

Tolerância de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* a desinfetantes de alto nível

Tolerance of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* to high-level disinfectants

RIALA6/1476

Aline da Silva Soares SOUTO¹, Bruna Peres SABAGH¹, Alessandra Oliveira de ABREU², Sérgio Alves da SILVA³, Daniella Cristina Rodrigues PEREIRA¹, Marta de Campos NEVES¹, Rodrigo Rollin PINHEIRO¹, Rafael Silva DUARTE⁴, Neide Hiromi Tokumaru MIYAZAKI¹ (im memoriam), Maria Helena Simões VILLAS BÔAS^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Setor de Saneantes, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4.365, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, Brasil. Tel.: +55 (21) 3865-5174, 3865-5103. Fax: +55 (21) 2290-0915. E-mail: maria.villas@incqs.fiocruz.br

²Secretaria de Estado de Educação, Governo do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³Vice-Diretoria de Gestão da Qualidade, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁴Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Recebido: 31.08.2011 - Aceito para publicação: 04.05.2012

RESUMO

Mycobacterium abscessus subsp. *bolletii* (clone BRA100), entre outras micobactérias de crescimento rápido (MCR), tem sido isolada como agente etiológico de infecções localizadas e sistêmicas no Brasil. Neste estudo, foi avaliada a suscetibilidade de MCR pelo método confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes frente a produtos à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído. Todos os produtos foram utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. Foram avaliadas cinco cepas clínicas pertencentes ao clone BRA100, juntamente com as cepas de referência *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594. Os três desinfetantes à base de glutaraldeído não foram eficazes contra *M. abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Os desinfetantes à base de ácido peracético demonstraram eficácia para todas as micobactérias empregadas, embora as cepas do clone BRA100 tenham demonstrado suscetibilidade reduzida ao ácido peracético B. O produto à base de ortoftalaldeído foi eficaz apenas frente a *M. chelonae*. Visando a redução de infecções nosocomiais, sugere-se que seja suspenso o uso de produtos à base de glutaraldeído como desinfetante de alto nível para quaisquer finalidades.

Palavras-chave. micobactérias de crescimento rápido, tolerância a desinfetantes, desinfetantes de alto nível, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*.

ABSTRACT

Mycobacterium abscessus subsp. *bolletii* (BRA100 clone), among others rapidly growing mycobacteria (RGM), has been isolated from patients with localized and systemic infections in Brazil. The aim of this study was to evaluate the RGM susceptibility to glutaraldehyde-, peracetic acid- and orthophtalaldehyde-based disinfectants by means of Confirmative Test for Determining Mycobactericidal Activity of Disinfectants. Five clinical strains belonging to the clone BRA100, and the reference strains *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 were evaluated. Three glutaraldehyde-based disinfectants were ineffective to *M. abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*. The peracetic acid-based disinfectants showed effectiveness for all evaluated mycobacteria, although BRA100 isolates evidenced a reduced susceptibility to peracetic acid B. Orthophtalaldehyde-based product was effective to *M. chelonae* only. In order to reduce the nosocomial infections, it is suggested to discontinue the use of glutaraldehyde-based products, as high-level disinfectant, for any purpose whatever.

Keywords. rapidly growing mycobacteria, disinfectant tolerance, high level disinfectant, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*.

INTRODUÇÃO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, existindo atualmente 153 espécies e 11 subespécies com nomes aprovados¹.

As micobactérias ambientais (também chamadas de micobactérias atípicas, micobactérias não causadoras de tuberculose ou micobactérias outras que não tuberculosis) são consideradas oportunistas, já que se diferenciam dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (e de *M. leprae*) pelo fato de não serem patógenos obrigatórios, sendo encontradas como saprófitas, comensais e simbiontes. Nesse grupo de bactérias ambientais, estão presentes espécies de crescimento lento (observação de colônias após 7 dias ou mais de incubação) e espécies de crescimento rápido (quando são requeridos menos que 7 dias de incubação).

Runyon², em 1959, classificou as micobactérias atípicas com base no tempo de crescimento *in vitro* e na produção de pigmentos carotenóides em 4 grupos. Dentre as micobactérias de crescimento lento, no grupo I, encontram-se as fotocromogênicas, que produzem pigmento laranja ou amarelo quando expostas à luz; o grupo II é composto pelas escotocromogênicas semelhantes ao grupo anterior; porém, podem produzir os pigmentos mesmo na ausência de luz e no grupo III estão as acromogênicas que não produzem pigmentos. As micobactérias de crescimento rápido (MCR) formam o grupo IV, podendo apresentar-se pigmentadas ou não².

Entre as principais espécies de MCR relacionadas às doenças no homem, encontram-se *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Porém, essas infecções geralmente estão associadas a pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas, já que são micro-organismos que geralmente apresentam baixa virulência.

