

Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital

Lidia NUÑEZ y Juan MORETTON

Cátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4to piso. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. Correo-e: jamorett@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Grandes volúmenes de soluciones desinfectantes se utilizan en hospitales para la eliminación de patógenos. Si las concentraciones de desinfectantes descartadas son suficientemente altas, los efluentes hospitalarios pueden convertirse en reservorios para la selección de bacterias resistentes. El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la flora microbiana de un efluente hospitalario y el perfil de resistencia de la población bacteriana a distintos desinfectantes. Se seleccionaron los desinfectantes más utilizados en el centro de salud: glutaraldehído, yodo povidona, y clorhexidina. Para determinar la susceptibilidad de la flora mixta presente en las muestras se utilizó el ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar para la clorhexidina, y ensayos bactericidas para los otros agentes antimicrobianos. Las bacterias resistentes fueron identificadas y se evaluó su nivel de resistencia. En la población bacteriana de las muestras analizadas entre un 2.0 y un 4.3 % resultaron ser resistentes a la clorhexidina. La resistencia a los demás desinfectantes se observó en aproximadamente el 0.02 % de la población bacteriana del efluente. Las bacterias resistentes fueron identificadas como especies de los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus*, microorganismos que en muchos casos, son agentes de infecciones intrahospitalarias.

Palabras clave: Aguas residuales, hospital, resistencia a desinfectantes.

INTRODUCCIÓN

El vertido de efluentes no tratados es una de las principales causas de la pérdida de la calidad de las

fuentes de agua. Los efluentes hospitalarios presentan un problema particular, al contener una mezcla de materia orgánica, antibióticos, antisépticos, detergentes, solventes y medicamentos, a los que se suman excretas y secreciones humanas contaminadas por diferentes tipos de patógenos (Ortolan, 1999).

Grandes volúmenes de soluciones desinfectantes se utilizan en hospitales para la eliminación de patógenos en superficies (pisos, paredes, etc.), instrumental médico y en la piel. El alcohol, los aldehídos y distintos compuestos clorados forman parte importante como principios activos de dichas soluciones (Kümmerer, 2001). Si las concentraciones de desinfectantes descartadas son suficientemente altas, los efluentes hospitalarios pueden convertirse en reservorios para la selección de bacterias resistentes.

La resistencia a antibióticos de distintas especies bacterianas aisladas de aguas naturales y de efluentes ha sido ampliamente estudiada (Guardabassi y cols., 1998; Iversen y cols., 2002; Kümmerer y cols., 2003; Reinthaler y cols., 2003). En contraste solo durante los últimos 20 años comenzó a ser tema de investigación la resistencia a los desinfectantes en cepas aisladas de humanos y más recientemente en cepas aisladas de medio ambiente. Se han publicado varios estudios de resistencia bacteriana a desinfectantes, en la mayoría de los casos de cepas de origen clínico (Block y col., 2002; Griffiths y cols., 1997; Lear y cols., 2002). Hingst y cols. (1995), observaron una alta prevalencia de bacterias resistentes a cloruro de benzalconio en un efluente de una planta de tratamiento municipal.

La resistencia adquirida a desinfectantes puede surgir por mutación, adaptación o por adquisición de material genético (Russell, 2003). Los desinfectantes pueden actuar como una presión selectiva para la retención de plásmidos que contienen genes para la resistencia a antibióticos y contribuir al desarrollo de

dicha resistencia (Suller y col., 1999; White y col., 2001; McBain y cols., 2002).

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, los efluentes hospitalarios son vertidos sin tratamiento al sistema cloacal municipal. Los líquidos cloacales son eliminados, con un mínimo tratamiento físico, al Río de la Plata.

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de resistencia a desinfectantes de la población bacteriana presente en un efluente hospitalario.

Para realizar este estudio se extrajeron muestras de las cámaras cloacales del Hospital de Clínicas General San Martín, Hospital Escuela de la Universidad de Buenos Aires. En una primera etapa se caracterizaron las muestras del efluente determinando el número de bacterias heterotróficas, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En una segunda etapa se estudió la resistencia de las poblaciones microbianas a los desinfectantes más utilizados en el hospital, glutaraldehído, clorhexidina y yodo-povidona, y se aislaron y tipificaron las principales cepas resistentes. Finalmente se estudió el perfil de resistencia al desinfectante de las cepas aisladas.

