

¿PUEDEN SOBREVIVIR LOS MICROORGANISMOS EN UN DETERGENTE ENZIMÁTICO?

**Hallazgo de *Candida parapsilosis* y *Purpureocillium lilacinum* en una fórmula comercial.**

Autores: Farmacéutico Lucas E. Ruiz<sup>1,4</sup>, Farmacéutica Especialista en Esterilización Graciela A. Starchuk<sup>1,4</sup>, Farmacéutico Matías E. Kanneman<sup>1</sup>, Bioquímica María G. Pineda Ortega<sup>2</sup>, Dra. Laura E. Friedman<sup>3,4</sup>, Farmacéutica Especialista en Esterilización María V. Bonada<sup>1,4</sup>

1. Hospital de Pediatría J. P. Garrahan / Área Esterilización.
2. Hospital de Pediatría J. P. Garrahan / Sector de Micología, Servicio de Microbiología.
3. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, IBAViM.
4. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Carrera de Especialización en Esterilización.

Correo electrónico de contacto: [mvale.bon@gmail.com](mailto:mvale.bon@gmail.com)

## RESUMEN

El detergente enzimático es un producto médico de amplio uso en instituciones hospitalarias utilizado para la limpieza de dispositivos médicos. Se caracteriza por presentar en su formulación diferentes enzimas que potencian la eliminación de los contaminantes orgánicos. Al efectuar los ensayos microbiológicos para la validación del lavado, se halló contaminación microbiana en el detergente enzimático con *Candida parapsilosis* y *Purpureocillium lilacinum*, patógenos oportunistas riesgosos para pacientes neonatos e inmunocomprometidos. Asimismo, estos microorganismos son utilizados industrialmente para la obtención de enzimas según bibliografía.

Todo fabricante de productos médicos debe dar cumplimiento a Buenas Prácticas de Fabricación según Disposición ANMAT 3266/2013. Asimismo, para realizar el control microbiológico de un producto terminado como el detergente enzimático, puede tomarse como válida la implementación de la metodología general de análisis número 90 del cuarto volumen de la FA VII Ed. y la Disposición ANMAT 6967/2022.

Se realizó el control microbiológico de 5 lotes del fabricante A y 2 lotes del fabricante B. De los 5 lotes del fabricante A, 2 arrojaron resultados positivos para los microorganismos descriptos y los dos lotes evaluados del fabricante B fueron negativos.

Los resultados demuestran que los microorganismos pueden sobrevivir en un detergente enzimático. A partir de este descubrimiento, se implementó un protocolo interno de análisis microbiológico a cada lote que se recibe y se exige al proveedor los controles higiénicos.

Los hallazgos de este trabajo demuestran la necesidad de realizar un estudio prospectivo multicéntrico de los detergentes enzimáticos disponibles en las instituciones de salud.

Palabras clave: detergente enzimático, contaminación microbiana, control de calidad.

## a) INTRODUCCIÓN

El detergente enzimático es un producto médico (PM) de amplio uso en instituciones hospitalarias empleado para la limpieza de los dispositivos médicos (DM) con la finalidad de reducir y estandarizar la carga microbiana luego del uso e incrementar la bioseguridad durante la manipulación posterior del DM. La limpieza es el paso que precede a la desinfección de alto nivel y esterilización, siendo fundamental ya que permite garantizar los resultados de dichos procesos.<sup>1</sup>

Los detergentes enzimáticos se caracterizan por presentar en su formulación diferentes tipos de enzimas que aceleran los procesos de degradación y potencian los mecanismos de eliminación de los principales contaminantes orgánicos siendo las más empleadas amilasa, proteasa y lipasa.