Há alguns anos as investigações e relatos de casos e surtos por MCR eram pouco frequentes no Brasil; porém, esse quadro foi sendo modificado ao longo do tempo. De 2003 a 2008, foram registrados vários surtos significativos por MCR após procedimentos invasivos em 22 diferentes estados brasileiros, com estimativa de mais de 2.000 casos suspeitos. O maior número de casos de infecções ocorreu no Rio de Janeiro, com quase 1.000 casos, seguido do Espírito Santo, onde foram notificados 363 casos. No estado do Pará, também foram notificados mais de 327 casos. Houve ocorrências também nos estados de Pernambuco, Roraima, Bahia, Mato Grosso do Sul, Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito

Federal, São Paulo, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, entre outros. Entre os casos confirmados, cerca de 74% eram representados por pacientes do sexo feminino, em que a maioria havia sido submetida a cirurgias na região abdominal, sendo o vídeo a principal via de acesso do procedimento³.

Em 2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou um alerta sobre infecções por micobactérias não causadoras de tuberculose após videocirurgia, informando dados sobre a presença, principalmente, de *M. abscessus* em estabelecimentos ligados à saúde, em várias localidades de norte a sul do país. A Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (Reniss) confirmou a ocorrência, em várias localidades dos Estados brasileiros, de infecções pós-cirúrgicas por MCR representados por *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* em pacientes submetidos a processos invasivos, devido principalmente à utilização de instrumentais ou artigos médicos que sofreram desinfecção de alto nível em solução de glutaraldeído, o que, na prática, clínica constitui uma das medidas para prevenir a disseminação de bactérias em ambientes relacionados à saúde⁴.

Em Belém, entre 2004 e 2005 foram isolados MCR de pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, os quais foram inicialmente descritos como *M. abscessus* e mais recentemente caracterizados como *M. massiliense* e *M. bolletii*, que diferem apenas em 3 nucleotídeos, em relação ao gene *hsp65*⁷. Esse foi o primeiro surto significativo por *M. massiliense* no país, em que 58 isolados pertencentes ao mesmo clone, BRA100, foram detectados em pacientes submetidos a cirurgias de videolaparoscopia, em 16 hospitais privados. Já os isolados oriundos de biópsia após mesoterapia foram identificados como *M. bolletii*, pertencentes a vários clones⁵. As infecções foram caracterizadas por hiperemia local e formação de abscessos com aspecto inflamatório e secreções purulentas, além de não responderem à terapia antimicrobiana comum⁶.

Após este primeiro surto de infecções pós-cirúrgicas por *M. massiliense*, vários outros foram descritos e associados também a um único clone⁶. No estado do Rio de Janeiro, somente em 2006 e 2007, em 63 hospitais, foram identificados 1.051 casos suspeitos de infecções relacionadas a procedimentos videolaparoscópicos. Essas infecções acometeram principalmente a pele e o tecido celular subcutâneo e foram causadas por *M. massiliense*, pertencente ao clone BRA100, o mesmo encontrado no

surto de Belém. As principais manifestações clínicas eram a formação de abscessos, nódulos e ulcerações nos sítios de incisão^{6,7}.

Apesar de *M. massiliense* ter sido reconhecida como uma nova espécie em 2004, dentro do grupo *M. chelonae* – *M. abscessus*^{8,9}, devido a estudos genéticos realizados recentemente, esse micro-organismo foi renomeado como *M. abscessus* subsp. *bolletii*¹⁰.

Foi observado que o aspecto comum em todos os surtos foi o relato de que diferentes cirurgiões utilizaram seu próprio equipamento de laparoscopia desinfetado em solução de glutaraldeído a 2% entre uma cirurgia e outra⁵. Esse procedimento pode se tornar um grande problema, já que as MCR podem sobreviver sobre equipamentos desinfetados de forma inadequada, que, posteriormente, sendo utilizados em diagnósticos clínicos ou em cirurgias, podem consequentemente causar infecções nosocomiais.

Na tentativa de conter os surtos, várias resoluções foram publicadas pela Anvisa. Entre elas a resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009, que estabeleceu critérios para comprovação de eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria *M. massiliense*¹¹.

Outra medida implantada pela Anvisa foi a adoção da RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010, que proibiu o registro de novos produtos saneantes na categoria esterilizantes para aplicação sob a forma de imersão¹².

Os recentes surtos de infecções por MCR no país junto à falta de elucidação sobre a fonte real de contaminação por esses micro-organismos demonstram a necessidade urgente de estudos que analisem o comportamento dessas MCR envolvidas nos casos de infecções, principalmente o clone BRA100, pertencente à espécie *M. abscessus* subsp. *bolletii*, já que este é o clone predominante em todo o território nacional. Além disso, esta MCR foi inserida como micro-organismo de referência na legislação pertinente à comprovação da eficácia de desinfetantes de alto nível a fim de auxiliar na prevenção e no controle dessas doenças. Portanto, esse estudo tem como objetivo analisar o perfil de suscetibilidade de cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, provenientes de surto e pertencentes ao mesmo clone, assim como de outras MCR de referência frente a desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida preconizado pela *Association of Official Analytical Chemist* e conforme POP INCQS nº 65.3210.004.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Para avaliação da atividade micobactericida dos produtos desinfetantes utilizados no estudo, segundo a RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010¹², foram utilizadas as cepas de referência *M. bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594.