El Hospital San Martín es un hospital de alta complejidad al cual concurren personas que residen en la ciudad de Buenos Aires y también de ciudades cercanas. Actualmente tiene 400 camas/día disponibles. El laboratorio realiza determinaciones en diversas áreas como hematología, bacteriología, citología, patología y endocrinología tanto para pacientes ambulatorios como internados. Además, en dicho centro de salud funciona una importante área docente a la cual asisten profesores, alumnos y becarios. Libera aproximadamente 560 m³/día al sistema cloacal municipal (Paz y cols., 2004).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras fueron extraídas de la cámara cloacal ubicada en el sector Azcuénaga del Hospital de Clínicas José de San Martín donde se vierten aguas residuales correspondientes a los servicios del Laboratorio Central, Nefrología, Infectología, Hematología y Anatomía Patológica entre otros.

Se utilizaron muestras compuestas debido a la complejidad de las actividades de dicha institución hospitalaria. Los muestreos se realizaron tomando 1 litro de agua residual cada 2 horas durante un período de ocho horas, correspondiente al horario de mayor funcionamiento del hospital. Las muestras extraídas diariamente se mezclaron y se mantuvieron a 4°C.

Los resultados analizados en este trabajo, corresponden a muestreos realizados en noviembre (muestra 1) y diciembre (muestra 2) de 2003.

Para los recuentos microbiológicos se realizaron diluciones seriadas de las muestras con solución fisiológica. Alícuotas de cada dilución fueron sembradas en Agar Tripteína Soja (TSA) para recuento de bacterias heterotróficas, en Agar

Cromogénico para coliformes y *Escherichia coli* y en Agar Salado Manitol para *Staphylococcus aureus*.

Se obtuvieron las cepas resistentes al glutaraldehído al enfrentar la flora bacteriana del efluente a este producto al 2 % durante una hora (Griffiths y cols., 1997). Con respecto al yodo, se determinó el porcentaje de bacterias resistentes tratando las muestras con yodo-povidona al 0,1 % durante 4 minutos (Pyle y cols., 1994). Las cepas resistentes a la clorhexidina fueron seleccionadas mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima utilizando como punto de ruptura 50 mg /L (Russell y col., 1986).

A las bacterias aisladas de la población resistente a cada uno de los desinfectantes ensayados, se les determinó el nivel de susceptibilidad para el antimicrobiano correspondiente.

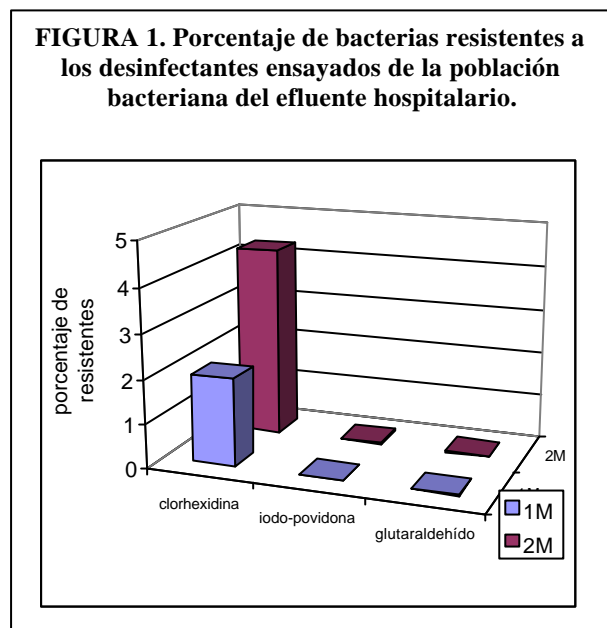
Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la clorhexidina se utilizaron placas de TSA con diferentes concentraciones de desinfectante (500- 250- 125- 100-50- 25 ppm), y se inoculó con 0,1 mL de la suspensión bacteriana. Se incubó durante 48 horas a 35 °C y la CIM se calculó como la menor concentración que inhibe el crecimiento bacteriano (Suller y col., 1999).

Para verificar la resistencia al yodo de las cepas aisladas se utilizó una suspensión de 10⁷ a la cual se agregó yodo-povidona hasta alcanzar una concentración del 1 %. Se tomaron muestras a diferentes intervalos y se neutralizó con el agregado de tiosulfato de sodio en una concentración final del 0,1 % Las diluciones se sembraron en placas de Agar Nutritivo.

Se determinó el nivel de resistencia al glutaraldehído, agregando 100 µL de la suspensión bacteriana a 9.9 ml de glutaraldehído al 2 %. Transcurridos 20, 30 y 60 minutos de contacto se neutralizó la actividad desinfectante por dilución con agua peptonada - Tween 80 al 3 %, y 0,1 mL de las diluciones se sembraron en TSA. La determinación de las unidades formadoras de colonias (ufc) se realizó por duplicado incubando durante 48 h a 35°C (Griffiths y cols., 1997).