Todo fabricante de productos médicos debe dar cumplimiento a Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) según Disposición ANMAT 3266/2013 donde se detallan controles higiénicos en diversos puntos claves de la línea de producción.<sup>2</sup> Para implementar el control microbiológico de un producto terminado como el detergente enzimático, puede tomarse como válida la utilización de la metodología general de análisis número 90 “CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES” del cuarto volumen de la FA VII Ed.<sup>3</sup> junto a la disposición ANMAT 6967/2022<sup>4</sup>, donde se detallan los siguientes puntos de corte para:

- Recuento de microorganismos aerobios totales (UFC/g ó mL):  $10^2$
- Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras (UFC/g ó mL):  $10^1$
- Ausencia de microorganismos patógenos y objetables (patógenos potenciales)

*Candida parapsilosis* es un hongo levaduriforme diploide, es la segunda especie más común del género *Candida* aislada en América Latina y es un patógeno oportunista relacionado principalmente con infecciones en pacientes neonatos, inmunocomprometidos y en aquellos que requieren la colocación de DM invasivos<sup>5</sup>. *C. parapsilosis* es un hongo pseudodimórfico (importante factor de virulencia) que desarrolla como levadura o en forma de pseudohifa. Su alta capacidad de adherirse a diferentes superficies y la consecuente formación de biofilms (donde conviven ambas morfologías) deriva en una disminución de la sensibilidad ante los tratamientos antifúngicos (como los azoles), aumentando su virulencia y, en consecuencia, la tasa de mortalidad (en comparación con especies incapaces de formar biofilm).<sup>5,6</sup> La formación del biofilm ocurre ante una higiene inadecuada, derivando en contaminaciones difíciles de erradicar en superficies de catéteres venosos, sistemas de ventilación, equipamiento y maquinarias, reservorios de agua, entre otros<sup>7</sup>. Por otro lado, entre las levaduras, el género *Candida* es uno de los que presenta mayor potencial para la producción de lipasas según reportes de literatura<sup>8</sup>.

*Purpureocillium lilacinum* (ex *Paecilomyces lilacinus*), perteneciente a la nueva familia *Ophiocordycipitaceae* (Orden *Hypocreales*) como nuevo género *Purpureocillium*, clasificado a partir de análisis filogenéticos y secuenciación parcial del gen del ARN ribosomal 18S. Es considerado un patógeno emergente y oportunista que representa un riesgo muy elevado para los pacientes con inmunodeficiencia causada por enfermedad, tratamientos hematológicos, tratamientos con esteroides o con trasplante de órganos sólidos. Macroscópicamente es casi indistinguible del género *Aspergillus* spp. y su infección genera una sintomatología inespecífica difícil de diferenciar de otras infecciones fúngicas, por lo que realizar la identificación de rutina de mohos emergentes permitiría aumentar su conocimiento epidemiológico.<sup>9</sup> *P. lilacinum* se aísla de suelos alcalinos del territorio argentino. Es utilizado en la producción de enzimas con actividad proteolítica y queratolítica a partir de sustratos de bajo costo, las cuales pueden emplearse en las formulaciones de detergentes y también como agente de biocontrol de insectos. La obtención de estas enzimas requiere un proceso posterior de purificación, para aislarlas de manera óptima sin contaminación microbiana<sup>10,11</sup>

## b) OBJETIVOS

- Exponer los hallazgos de contaminación microbiológica encontrados en un detergente trienzimático del mercado nacional, durante la validación del lavado de DM en el Área de Esterilización del Hospital.
- Demostrar la necesidad de implementar controles higiénicos en el proceso de elaboración de los detergentes, antes de la liberación al uso, incluyendo el producto terminado.

## c) MATERIALES Y MÉTODOS

Se efectuaron ensayos cualitativos y cuantitativos sobre cinco lotes de entrega consecutiva de primer fabricante (A) y 2 lotes de un segundo fabricante (B).

Para los ensayos se tomó una muestra pura del detergente de un envase cerrado de los lotes evaluados, en condiciones asépticas. A partir de cada muestra, se realizó un enriquecimiento previo en TSB y se realizaron aislamientos en los medios agar sangre, agar Sabouraud y los medios selectivos para bacterias Levine, Chapman y Cetrimide. Ante la presencia de desarrollo, se obtuvieron cultivos puros y se realizó la identificación microbiana por técnicas convencionales y espectrometría de masas MALDI-TOF (equipo VITEK® MS).