Nos ensaios realizados visando à avaliação da suscetibilidade das MCR, foram utilizadas as cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35572 e *M. fortuitum* ATCC 6841. Além das cinco cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* estudadas, pertencentes ao mesmo clone, BRA100 (CRM 0001, CRM 0002, CRM 0018, CRM 0019 e CRM 0020). Todas as cepas clínicas foram provenientes de surto epidêmico ocorrido em hospitais do Rio de Janeiro, entre 2006 e 2007, e foram caracterizadas e identificadas por meio de métodos fenotípicos e genotípicos pelo Laboratório de Micobactérias, do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG/UFRJ) e pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz). As cepas de referência de MCR e as cinco cepas clínicas do clone BRA100 foram cedidas pelo Laboratório de Micobactérias do IMPPG/UFRJ.

Produtos desinfetantes

Foram utilizados sete produtos desinfetantes de alto nível distribuídos entre três diferentes princípios ativos, sempre na concentração recomendada pelo fabricante do produto. Três produtos à base de glutaraldeído, sendo dois da mesma marca com lotes diferentes, denominados Glutaraldeído A e Glutaraldeído A1, os quais foram ativados imediatamente antes do ensaio. O terceiro produto pertencente à outra marca foi denominado Glutaraldeído B e é comercializado pronto para uso. Três produtos contendo ácido peracético em suas formulações, sendo dois pertencentes à mesma marca com lotes distintos, denominados Ácido Peracético A e Ácido Peracético A1. O produto com marca diferente foi denominado Ácido Peracético B. E um produto à base de ortoftalaldeído.

Avaliação do teor dos produtos desinfetantes

A avaliação do teor dos produtos à base de glutaraldeído foi realizada de acordo com o POP INCQS nº 65.3110.026¹³, tendo como princípio a reação entre o

glutaraldeído e cloridrato de hidroxilamina, liberando ácido clorídrico, que será neutralizado pela adição de trietanolamina em excesso. O restante de trietanolamina será titulado com solução de ácido sulfúrico e o volume obtido será utilizado para calcular o teor de glutaraldeído.

As metodologias utilizadas para avaliação do teor dos produtos à base de ácido peracético e ortoftalaldeído foram realizadas segundo metodologias utilizadas pelos fabricantes.

Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida dos produtos desinfetantes

Preparo das culturas teste

A partir das culturas estoque de *M. bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (INCQS 00594), foram inoculados, separadamente, tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado. Esses tubos foram incubados de acordo com a cultura teste a ser utilizada. Após esse período, o conteúdo foi homogeneizado em agitador de tubos e a suspensão 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 porcelana¹⁴.

Procedimento do ensaio

A avaliação da atividade micobactericida dos produtos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído foi realizada por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, segundo a AOAC¹⁵ e o POP INCQS nº 65.3210.004¹⁴. Resumidamente, 15-20 mL da suspensão a 20% de transmitância da cultura do micro-organismo teste, anteriormente preparada, foram empregados para contaminar 10-12 cilindros de porcelana com 8 ± 1 mm (diâmetro externo) x 6 ± 1 mm (diâmetro interno) x 10 ± 1 mm (comprimento) (Fisher Scientific Co. nº 7-907, Ceram Tec, North America). Essa contaminação foi realizada por imersão durante 15 minutos. Após esse tempo, os cilindros foram transferidos para placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e levados a incubação em estufa a 36 ± 1 °C durante 30 minutos para secagem. No ensaio propriamente dito, a intervalos de tempos de 1 minuto, cada um dos dez cilindros foi transferido, de forma cronometrada, para cada um dos 10 tubos contendo o desinfetante a ser testado. Após 30 minutos de contato com o desinfetante,

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 (Cecal, Fiocruz) e, depois, para os tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck modificado (PB). 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 (Difco) 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 36 ± 1 °C e, no caso de ausência de crescimento ou crescimento tênue, os tubos foram reincubados por um tempo adicional de 30 dias¹⁴. Foram também realizados os controle da resistência do micro-organismo frente ao fenol por meio do método analítico adotado, controles de esterilidade (cilindros de porcelana, meios de cultura PB, K e 7H9, água purificada, lotes de pipetas e soro de cavalo) e viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9. A leitura foi realizada por meio da presença ou ausência de crescimento microbiano. No caso de crescimento, este foi confirmado por meio da presença de BAAR (bacilos álcool – ácido resistentes), corando pelo Método de Ziehl-Neelsen. A interpretação dos resultados se baseia no critério que o desinfetante deve ser capaz de matar o micro-organismo teste sobre os dez cilindros carregadores presentes no meio PB, além de não poder ocorrer crescimento microbiano nas alíquotas de 2 mL do soro de cavalo inoculadas nos meios de cultura de K e 7H9¹⁴. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido aos desinfetantes