TABLA 1. Composición microbiológica de las muestras del efluente hospitalario.

<i>Microorganismos</i>	<i>Muestra 1</i>	<i>Muestra 2</i>
Bacterias heterotróficas	6x10 ⁴ ufc/mL	2x10 ⁵ ufc/mL
<i>Coliformes</i>	1.1x10 ⁵ / 100 mL	1.1x10 ³ / 100 mL
<i>Escherichia coli</i>	5.5x10 ⁴ / 100 mL	30 / 100 mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	3x10 ⁴ /100 mL	4x10 ² / 100 mL

FIGURA 1. Porcentaje de bacterias resistentes a los desinfectantes ensayados de la población bacteriana del efluente hospitalario.

Las bacterias resistentes se identificaron siguiendo el esquema del Manual of Clinical Microbiology (Murray y cols., 1999).

RESULTADOS

Las características físico-químicas del efluente hospitalario fueron informadas en un trabajo anterior por Paz y cols. (2004). Los resultados de la composición microbiológica del efluente se pueden observar en la Tabla 1.

Estos datos reflejan una gran variación en la flora bacteriana, especialmente con respecto a *Staphylococcus aureus*, que proviene de secreciones y sangre de personas enfermas o portadoras. Esto puede deberse a las diferentes actividades realizadas en el sector que vierte el líquido residual a la cámara de donde se tomaron las muestras. Con respecto a los niveles de coliformes y de *Escherichia coli*, se observaron niveles inferiores a los detectados por otros autores (Ferreira La Rosa y cols., 2000), lo que puede ser debido a que en el sector estudiado hay pocas salas de internación.

Los resultados obtenidos con los ensayos para evaluar el perfil de resistencia a los desinfectantes utilizados en el hospital se detallan en la Figura 1. La población bacteriana de las muestras estudiadas, presenta un alto porcentaje de resistencia frente a la clorhexidina y un porcentaje menor de resistencia a yodo-povidona y al glutaraldehído.

En la Tabla 2 se observan los géneros bacterianos identificados en cada muestra y el grado de resistencia que presentaron. Las bacterias sobrevivientes al tratamiento con yodo-povidona mostraron un alto nivel de resistencia frente a dicho biocida.

La CIM de la clorhexidina frente a las bacterias resistentes es dos veces mayor que la CIM para cepas sensibles.

TABLA 2. Identificación de las cepas resistentes del efluente hospitalario y su nivel de tolerancia a los desinfectantes.

Clorhexidina (a)	
Microorganismos	Nivel de Tolerancia CIM (mg/L)
Muestra 1	
<i>Pseudomonas</i>	60
<i>Salmonella</i>	50
Muestra 2	
<i>Salmonella</i>	60
<i>Shigella</i>	65

Yodo - Povidona (b)	
Microorganismos	Nivel de Tolerancia (Factor de Reducción)
Muestra 1	
<i>Staphylococcus</i>	3 log- 5min
<i>Pseudomonas</i>	3 log- 5min
Muestra 2	
<i>Staphylococcus</i>	3 log- 5min
<i>Bacillus</i>	2 log- 5min

Glutaraldehído (c)	
Microorganismos	Nivel Tolerancia (Factor de Reducción)
Muestra 1	
<i>Staphylococcus</i>	4 log-1 h
Muestra 2	
<i>Corynebacterium</i>	3 log-1h

La Tabla 2c muestra la actividad del glutaraldehído frente a las cepas resistentes. Puede observarse que 1 hora no fue suficiente para reducir 5 órdenes logarítmicos la población bacteriana, lo que no ocurre con cepas tipo de *Staphylococcus* pues alcanzan dicha reducción logarítmica en 1 minuto.

Los microorganismos identificados son de importancia del punto de vista sanitario pues pueden ser responsables de infecciones tanto ambulatorias como hospitalarias.

DISCUSIÓN

Los riesgos potenciales para la salud pública generados por la presencia de microorganismos resistentes a desinfectantes o antisépticos en un efluente hospitalario que se vierte directamente al sistema cloacal han sido poco estudiados.

En este trabajo se determinaron las características microbiológicas, y se detectaron las bacterias resistentes a los desinfectantes presentes en el efluente hospitalario.

