Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Eficacia de dos desinfectantes de uso hospitalario frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* formadas sobre acero inoxidable

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Liz Madelyn ZAGASTIZABAL MENDOZA

ASESOR

María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sagastizabal L. Eficacia de dos desinfectantes de uso hospitalario frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* formadas sobre acero inoxidable [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

EFICACIA DE DOS DESINFECTANTES DE USO HOSPITALARIO FRENTE A BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* FORMADAS SOBRE ACERO INOXIDABLE

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

LIZ MADELYN ZAGASTIZABAL MENDOZA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Sobresaliente (18 DIECIOCHO)

en conformidad con el Art. 34.° del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 26 de noviembre de 2018

Dra. Mirtha Roque Alcarraz
Presidente

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Miembro

Mg. Celia Bertha Vargas de la Cruz
Miembro

Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo
Miembro

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe

ISO 9001 BUREAU VERITAS Certification
N° BR233265

DEDICATORIA

A Dios, por amarme, guiarme y mantenerme firme en mis objetivos. A mis padres Eudomilia y German, por todo el amor y confianza que me han brindado a lo largo de toda mi vida, sé que siempre contare con ustedes. A mis hermanos, por apoyarme, preocuparse por mi formación profesional y darme los mejores sobrinos.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. María Elena Salazar, por ser una excelente maestra que me brindó su confianza, apoyo y tiempo para poder realizar y culminar esta investigación. Gracias por transmitirme sus conocimientos y la vocación a la investigación.

Al financiamiento del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) por otorgar la subvención financiera de investigación para el desarrollo de la tesis con código N° A18040244.

A los profesores de la Cátedra de Microbiología y Parasitología básica y aplicada, por la disposición del uso de las instalaciones los laboratorios, consejos y el apoyo para la realización de la tesis.

A Eduardo Evangelista por el apoyo incondicional, paciencia y comprensión. Gracias por ser mi compañero de vida.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS……VII

LISTA DE TABLAS……VIII

ABREVIATURAS……IX

RESUMEN……X

SUMMARY……XI

I. INTRODUCCIÓN……1

1.1. Objetivo general……3

1.2. Objetivos específicos……3

1.3. Hipótesis……3

II. GENERALIDADES……4

2.1. Biopelículas……4

2.1.1. Definición……4

2.1.2. Estructura……4

2.1.3. Etapas de desarrollo……5

2.1.4. Detección y cuantificación de biopelículas……9

2.2. *Staphylococcus aureus*……11

2.2.1. Características……11

2.2.2. Factores de virulencia……12

2.2.2.1. Formación de biopelícula……14

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*……15

2.3.1. Características……15

2.3.2. Factores de virulencia……16

2.3.2.1. Formación de biopelícula……17

2.4. Acero inoxidable……18

2.5. Desinfectante……19

2.5.1. Cloro y compuestos clorados……21

2.5.2. Biguanidas poliméricas……21
2.5.3. Compuesto de amonio cuaternario……...23
III. PARTE EXPERIMENTAL……...24
3.1. Materiales y equipos……24
3.2. Flujograma del trabajo experimental……27
3.3. Metodología……...28
3.3.1. Tipo de estudio……28
3.3.2. Lugar de Ejecución……...28
3.3.3. Caracterización fenotípica de los microorganismos de ensayo……28
3.3.3.1. Pruebas bioquímicas para *Staphylococcus aureus*……...28
3.3.3.2. Pruebas bioquímicas para *Pseudomonas aeruginosa*……..30
3.3.3.3. Capacidad de formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus*……....32
3.3.3.4. Capacidad de formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* ……..…..32
3.3.4. Optimización de un método para la formación de biopelículas sobre discos de acero inoxidable……33
3.3.5. Evaluación de la reducción bacteriana……36
3.4. Análisis estadístico……....39
IV. RESULTADOS……..40
V. DISCUSIÓN……...55
VI. CONCLUSIONES……60
VII. RECOMENDACIONES……..…61
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……..62
IX. ANEXOS……74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cinco etapas del desarrollo de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*: a. Adhesión reversible, b. Adhesión irreversible, c. Formación de microcolonia, d. Maduración y arquitectura, e. Desprendimiento de Biopelícula……..9