Además, se realizó un recuento de viables empleando placas de agar sangre en las cuales se sembró detergente puro y diluciones seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  (utilizando como solvente agua de calidad inyectable). Los procedimientos se llevaron a cabo en cabina de flujo laminar vertical.

## d) RESULTADOS

FABRICANTE	LOTE	RESULTADO CUALITATIVO	RESULTADO CUANTITATIVO
A	1A	<b>CON DESARROLLO *</b>	<b><math>10^5</math> UFC/ml</b>
A	2A	SIN DESARROLLO	SIN DESARROLLO
A	3A	SIN DESARROLLO	SIN DESARROLLO
A	4A	SIN DESARROLLO	SIN DESARROLLO
A	5A	<b>CON DESARROLLO °</b>	<b><math>10^4</math> UFC/ml</b>
B	1B	SIN DESARROLLO	SIN DESARROLLO
B	2B	SIN DESARROLLO	SIN DESARROLLO

\* Lote 1A: presencia de levaduras y hongos miceliares.

° Lote 5A: presencia de levaduras.

A partir de los enriquecimientos no se observó desarrollo bacteriano pero en los aislamientos obtenidos en agar Sabouraud y agar sangre se detectó desarrollo de levaduras y de hongos miceliares (lote 1A) y de levaduras (lote 5A). La observación microscópica de las colonias levaduriformes mostró levaduras y pseudohifas. La colonia del hongo micelial mostró la producción de un pigmento violáceo y microscópicamente observaron hifas septadas fiálides elongadas y conidios fusiformes, microscópicamente similares al género *Aspergillus*. Los microorganismos fueron identificados por MALDI-TOF como *C. parapsilosis* y *P. lilacinum*

respectivamente.

Dentro de la institución se realizó el “recall” de los lotes con crecimiento y se efectuó el reporte al fabricante y a la autoridad sanitaria.

#### e) DISCUSIÓN

Al analizar la normativa vigente, no fue posible encontrar un criterio unificado para los ensayos requeridos durante el registro y control del producto final de este tipo de PM, que debe ser elaborado en cumplimiento de las BPF de la Disposición ANMAT 3266/2013.<sup>2</sup>

Los fabricantes emplean diferentes estrategias para evitar la proliferación microbiana como disminuir la actividad de agua de la solución (al reemplazar el agua por otro solvente), aumento de la densidad del producto y la utilización de diversos conservantes (en ciertos casos en el registro de ANMAT el fabricante no declara la formulación cuali-cuantitativa completa, por lo que se desconoce los conservantes utilizados) declarando que sus formulaciones son bacteriostáticas y fungistáticas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la presencia de levaduras y hongos miceliales viables en alto número, recuperables en el producto final.

Según la bibliografía, las enzimas que se emplean en la producción de detergente enzimático pueden obtenerse a partir de diversas bacterias y hongos, siendo una posible fuente de contaminación. Por lo tanto, es de suma importancia los controles exhaustivos a los procesos de purificación de enzimas.

Ambos microorganismos hallados son microorganismos objetables y patógenos potenciales en pacientes inmunocomprometidos, siendo en consecuencia de alta preocupación y seguimiento. Asimismo, cabe resaltar que el *P. lilacinum* es un microorganismo muy poco habitual en el ámbito sanitario. Al realizar una búsqueda en bases de datos de casos en Argentina, se encontró un estudio prospectivo sobre agentes etiológico causantes de queratitis micótica por mohos, donde aparece *P. lilacinum* con un 1.3% de incidencia<sup>12</sup> y ha sido reportado como agente causal emergente de micosis invasivas<sup>9</sup> en diversos países.

#### f) CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que los microorganismos pueden sobrevivir en un detergente enzimático.

La contaminación microbiana encontrada en el producto terminado puede tener diversos orígenes, desde una maquinaria o sitio de producción con falta de limpieza frecuente que derive en el establecimiento de contaminación persistente (formación de biofilm) hasta problemas de purificación de las enzimas utilizadas en los detergentes, las cuales pueden obtenerse a partir de ciertos hongos y levaduras, según bibliografía.