Procedimento do ensaio

Foi realizado conforme descrito no item Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Produtos Desinfetantes, porém foram utilizadas, como micro-organismos teste, as cepas de referência de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35572 e *M. fortuitum* ATCC 6841, e as cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 0001, CRM 0002, CRM 0018, CRM 0019 e CRM 0020. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

De acordo com o número de tubos que apresentou crescimento nos ensaios de avaliação da

atividade micobactericida dos desinfetantes frente às cepas de MCR estudadas, foi estabelecido um critério de classificação em que as cepas foram consideradas fracamente tolerantes (1-10 tubos), médio tolerantes (11-20 tubos) e altamente tolerantes (21-30 tubos)¹⁶.

RESULTADOS

Análise química do teor

Dos 7 produtos desinfetantes analisados, apenas 2 (Glutaraldeído B e Ácido Peracético B) se encontravam dentro da faixa de aprovação do teor dos produtos. Todos os outros apresentavam desvio de qualidade, sendo que o Ácido Peracético A1 estava com teor 2 vezes acima do declarado. Não foi possível avaliar o teor do produto Ácido Peracético A (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sobre a análise do teor dos produtos estudados

ANÁLISE QUÍMICA DO TEOR*			
Produtos	Concentração de uso	Teor	Faixa de aprovação
Glutaraldeído A	2%	81%	± 15%
Glutaraldeído A1	2%	83%	± 15%
Glutaraldeído B	2%	89%	± 15%
Ácido Peracético A1	0,2%	250%	± 15%
Ácido Peracético B	0,1%	102%	± 10%
OPA	0,55%	22%	± 15%

* Realizada segundo POP INCQS nº 65.3110.026 e metodologias seguidas pelos fabricantes.
OPA, Ortoftalaldeído

Avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído

Produtos à base de glutaraldeído a 2%

Os produtos Glutaraldeído A e A1 não foram capazes de eliminar o micro-organismo teste *M. bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau) em nenhum ensaio realizado, mesmo quando esse micro-organismo apresentou-se sensível ao controle de resistência frente ao fenol. Não foi realizada a avaliação da atividade micobactericida do produto Glutaraldeído A frente a *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, pois já não havia quantidade suficiente do produto do mesmo lote para realização deste experimento. Na avaliação da atividade micobactericida do produto Glutaraldeído A1 utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, foi observado crescimento em todos os 30 tubos dos meios de cultura empregados.

Em contrapartida, apesar de o Glutaraldeído B ser o único desinfetante à base de glutaraldeído que apresentou resultado satisfatório em relação à análise do teor (89% do declarado), quando sua atividade micobactericida foi avaliada, o produto não foi capaz de eliminar *M. bovis* e muito menos *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produtos à base de ácido peracético

Os desinfetantes à base de ácido peracético demonstraram eficácia frente a *M. bovis* cepa INCQS 00062 (BCG Moreau) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, com exceção do Ácido Peracético A, cuja avaliação da atividade micobactericida não foi realizada com *M. abscessus* subsp. *bolletii*, pelo mesmo motivo exposto para o Glutaraldeído A. O Ácido Peracético A e o Ácido Peracético A1 pertencem à mesma marca; porém, provêm de lotes diferentes. A realização do estudo com outro produto de mesma marca ocorreu devido à falta de dados com relação ao teor do princípio ativo do primeiro produto e também porque todos os micro-organismos analisados se mostraram sensíveis frente às diluições de fenol, gerando incertezas sobre a real eficácia do produto, já que este poderia estar agindo devido à sensibilidade das cepas. Com relação ao Ácido Peracético B, foram realizados dois ensaios com *M. abscessus* subsp. *bolletii*. No primeiro ensaio, quando foi aplicado o tempo de contato determinado pelo fabricante de 30 min, foi observado crescimento desta micobactéria em cinco tubos de meio de cultura; então, um novo ensaio foi realizado, alterando o tempo de contato do micro-organismo com o produto para uma hora. Neste segundo experimento, o micro-organismo foi eliminado, não ocorrendo crescimento em nenhum tubo. Com relação à análise do teor desses produtos, somente o Ácido Peracético B foi satisfatório (102% do declarado); já o mesmo não ocorreu com o Ácido peracético A1 que apresentou um desvio da qualidade, com um resultado de 250% do declarado. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produto à base de ortoftalaldeído