Figura 2. Esquema de trabajo: A. Formación de biopelícula, B. Tratamiento con el desinfectante Dezavid® y lejía, C. Enumeración bacteriana……37

Figura 3. Esquema de trabajo: A. Formación de biopelícula, B. Tratamiento con el desinfectante Supersafe-D®, C. Enumeración bacteriana……38

Figura 4. Resultado del método de Rojo de Congo para *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923……41

Figura 5. Resultado del método de Rojo de Congo positivo para *Staphylococcus aureus* cepa clínica……41

Figura 6. Resultados del Método de Christensen, *et al*……..……42

Figura 7. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* del control……45

Figura 8. Comparación de UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Lejía tradicional……..46

Figura 9. Comparación de UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Dezavid® 0,05 % y 0,10 %.....48

Figura 10. Comparación de UFC/disco del control y UFC/disco después del tratamiento con Lejía tradicional, Supersafe-D® y Dezavid® 0,05 %, 0,10 % y 1,00 % para *Staphylococcus aureus*……49

Figura 11. Comparación de UFC/disco del control y UFC/disco después del tratamiento con Lejía tradicional, Supersafe-D® y Dezavid® 0,05 %, 0,10 % y 1,00 % para *Pseudomonas aeruginosa*……...50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Staphylococcus aureus*……40

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*……41

Tabla 3. Recuento de colonias del control para *Staphylococcus aureus*……43

Tabla 4. Recuento de colonias del control para *Pseudomonas aeruginosa*…..44

Tabla 5. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* del control……44

Tabla 6. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Lejía tradicional……...46

Tabla 7. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Dezavid® 0,05 % y 0,10 %.....48

Tabla 8. Porcentaje y Reducción logarítmica de los desinfectantes para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* ……51

Tabla 9. Análisis de ANOVA de los desinfectantes y el grupo control……52

Tabla 10. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Staphylococcus aureus* ATCC……...53

Tabla 11. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Staphylococcus aureus* cepa clínica……53

Tabla 12. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC……54

Tabla 13. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica……..54

ABREVIATURAS

IIH: Infecciones intrahospitalarias

EPS: sustancias poliméricas extracelulares (Extracellular polymeric substances)

TEM: microscopia electrónica de transmisión (Transmission electron microscopy)

SEM: microscopia electrónica de barrido (Scanning electron microscopy)

CLSM: microscopia de escaneo láser confocal (Confocal laser scanning microscopy)

AFM: microscopia de fuerza atómica (atomic force microscopy)

UFC: Unidad formadora de colonias

PVL: leucocidina de Panton-Valentine (Panton – Valentine leukocidin)

SSSS: síndrome estafilocóccico de la piel escaldada (Staphylococcal scalded skin síndrome)

Bap: proteínas asociadas a biopelícula (Biofilms - associated protein)

T4P: pili tipo IV (Type IV pili)

OMS: Organización Mundial de la salud

PHMB: Polihexametileno biguanida

QAC: Compuesto de amonio cuaternario (Quaternary ammonium compound)

TSA: Agar Tripticasa de Soya (Trypticase soy agar)

TSB: Caldo Tripticasa de Soya (Tryptic soy broth)

BHI: Infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion)