Al analizar la normativa nacional, se encuentra vigente la Disposición ANMAT 3266/2013 que exige los controles higiénicos relacionados con la BPF<sup>2</sup> y al considerar el detergente enzimático como un producto terminado no obligatoriamente estéril, es posible aplicar la metodología general de análisis número 90 “CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES” del cuarto volumen de la FA VII Ed.<sup>3</sup> y la disposición ANMAT 6967/2022.<sup>4</sup>

A partir de este hallazgo se implementó en la institución un protocolo interno de análisis microbiológico a cada lote que se recibe y se exige al proveedor los controles higiénicos de ese lote.

Finalmente, los hallazgos de este trabajo demuestran la necesidad de realizar un estudio prospectivo multicéntrico de los detergentes enzimáticos disponibles en las instituciones de salud.

### g) CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

### h) BIBLIOGRAFIA

- 1) argentina.gob.ar [Internet]. Resolución MSN 1067/2019 - “Directrices de organización y funcionamiento de centrales de Esterilización y reprocesamiento de productos médicos en establecimiento de salud y establecimientos exclusivos de esterilización externos” [citado el 08/08/2023]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-1067-2019-325022/texto>
- 2) argentina.gob.ar [Internet]. Disposición ANMAT 3266/2013 - “Reglamento Técnico Mercosur de Buenas prácticas de Fabricación de Productos Médicos y Productos para Diagnóstico de uso in vitro.” [citado 08/08/2023]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-3266-2013-216083/texto>
- 3) opinionpublica.anmat.gob.ar [Internet]. FA VII Ed. cuarto volumen, metodología general de análisis número 90 “CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES” [citado 08/08/2023]. Disponible en: <https://opinionpublica.anmat.gob.ar/proyectos/216.pdf>
- 4) argentina.gob.ar [Internet]. Disposición ANMAT 6967/2022 - "Productos Farmacéuticos - Control Microbiológico" [citado 09/08/2023]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-6967-2022-370674>
- 5) Branco J, Miranda IM, Rodrigues AG. Candida parapsilosis virulence and antifungal resistance mechanisms: a comprehensive review of key determinants. J Fungi. 2023, 9, 80. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jof9010080>
- 6) Gómez-Molero E, De-la-Pinta I, Fernández-Pereira J, Grob U, Weig M, Quindós G, et al. Candida parapsilosis colony morphotype forecasts biofilm formation of clinical isolates. J Fungi. 2022, 7, 33. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jof7010033>
- 7) Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. BMC Microbiol. 2011, 11, 180. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-180>
- 8) Martínez-Corona R, Cortes-Penagos C, Madrigal Pérez LA, González-Hernández JC. Hongos y levaduras: fábricas de lipasas. Interciencia. 2019, 44, 7. Disponible en: [https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2019/08/378\\_A\\_Gonzalez\\_Hernandez\\_v44n7.pdf](https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2019/08/378_A_Gonzalez_Hernandez_v44n7.pdf)
- 9) Sprute R, Salmanton-Farcía J, Sal E, Malaj X, Ráčil Z, Ruiz de Alegría Puig C, Falces-Romero I. Invasive infections with *Purpureocillium lilacinum*: clinical characteristics and outcome of 101 cases from Fungiscope and the literature. J Antimicrob Chemother. 2021 May 12;76(6):1593-1603. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8120338/>

- 10) Cavello IA, Hours RA, Rojas NL, Cavalitto SF. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS 876. *Process Biochemistry*. 2013, 48; 5-6: 972-978.  
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.012>.
- 11) Cabello IA. Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y caracterización. Tesis Doctoral, Departamento de química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 2013.  
Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/32430>
- 12) Refojo N, Minervini P, Hevia AI, Abrantes RA, Fernández J, Apestey N, et al. Keratitis caused by moulds in Santa Lucía Ophthalmology Hospital in Buenos Aires, Argentina. 2013;33(1):1-6. Disponible en:  
<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-keratitis-caused-by-moulds-in-S1130140615000248>