O produto apresentou resultado insatisfatório na análise do teor do princípio ativo, com apenas 22% do declarado, e, mesmo assim, foi capaz de eliminar

Tabela 2. Número de tubos apresentando crescimento no ensaio de avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido frente a desinfetantes de alto nível à base de glutaraldeído

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO										
Micro-organismos	Tempo de incubação até a primeira leitura	Glutaraldeído A			Glutaraldeído A1			Glutaraldeído B		
		N. de tubos positivos			N. de tubos positivos			N. de tubos positivos		
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	3	9	1	0	4	6	0	6	10
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	8	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	1	1
CRM 0001	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0002	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0018	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0019	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0020	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* Ensaio que apresentaram crescimento em todos os tubos antes dos 60 dias foram retirados da estufa e desprezados; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9.

M. bovis INCQS 00062 (BCG Moreau). Porém, esse micro-organismo não se comportou dentro do padrão no controle de resistência frente ao fenol, o que pode tornar esse resultado inconclusivo, já que não se pode determinar se o produto é eficaz ou se o micro-organismo é que está sensível. O mesmo não ocorreu no ensaio utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, em que a micobactéria apresentou comportamento dentro do padrão frente às diluições do fenol; porém, o produto não eliminou a micobactéria, já que foi observado crescimento em alguns tubos de meio de cultura. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido aos desinfetantes

Produtos à base de glutaraldeído

Quanto à verificação da suscetibilidade das MCR frente aos produtos à base de glutaraldeído, *M. chelonae* foi eliminado pelos três desinfetantes, enquanto *M. fortuitum* por apenas dois desses (Glutaraldeído A1 e B), se classificando como médio tolerante, já que, no ensaio utilizando o Glutaraldeído A, houve crescimento do micro-organismo em 3 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 9 contendo meio de Kirchners e em um tubo com meio Middlebrook 7H9. Já *M. abscessus* se mostrou médio tolerante ao Glutaraldeído A, fracamente tolerante ao Glutaraldeído

A1 e altamente tolerante ao Glutaraldeído B, de acordo com o número de tubos positivos. As cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes ao clone BRA100 apresentaram comportamento altamente tolerante aos três desinfetantes, uma vez que ocorreu crescimento nos trinta tubos de meios de cultura empregados no experimento, em um tempo de incubação inferior (15-20 dias) ao preconizado pela técnica para a primeira leitura. Na Tabela 2, está apresentado o número de tubos de meio de cultura com crescimento positivo de acordo com cada um dos micro-organismos utilizados neste estudo frente aos produtos à base de glutaraldeído. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produtos à base de ácido peracético

Com relação aos produtos contendo ácido peracético, todas as micobactérias empregadas no estudo foram eliminadas pelos produtos Ácido Peracético A, A1 e B. Porém, é importante ressaltar o resultado insatisfatório obtido pelo Ácido Peracético A1 na avaliação do teor de princípio ativo (250% do declarado). Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produto à base de ortoftalaldeído

Na avaliação da suscetibilidade das micobactérias utilizando o produto contendo ortoftalaldeído (OPA), *M.*

fortuitum se mostrou fracamente tolerante ao produto, ocorrendo a presença de crescimento em dois tubos com Proskauer-Beck e em um contendo Middlebrook 7H9. *M. chelonae* se apresentou sensível frente ao desinfetante. Na verificação da suscetibilidade de *M. abscessus*, foi observado crescimento da micobactéria em um tubo contendo caldo Proskauer-Beck e em um tubo com Kirchners, classificando-se como fracamente tolerante ao desinfetante. Quanto às cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, a CRM 0001 foi classificada como altamente tolerante ao produto, enquanto as cepas CRM 0002 e CRM 0020 se mostraram médio tolerantes, visto que foi observado crescimento em alguns tubos contendo os meios de cultura em um período de 30 dias após a incubação do ensaio. As cepas CRM 0018 e CRM 0019 também se apresentaram altamente e médio tolerantes, respectivamente. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

DISCUSSÃO

Recentemente, vários casos e surtos causados por MCR foram registrados no Brasil, relacionados em sua maioria com procedimentos cirúrgicos e estéticos, como videocirurgias, lipoaspiração, injeções subcutâneas de compostos sem registro com finalidade na área estética, implante de próteses mamárias e mesoterapia.

Diante dos surtos ocorridos no país de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes ao mesmo clone BRA100, prevalente em todo território nacional, surtos esses relacionados principalmente às falhas nos processos de limpeza e desinfecção de produtos médicos³, houve a necessidade da realização deste estudo com objetivo principal de avaliar a suscetibilidade dessas cepas clínicas frente a três diferentes tipos de desinfetantes de alto nível.