APB: Agua peptonada bufferada

APC: Agar Plate Count

RESUMEN

La eficacia y el uso de desinfectantes para eliminar patógenos en el entorno hospitalario se basan en pruebas contra las bacterias planctónicas; pero en el medio ambiente, las bacterias se encuentran mayormente en forma de biopelículas sobre los dispositivos médicos, mesas quirúrgicas, pisos e instrumentos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia de dos desinfectantes de uso hospitalario (Dezavid® y Supersafe-D®) frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* formadas sobre acero inoxidable. Adicionalmente se evaluó la eficacia del hipoclorito de sodio (lejía tradicional) de uso doméstico. Se formó durante 6 días una biopelícula sobre discos de acero inoxidable de 1 cm de diámetro y 1 mm de espesor, posteriormente se les trato con concentraciones de 0,05 %, 0,10 % y 1,00 % de Dezavid®; Supersafe-D® y lejía tradicional, dejando actuar el desinfectante durante el tiempo recomendado por el fabricante. Posteriormente se cuantificó las UFC/disco en comparación con un grupo de discos que no fueron sometidos a ningún desinfectante. Los desinfectantes con mayor eficacia fueron Dezavid® 1,00 %; 0,10 % y Supersafe-D® para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica los desinfectantes con mayor eficacia fueron Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D®. La lejía (1:20) tuvo igual eficacia que Dezavid® 1,00 %; 0,10 % y Supersafe-D® para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica, la lejía (1:20) tuvo igual eficacia que Dezavid® 0,10 %.

Palabras clave: biopelículas, desinfectantes, acero inoxidable, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

The efficacy and use of disinfectants to eliminate pathogens in the hospital environment are based on tests against planktonic bacteria; but in the environment, bacteria are mostly in the form of biofilms on medical devices, surgical tables, floors and instruments. The objective of this work was to evaluate the efficacy of hospital disinfectants (Dezavid® and Supersafe-D®) against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* formed on stainless steel. In addition, the efficacy of sodium hypochlorite (traditional bleach) for domestic use was evaluated. A biofilm was formed for 6 days on 1 cm diameter and 1 mm thick stainless steel discs, subsequently treated with concentrations of 0,05 %, 0,10 % and 1,00 % Dezavid®; Supersafe-D® and traditional bleach, allowing the disinfectant to act for the time recommended by the manufacturer. Subsequently, the CFU/disc was quantified in comparison with a group of discs that were not subjected to any disinfectant. The most effective disinfectants were Dezavid® 1,00 %; 0,10 % and Supersafe-D® for *Staphylococcus aureus* ATCC and clinical strain. In the case of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC and clinical strain, the most effective disinfectants were Dezavid® 1,00 % and Supersafe-D®. The bleach (1:20) was as effective as Dezavid® 1,00 %; 0,10 % and Supersafe-D® for *Staphylococcus aureus* ATCC and clinical strain. In the case of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC and clinical strain, the bleach (1:20) had the same efficacy as Dezavid® 0,10 %.

Key words: biofilms, disinfectants, stainless steel, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) constituyen hoy en día un importante problema de salud pública no sólo para los pacientes, sino también para la familia, la comunidad y el Estado, constituyendo así un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de la atención; por ser un evento adverso que se puede prevenir en pacientes hospitalizados[1]. En un estudio de prevalencia de IIH en un hospital peruano de nivel IV se encontró que tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *Staphylococcus aureus* constituyen los agentes infecciosos más comunes en las infecciones hospitalarias[2]. Estudios realizados señalan que las IIH son causadas en gran medida por las biopelículas formadas en superficies de los hospitales[3-4], debido a que las bacterias pueden crear condiciones para formar biopelículas casi en cualquier ambiente formando una interfase sólido-líquida entre una superficie y un medio, proporcionando un entorno ideal para la fijación y crecimiento de microorganismos[5].

Tales biopelículas constituyen reservorios potenciales para patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, que sirven como una fuente continua de infecciones y contaminaciones cruzadas[3-4].

Los desinfectantes se usan ampliamente en hospitales y otros entornos sanitarios para controlar el crecimiento de microbios en diferentes aplicaciones, como esterilización de dispositivos médicos y desinfección de superficies y aguas. Son partes esenciales de las prácticas de control de infecciones y ayudan en la prevención de infecciones adquiridas en la asistencia sanitaria. El nivel de desinfección o esterilización depende del

uso previsto del objeto: elementos críticos que entran en contacto con tejidos estériles (catéteres, prótesis y sondas cardiacas), elementos semicríticos que entran en contacto con las membranas mucosas (endoscopio) e instrumentos no críticos que sólo entran en contacto con la piel intacta (incubadoras, mesas de acero inoxidable, etc.)[6].