Se observó un número de microorganismos heterótrofos y coliformes menor al detectado en muestras de otros efluentes hospitalarios (Ferreira La Rosa y cols., 2000) aunque similar al estudio efectuado en el mismo efluente por Paz y cols. (2004). En todos los trabajos citados se observa variabilidad en el recuento detectado en distintas muestras de agua residual.

Staphylococcus aureus es un importante patógeno en unidades de tratamientos intensivos. Schwartz y cols. (2003), determinaron estafilococos resistentes a antibióticos en biopelículas de efluentes hospitalarios.

Las bacterias heterotróficas resistentes pueden actuar como transportadoras de resistencias genéticamente determinadas, pasando esos genes a bacterias patógenas por transferencia horizontal (Schwartz y cols., 2003).

La baja incidencia de resistencia al glutaraldehído observada en este trabajo puede sugerir que los microorganismos no son naturalmente resistentes a ese producto sino que desarrollan resistencia bajo condiciones de presión selectiva.

De acuerdo, con los resultados de este estudio, se puede inferir que los efluentes hospitalarios pueden eliminar al sistema cloacal municipal bacterias, patógenas o no que sean resistentes a desinfectantes y antisépticos, y de esta manera producir una alteración en el balance biológico del ecosistema aumentando la proporción de bacterias resistentes en aguas tratadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Block, C., Furman, M. (2002) Association between intensity of chlorhexidine use and microorganisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J. Hosp. Inf.* 51: 201-206.
- Ferreira La Rosa A.M., Moschem Tolfo A., Olinto Monteggia L., Nascimento de Almeida M.M., da Silva Ortolan M., Genro Bins M.J., de Almeida Bendati M.M., Raya Rodriguez M.T. (2000) Gestão de efluentes de serviços de saúde em Porto Alegre. *Anais XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*. ABES Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, Brasil.
- Griffiths, P.A., Babb, J.R., Bradley, C.R., Fraise, A.P. (1997) Glutaraldehyde – resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *J. Appl. Microbiol.* 82: 519-526.
- Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J., Dalsgaard, A. (1998) Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3499-3502.
- Hingst, V., Klippel, K. M., Sontag, H. G. (1995) Epidemiology of microbial resistance to biocides. *Zentralbl. Hyg.* 197: 232-251.
- Iversen, A., Kühn, I., Franklin, A., Möllby, R. (2002) High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2838-2842.
- Ortolan, M.G.S. (1999) Avaliação do efluente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: citotoxicidade, genotoxicidade, perfil microbiológico de bactérias mesofílicas e resistência a antibióticos. Porto Alegre UFRGS. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 115p
- Kümmerer, K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources. A review. *Chemosphere* 45: 957-969.
- Kümmerer, K. y Henninger, A. (2003) Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 1203-1214.
- Lear, J.C., Maillard, J-Y., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Russell, A.D. (2002) Chloroxylenol- and triclosan- tolerant bacteria from industrial sources. *J. Ind. Microbiology & Biotechnology.* 29: 238-242.
- McBain, A.J., Richard, A.H., Gilbert, P. (2002) Possible implications of biocida accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. *J. Industrial Microbiology & Biotechnology.* 29: 326-330.
- Murray, P.K., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F., Tenover, R.H. (1999) *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª ed. ASM press, Washington DC.
- Paz, M., Muzio, H., Gemini, V., Magdaleno, A., Rossi, S., Korol, S., Moretton, J. (2004) Aguas residuales de un Centro Hospitalario de Buenos Aires, Argentina: Características químicas, biológicas y toxicológicas. *Hig. Sanid. Ambient.* 4: 83-88.
- Pyle, B.H., Shelley K.W., Mcfeters, G.A. (1994) Physiological aspects of disinfection resistance in *Pseudomonas cepacia*. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 142-148.
- Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Hass, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., Marth, E. (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37: 1685-1690.
- Russell, A.D., Hammond, S.A., Morgan, J.R. (1986) Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. *J. Hosp. Inf.* 7: 213-225.
- Russell, A.D. (2003) Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory finding to clinical and environmental situations. *The Lancet.* 3: 794-803.
- Schwartz, T., Kohlen, W., Jansen, B., Obst, U. (2003) Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microb. Ecol.* 43: 325-335.
- Suller, M.T.E. y Russel, A.D. (1999) Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant

Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant
enterococcus. *J. Hosp. Inf.* 43: 281-291.

White, D.G. y McDermott, P.F. (2001) Biocides,
drug resistance and microbial evolution. *Current
Opinion in Microbiology* 4: 313-317.