No presente estudo, as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* clone BRA100 apresentaram comportamento altamente tolerante às soluções de glutaraldeído a 2%, quando aplicado o método analítico adotado. Tal tolerância foi observada frente aos três produtos à base de glutaraldeído, sendo detectado crescimento em todos os tubos contendo os diferentes meios de cultura em um tempo curto (20 dias ou menos) de incubação do ensaio.

Desinfetantes à base de glutaraldeído são ainda amplamente utilizados na desinfecção de alto nível

de artigos médicos; porém, vários relatos têm sido divulgados alertando sobre a tolerância de micobactérias a esse biocida¹⁸.

Mais recentemente, estudos mostraram que cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes ao clone BRA100 apresentaram resistência a altas concentrações de glutaraldeído, em um tempo que variou entre 30 minutos e 10 horas de exposição à solução comercial do produto, o que pode estar contribuindo para a disseminação do micro-organismo tolerante ao biocida em diferentes hospitais^{6,7}.

Fato semelhante ocorreu quando a cepa de referência *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 foi testada frente aos produtos Glutaraldeído A1 e B, e esses produtos não foram capazes de eliminar a micobactéria.

Lorena et al.¹⁹ indicaram que a tolerância a altas concentrações de glutaraldeído é uma característica peculiar de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencente ao clone BRA100, sugerindo que esse clone específico pode conter um mecanismo biológico de resistência não encontrado em outras cepas ou até mesmo em outras espécies.

Nos testes realizados no presente trabalho, a única cepa que se comportou de forma sensível frente aos três produtos à base de glutaraldeído a 2% foi *M. chelonae* ATCC 35572. O mesmo não ocorreu com *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. fortuitum* ATCC 6841, já que não foram eliminados totalmente, como determina o método analítico adotado.

O mecanismo de tolerância dessas micobactérias ao glutaraldeído não está elucidado; porém, um fator relacionado à resistência pode ser as mudanças na superfície da parede celular bacteriana, resultando na diminuição da ligação ou penetração do biocida na mesma. E o uso difundido de glutaraldeído em ambientes hospitalares pode resultar na seleção de bactérias resistentes a drogas e desinfetantes²⁰.

O glutaraldeído a 2% sempre foi muito utilizado para desinfecção de endoscópios e, na prática, segundo Phillips e von Reyn²¹, faz-se o reuso da solução por até 14 dias, o que pode gerar uma diminuição de até 50% da concentração e, conseqüentemente, uma menor atividade micobactericida. Além disso, sem uma limpeza adequada, os equipamentos médicos podem acumular material orgânico, possibilitando a formação de biofilmes e, assim, prejudicar a ação do biocida⁵.

Sabe-se também que o uso regular de um mesmo desinfetante pode selecionar e, conseqüentemente,

possibilitar a proliferação de micobactérias que sejam resistentes a esse agente. Além disso, problemas relacionados à formulação dos produtos foram observados no presente estudo, já que foi detectado um desvio na qualidade com relação ao teor de princípio ativo dos desinfetantes Glutaraldeído A e A1, para os quais resultados insatisfatórios foram obtidos.

Tais resultados se apresentam em concordância com vários estudos citados anteriormente, sugerindo que cepas altamente tolerantes ao glutaraldeído estão disseminadas em ambientes hospitalares e estão presentes, principalmente, nos surtos de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* após procedimentos invasivos, já que o clone BRA100 se apresenta altamente tolerante a esse desinfetante^{6,18}.

Cepas tolerantes a glutaraldeído representam situação de emergência em saúde pública, já que essas cepas estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência cruzada a vários antibióticos, inclusive aos que são usados no tratamento de infecções por MCR²⁰. Apesar disso, essa técnica de desinfecção com glutaraldeído ainda é empregada, já que a RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009, não suspendeu o uso desse produto para o instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos²².

Outros dois desinfetantes hospitalares indicados para desinfecção de artigos semicríticos são o ácido peracético e o OPA^{23,24}. Um estudo recente sugere como alternativa imediata para a prevenção de novos surtos a substituição do glutaraldeído por um desses dois produtos no processo de desinfecção de alto nível, já que foi observada suscetibilidade das cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* do clone BRA100 aos desinfetantes à base de glutaraldeído, quando um teste em suspensão foi aplicado com tempos de 15 e 30 minutos de contato do micro-organismo com o desinfetante¹⁸. Walsh, Maillard e Russell²⁵ já haviam também sugerido essa substituição, uma vez que o OPA conseguiria inativar cepas resistentes ao glutaraldeído.

Outro estudo também comparou a atividade micobactericida do OPA e do glutaraldeído e concluiu que o primeiro produto se mostrou mais eficiente contra micobactérias, quando comparado ao glutaraldeído, em um teste quantitativo em suspensão na concentração de 0,5% (p/v)³². O OPA apresenta molécula de caráter lipofílico, o que sugere facilitar a penetração do biocida na parede celular, diminuindo a probabilidade de uma redução na concentração efetiva do produto e, conseqüentemente, sua ação²⁶.