Aunque las superficies en los hospitales son tratados con desinfectantes, algunos microorganismos pueden sobrevivir y dar lugar a problemas sustanciales en términos de salud pública. De hecho, numerosos informes han puesto de relieve la supervivencia de los microorganismos después de la limpieza y desinfección[7], ya que las bacterias que se encuentran como biopelícula suelen mostrar resistencia a tal tratamiento[8]. Esto puede deberse a diferentes motivos como la organización estructural de las biopelículas que impiden la penetración del desinfectante, que las bacterias generan mutantes con una menor susceptibilidad a los desinfectantes o por factores que afectan la actividad del desinfectante como la concentración, el período de contacto, el pH, la temperatura y la presencia de materia orgánica[9].

En el Perú ya se vienen realizando estudios sobre la formación y resistencia de las biopelículas formadas en la placa dental y en la industria alimentaria[10, 11, 12, 13]; pero, existen pocos estudios sobre la formación y resistencia de biopelículas en materiales como acero inoxidable, vidrio, polietileno o teflón que encontramos en un ambiente hospitalario y la eficacia de los desinfectantes de uso hospitalario contra estas biopelículas. Por ello con la finalidad de contribuir a demostrar la eficacia de los desinfectantes utilizados comúnmente en los hospitales de

Lima - Perú contra bacterias nosocomiales que tienen la capacidad de formar biopelícula, se plantearon los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia de dos desinfectantes de uso hospitalario frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* formadas sobre acero inoxidable.

1.2. Objetivos específicos

- Optimizar un método para la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* sobre discos de acero inoxidable.
- Evaluar la reducción bacteriana después del tratamiento con los desinfectantes frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Staphylococcus aureus* formada sobre discos de acero inoxidable.
- Comparar la eficacia de los desinfectantes de uso hospitalario frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Staphylococcus aureus* formada sobre discos de acero inoxidable.
- Comparar la eficacia de los desinfectantes de uso hospitalario contra la lejía tradicional de uso común frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Staphylococcus aureus* formada sobre discos de acero inoxidable.

1.3. Hipótesis

Los desinfectantes de uso hospitalario, Dezavid® y Supersafe-D® son eficaces frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* formadas sobre acero inoxidable.

II. GENERALIDADES

2.1. Biopelículas

2.1.1. Definición

Las biopelículas son organizaciones microbianas que pueden comprender una sola especie microbiana o múltiples especies microbianas y pueden formarse en una variedad de superficies bióticas y abióticas[14]. La biopelícula está encerrada en una sustancia mucosa: una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)[15]. Éstas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular. Esta comunidad a menudo se caracteriza por una arquitectura interna compleja que contiene canales que permiten la circulación de nutrientes; las áreas separadas en la biopelícula pueden contener células genéticamente idénticas que muestran diferentes patrones de expresión génica, esto se traduce en una mayor tolerancia a las condiciones adversas, convirtiéndolas en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen[15-16].

2.1.2. Estructura

Gran parte de la matriz de biopelícula, quizás hasta el 97%, es en realidad agua, aunque, como ocurre con todos los aspectos de las biopelículas, esto dependerá del sistema

específico que se examine. El agua se puede unir dentro de las cápsulas de células microbianas o puede existir como un solvente cuyas propiedades físicas tales como la viscosidad están determinadas por los solutos disueltos en ella. Además de agua y células microbianas, la matriz de biopelícula es un complejo de polímeros secretados, nutrientes y metabolitos absorbidos, productos de la lisis celular, macromoléculas como proteínas, polisacáridos, ADN, ARN y otros componentes celulares como peptidoglucano, lípidos, fosfolípidos y otros; siendo muy variable la cantidad de material celular dentro de una biopelícula[17].

Varios estudios indican que las EPS no son necesariamente un requerimiento para la unión inicial de las células microbianas a las superficies, pero su producción es esencial para el desarrollo de la arquitectura de cualquier matriz de biopelícula. Las moléculas de las EPS proporcionan el marco en el que se insertan las células microbianas y como su síntesis continúa después de la unión de las células podría incluso proporcionar una fuente de nutrientes para algunas de las células, estas macromoléculas son componentes dinámicos de la biopelícula[18].

