, 2009.

MCDONNELL, G.E. Chemical Disinfection. In: **Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action and resistance**. Washington, DC: ASM Press (ed), 2007. p. 85-88.

MEINKE, R. et al. Equal efficacy of glucoprotamin and an aldehyde product for environmental disinfection in a Hematologic Transplant Unit: a prospective crossover trial. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 33, n. 11, p. 1077-1080, 2012.

MEYER, B.; C.KLUIN, C. Efficacy of Glucoprotamin® containing disinfectants against different species of atypical Mycobacteria. **J Hosp Infect.**, v. 42, p. 151-154, 1999.

NASH, K.A. et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. **J Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, n. 2, p.170-177, 2005.

NASH, K.A.; BROWN-ELLIOT, B.A.; WALLACE, R.J., Jr. A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **J Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, n. 4, p. 1367–1376, 2009.

PADOVEZE, M.C. et al. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **J Hosp Infect.**, v. 67, n. 2, p. 161-167, 2007.

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 31, n. 11, p. 529-533, 2009.

PRIMM, T.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin Microbiol.**, v. 17, p. 98-106, 2004.

PSALTIKIDIS, E.M. et al. Desinfetantes de alto nível alternativos ao glutaraldeído para processamento de endoscópios flexíveis. **Cogitare Enferm.**, v. 19, n. 3, p. 465-474, 2014.

SAMPAIO, J.L. et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 55, n. 2, p. 107-118, 2006.

SOUTO, A.S.S. et al. Tolerância de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* a desinfetantes de alto nível. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, v. 71, n. 2, p. 362-371, 2012.

TETTELIN, H. High-level relatedness among *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* strains from widely separated outbreaks. **Emerg Infect Dis.**, v. 20, n. 3, p. 364-371, 2014.

TOMASINO, S. **Disinfectants**. In: Official Methods of Analysis. 19 ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, cap. 6, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 68-69.

TYSKI, S. et al. Antimicrobial activity of glucoprotamin-containing disinfectants. **Polish J Microbiol.**, v. 58, n. 4, p. 347-353, 2009.

VIANA-NIERO, C. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol.**, v. 46, p. 850-855, 2008.

WIDMER, A.F.; FREI, R. Antimicrobial activity of glucoprotamin: a clinical study of a new disinfectant for instruments. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, n. 24, p. 762-764, 2003.