Micro-organismos teste em outros trabalhos têm se mostrado suscetíveis ao OPA a 0,5%, quando é utilizado o teste em suspensão, em que o produto entra em contato direto com a bactéria. Quando o teste com carreador é aplicado, o mesmo não ocorre²⁵. No teste com carreador, as bactérias permanecem mais aderidas a uma superfície, se tornando menos acessíveis aos biocidas quando comparadas a uma suspensão homogênea, composta pelo produto analisado e o micro-organismo, como ocorre no teste em suspensão²⁶.

Esse fator poderia explicar os diferentes resultados obtidos no presente estudo. Já que todas as cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* testadas foram tolerantes ao OPA. Cabe ressaltar que pertencem ao mesmo clone analisado por Lorena et al.¹⁹, clone BRA100. Por outro lado, o lote do produto utilizado apresentou um desvio significativo na qualidade, em que o teor do princípio ativo real era de apenas 22% do declarado pelo fabricante. O que pode representar uma forma de ameaça à saúde coletiva, já que lotes de desinfetantes que se apresentam fora dos padrões de qualidade exigidos podem estar sendo utilizados em ambientes ligados à saúde.

Desenvolver novas estratégias para desinfecção de alto nível é importante para evitar o surgimento de novas cepas resistentes. Uma possível alternativa que alguns estudos têm sugerido é a utilização de desinfetantes que contenham ácido peracético em suas formulações. Para Phillips e Von Reyn²¹, o ácido peracético é um agente que tem se apresentado eficiente na desinfecção de equipamentos médicos, como os endoscópios.

Estudos mostram que o tratamento diário de instrumentos com solução de glutaraldeído a 2% induz ao acúmulo e/ou a fixação de proteínas presentes no artigo a sofrer desinfecção. Situação similar foi observada com o uso de desinfetantes à base de ortoftalaldeído, porém em um menor grau. Já para os produtos que contêm ácido peracético, a fixação ou acúmulo de proteínas pode ocorrer; porém, são incomparáveis aos outros dois desinfetantes, sendo muito inferior. Devido a esses dados, na França, é recomendada a substituição de desinfetantes à base de glutaraldeído por aqueles que contêm ácido peracético e foi sugerido que se destaque a importância da completa limpeza prévia dos artigos²⁷.

No presente estudo, de acordo com os resultados apresentados, tanto as cepas de MCR de referência como as cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* se mostraram sensíveis frente aos desinfetantes que contêm ácido peracético em suas formulações. Porém,

no primeiro ensaio da avaliação da qualidade do produto denominado Ácido Peracético B, utilizando a cepa de referência *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, foi observado crescimento do micro-organismo em 3 tubos contendo caldo Proskauer-Beck e em um tubo de cada meio adicional (Kirchners e Middlebrook 7H9). Na repetição deste ensaio, houve variação no tempo de contato para uma hora e, então, não foi observado crescimento. Vale ressaltar que, dentre os três produtos testados, somente este último (Ácido peracético B) apresentou resultado satisfatório durante a avaliação do teor. Na análise do Ácido peracético A1, o teor foi de 250% do declarado pelo fabricante, gerando dúvidas quanto a sua real eficácia frente às micobactérias.

Stanley²⁸ testou cinco cepas de micobactérias resistentes a glutaraldeído isoladas de endoscópios, e dentre essas, duas cepas demonstraram um comportamento tolerante frente ao ácido peracético.

Os resultados aqui apresentados correspondem ao primeiro estudo utilizando o teste oficial de avaliação da eficácia de desinfetantes no Brasil e mostram propriedades biológicas muito diferentes de *M. abscessus* subsp. *bolletii* frente ao glutaraldeído, principalmente, quando comparado ao *M. bovis*, a cepa de referência usada na metodologia oficial da AOAC.

A inclusão de *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 na legislação referente à comprovação da eficácia de desinfetantes de alto nível para artigos semicríticos, seguindo o POP INCQS n° 65.3210.004, por meio da Resolução RDC n° 51, de 21 de outubro de 2009¹¹, foi uma das alternativas encontradas na tentativa de prevenir infecções por micobactérias de crescimento rápido.

Uma pesquisa mais abrangente seria necessária, já que o número de cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* utilizadas não foi extenso. Porém, algumas sugestões podem ser avaliadas para a adaptação da técnica, como a variação no tempo de incubação do ensaio, que atualmente é de 60 dias inicialmente e mais 30 dias em casos de não ser observado crescimento ou este se apresentar tênue. Esse tempo poderia ser reduzido para 30 dias de incubação em ensaios realizados com *M. abscessus* subsp. *bolletii*, já que a cepa de referência e todas as cepas clínicas dessa micobactéria testadas neste trabalho apresentaram crescimento dentro de um mês ou menos, dependendo do produto analisado. Essa redução seria favorável na obtenção de respostas mais rápidas em nível de vigilância sanitária; assim, medidas poderiam ser tomadas visando à promoção da saúde da população.