2.1.3. Etapas de Desarrollo

La formación de biopelícula es compleja, pero según diferentes investigadores ocurre en las siguientes etapas (Figura 1)[18]:

- **Adherencia a la superficie**

  - Adhesión reversible: las células microbianas se adhieren a la superficie a través de sus apéndices como pili, fimbrias y flagelos; también pueden unirse a través de otras fuerzas físicas como las fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, etc[19-20]. La interfaz sólido-liquido también puede ser una razón para la adherencia y crecimiento de microorganismos en la formación de biopelículas[21]. La hidrofobicidad de la superficie también puede jugar un papel en el fortalecimiento de la unión de microbios, ya que reduce la fuerza de repulsión entre las bacterias y la superficie[22-23]. Los microorganismos se adhieren más a las superficies hidrófobas y no polares como el teflón y otros plásticos, que a superficies hidrofílicas y polares como metales y vidrio[24-26].
  - Adhesión irreversible: esta etapa es inducida por interacciones más fuertes de la superficie-célula como los ligandos (adhesinas) que están expuestos en la superficie de las células permitiendo la formación de un vínculo de "llave-cerradura" entre la célula y la superficie. Además, está acompañado por la secreción de EPS que rodea las células de las biopelículas[21].

- **Formación de microcolonia**

  Después de que se produce la unión de microorganismos a una superficie biótica o abiótica y esta unión se

estabiliza, se inicia un proceso de multiplicación y división de células microbianas, iniciado a través de una señalización química particular dentro de las EPS. Este proceso conduce a la formación de micro colonias[21, 27]. Las colonias bacterianas en una biopelícula normalmente consisten en muchos tipos de microcomunidades las cuales coordinan entre sí en múltiples aspectos. Esta coordinación juega un papel crucial en el intercambio de sustrato, la distribución de productos metabólicos importantes y la excreción de productos finales metabólicos. La biopelícula proporciona un entorno completo para el desarrollo de la asociación sintrófica, una asociación de dos o más bacterias metabólicamente diferentes que dependen unas de otras para la utilización de ciertos sustratos con fines energéticos[28].

- **Maduración y arquitectura**

  En esta etapa de formación de biopelícula, las células microbianas se comunican entre sí a través de señales autoinducidas[29-30]. La comunicación célula a célula es un proceso importante, durante el cual se alcanza la densidad requerida de células microbianas, conduciendo a la secreción de moléculas de señalización; conocidas como autoinductores. Estos inductores automáticos facilitan el quórum sensing (autoinducción) [31]. En esta etapa de maduración se expresan ciertos productos

genéticos, que se consideran importantes para la formación de las EPS. Como las EPS son el material principal en la estructura tridimensional de la biopelícula, se producen espacios intersticiales en la matriz. Estos canales están llenos de agua y actúan como un sistema circulatorio, utilizado para distribuir nutrientes importantes y eliminar los productos de desecho de las comunidades de microcolonias en la biopelícula[32].

- **Desprendimiento de Biopelícula**

  En esta fase, las células microbianas dentro de la biopelícula realizan multiplicación y dispersiones rápidas para pasar de la forma sésil a la móvil[22]. Durante el proceso de desprendimiento las comunidades microbianas dentro de la biopelícula producen diferentes enzimas sacarolíticas que ayudan a liberar a los microbios de la superficie a una nueva área para la colonización. Por ejemplo, *Escherichia coli* produce N-acetil-heparosan liasa, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* producen alginato liasa, y *Streptococcus equi* produce hialuronidasa para la lisis de la matriz de EPS y su posterior desprendimiento[33].

  En esta fase, las células microbianas regulan positivamente la expresión de proteínas relacionadas con la formación de flagelos, para permitir que las bacterias se muevan a un nuevo sitio. El desprendimiento de células

microbianas y la transferencia a un nuevo sitio ayudan en la propagación de infecciones[34].

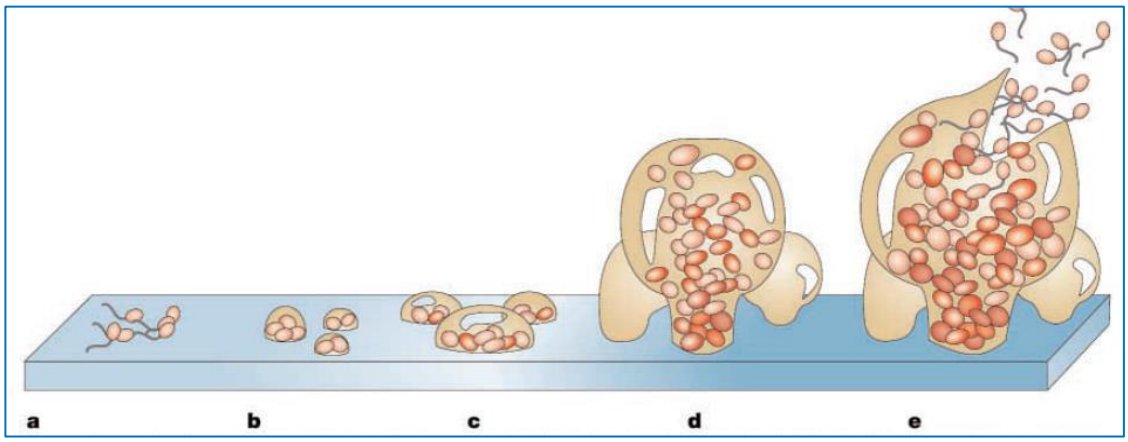


Figura 1. Cinco etapas del desarrollo de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*: a. Adhesión reversible, b. Adhesión irreversible, c. Formación de microcolonia, d. Maduración y arquitectura, e. Desprendimiento de Biopelícula[35].

2.1.4. Detección y cuantificación de biopelículas

La comprensión de las biopelículas se ha desarrollado a medida que los métodos para su detección y cuantificación han evolucionado. Existen diferentes métodos, uno de ellos, el más utilizado es la microscopía óptica, ya que es simple, rápida y eficiente. Este método se aplica para observar y enumerar bacterias en superficies translúcidas y normalmente se puede lograr tiñendo las bacterias, como la tinción de Gram y cristal violeta. Sin embargo, este método no proporciona ninguna información sobre la viabilidad de las células[36]. Por otro lado, la microscopía epifluorescente es el método más rápido que se puede usar en superficies opacas (metal, cerámica, etc.), con la desventaja de ser más costosa. Este método es capaz de distinguir las células vivas de las muertas, lo que permite la determinación de la

viabilidad celular[37]. La microscopia electrónica de transmisión (TEM) permite el estudio de las estructuras internas y externas implicadas en la adhesión celular, mientras que la microscopia electrónica de barrido (SEM) permite la observación de la fijación microbiana a las superficies, así como la morfología de las bacterias y el material de superficie. Como desventajas se tiene que en la TEM las muestras no pueden reutilizarse y la evaluación de la viabilidad de las células no es posible; en la SEM, el poder de resolución es inferior a la TEM y es un método menos sensible[36, 38]. Para superar algunas de las limitaciones de la microscopía de luz, se puede usar la microscopia de escaneo láser confocal (CLSM) que incluye imágenes confocales e iluminación láser, así como una técnica avanzada de procesamiento de imágenes que proporciona imágenes de alta resolución. Con esta tecnología, es posible observar las células *in situ*, así como su estructura y distribución[38].

El microscopio de fuerza atómica (AFM) permite el estudio de las superficies a un nivel submicrométrico y evalúa las fuerzas entre las moléculas biológicas y las superficies a nivel molecular[36].