CONCLUSÃO

Visando a redução de infecções nosocomiais e, conseqüentemente, a promoção da saúde da população, sugere-se que o uso de produtos à base de glutaraldeído seja suspenso para quaisquer fins no que diz respeito à desinfecção de alto nível, já que todas as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* provenientes de surto e pertencentes ao clone prevalente no país foram tolerantes a esse desinfetante. E que uma possibilidade para substituição seria os produtos à base de ácido peracético.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), pelo Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IM/UFRJ) e pela Organização Pan-Americana da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (OPAS/ANVISA). Agradecemos o Laboratório de Saneantes e Cosméticos do INCQS pelas análises dos produtos saneantes

REFERÊNCIAS

1. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature. Société de bactériologie systématique et vétérinaire. [acesso 2011 mar 31]. Disponível em: [http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html].
2. Fontana, RT. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. *Rev Bras Enferm*. 2008;61(3):371-6.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 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. [acesso 2011 ago 25]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/relatorio_descrito_mcr_16_02_11.pdf]
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após videocirurgia. Informe técnico. 2007. [acesso 2009 abr 5]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm].
5. Viana-Niero C, Lima CVBL, Lopes ML, Rabello MCS, Marsola LR, Brilhante VCR, 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*. 2008;46:850-5.
6. Duarte RS, Lourenço MCS, Fonseca LS, Leão SC, Amorim ELT, Rocha ELL, et al. An epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2149-55.
7. Lorena NSO, Duarte RS, Pitombo MB. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos – a

- hipótese do glutaraldeído. *Rev Col Bras Cirurg*. 2009;36(3):266-7.
8. Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, Scola B, Raoult D, et al. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5493-501.
 9. Leão SC, Tortoli E, Viana-Niero C, Ueki SY, Lima KV, Lopes ML, et al. Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggests that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* Group Is Needed. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2691-8.
 10. Leão SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ. Proposal that the two species *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov., and emendation of *Mycobacterium abscessus*. [acesso 2011 ago 25]. Disponível em: [<http://ijs.sgmjournals.org/content/early/2010/11/19/ijs.0.023770-0.long>] (*Int J Syst Evol Microbiol*. - online version).
 11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009. Dispõe sobre a comprovação de 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, 21 out. 2009. [acesso 2010 set 29]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res_005121102009.html].
 12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre a proibição de registro de novos produtos saneantes na categoria “esterilizantes” para aplicação sob a forma de imersão, a adequação dos produtos esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos já registrados na ANVISA e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 ago 2010. p. 41-42.
 13. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Rio de Janeiro – Brasil). Determinação do teor de glutaraldeído (POP 65.3110.026 Rev. 3). Rio de Janeiro: INCQS (Manual da Qualidade, Seção 4.3); 2009.
 14. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Rio de Janeiro – Brasil). Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes (POP 65.3210.004 Rev. 8). Rio de Janeiro: INCQS (Manual da Qualidade, Seção 4.3); 2009.
 15. Tomasino S. Disinfectants. *In*: Horwitz W, Latimer G. Official Methods of Analysis of AOAC International. Texas: AOAC International; 2006. p. 28-29.
 16. Langsrud S, Sundheim G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J Appl Microbiol*. 1997;82(6):705-12.
 17. Nomura K, Ogawa M, Miyamoto H, Muratani T, Taniguchi H. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from bronchoscope washing machines. *Am J Infect Control*. 2004;32(4):185-8.
 18. Van Klingeren B, Pullen W. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. *J Hosp Infect*. 1993;25(2):147-9.
 19. Lorena NSO, Pitombo MB, Côrtes PB, Maya MCA, Silva MG, Carvalho ACS, et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. *Acta Cirurg Bras*. 2010;25(5):455-9.
 20. Svetlíková Z, Skovierová H, Niederweis M, Gaillard JL, McDonnell G, Jackson M. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):4015-8.
 21. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1363-74.
 22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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. 2009.
 23. Block SS. Peroxygen compounds. *In*: Disinfection, Sterilization and Preservation. Filadélfia: Lippincott Williams & Williams; 2001. p. 185. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0008_27_02_2009.html].
 24. McDonnell GE, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):147-79.
 25. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD. Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):1039-46.
 26. Fraud S, Maillard JY, Russell AD. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. *J Hosp Infect*. 2001;48(3):214-21.
 27. Pineau L, Desburguois C, Marchetti B, Luu Duc D. Comparison of the fixative properties of five disinfectant solutions. *J Hosp Infect*. 2008;68(2):171-7.
 28. Stanley PM. Efficacy of peroxygen compounds against glutaraldehyde-resistant mycobacteria. *Am J Infect Control*. 1999;27(4):339-43.