Por otro lado como uso más común están los métodos que se basan en la eliminación de las biopelículas que están asociadas al sustrato (vidrio, plástico, teflón, acero inoxidable, entre otros) mediante algún tipo de fuerza mecánica, como

agitación por vórtex o sonicación, antes del examen y la medición. El procedimiento más comúnmente utilizado para la medición de las biopelículas es el procedimiento de recuento de placas viable, en el que las células de la biopelícula resuspendidas y dispersas se colocan en placas en un medio microbiológico sólido, se incuban y se cuentan. El conteo de UFC (unidad formadora de colonias) es un método estándar simple y rápido aplicado para evaluar la viabilidad y la capacidad de cultivo de las células[3].

Los métodos espectrofotométricos se basan en la tinción de las células adheridas y la consiguiente medida espectrofotométrica del colorante que tiñó los microorganismos[37]. Se basan en una relación entre el número de células y la absorbancia obtenida a partir de la medida espectrofotométrica. Hay varios tintes que se pueden aplicar, como cristal violeta, safranina, rojo de congo[36], sales de tetrazolio[39] y azul alamar. A pesar del alto rendimiento, este método no es preciso, ya que mide la formación de biopelículas en el fondo de los pozos[40].

2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.1. Características

Staphylococcus aureus son cocos gram-positivos de aproximadamente 1 µm de diámetro. Sus células forman racimos parecidos a la uva, ya que la división celular tiene lugar en más de un plano. A menudo se encuentra como un

comensal asociado con la piel, las glándulas de la piel, y membranas mucosas, particularmente en la nariz de individuos sanos. En un medio rico, *S. aureus* forma colonias "doradas" de tamaño medio; en placas de agar con sangre de oveja, la pigmentación dorada de las colonias de *S. aureus* es causada por la presencia de carotenoides y se ha informado que es un factor de virulencia que protege al patógeno de los oxidantes producidos por el sistema inmune[41].

Los estafilococos son anaerobios facultativos capaces de generar energía mediante la respiración aeróbica y mediante la fermentación que produce principalmente ácido láctico; es catalasa positiva, una característica que los diferencia de *Streptococcus sp*., y son oxidasa negativos y requieren nutrientes complejos, por ejemplo, muchos aminoácidos y vitaminas B, para el crecimiento. *S. aureus* es muy tolerante a altas concentraciones de cloruro de sodio, hasta 1.7 molar. Otra característica del género *Staphylococcus* es la estructura de peptidoglicano de la pared celular que contiene múltiples residuos de glicina en el puente cruzado, que causa susceptibilidad a la lisostafina. *S*. *aureus* produce coagulasa que interactúa con la protrombina en la sangre y hace que el plasma se coagule convirtiendo el fibrinógeno en fibrina[42].

2.2.2. Factores de virulencia

Las infecciones causadas por este microorganismo tienen un amplio rango de severidad, desde infecciones cutáneas leves

e intoxicaciones alimentarias a enfermedades potencialmente mortales como el síndrome del shock tóxico, neumonía necrotizante y septicemia. La gravedad de la patología causada por *S. aureus* depende de un amplio espectro de factores de virulencia y de la resistencia a los antibióticos[43].

Algunos de los factores de virulencia que puede presentar *S. aureus* están representados por una familia de proteínas bacterianas con actividad superantigénica: las enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico, toxinas exfoliativas, otras toxinas como las toxinas *α, β, γ,* y *δ,* factores como la *α y β*-hemolisina, la arginina desaminasa y la leucocidina de Panton-Valentine (PVL). La PVL es una exotoxina producida por ciertas cepas de *S. aureus*, cuya acción causa la destrucción de células polimorfonucleares. En 1932, sus descubridores (Panton y Valentine) sugirieron que era responsable de infecciones estafilocóccicas severas en humanos. Las hemolisinas también son reconocidas como potenciales factores de virulencia de *S. aureus* que actúan atacando la membrana celular y producen destrucción plaquetaria, destrucción lisosomal, isquemia y necrosis, por lo que son importantes en el desarrollo de patologías graves[44].

Las toxinas exfoliativas de *S. aureus* son proteínas extracelulares responsables de las manifestaciones cutáneas de la enfermedad denominada impétigo bulloso y en su forma diseminada del síndrome estafilocóccico de la piel escaldada

(SSSS). Este síndrome consiste en una dermatitis exfoliativa que afecta principalmente a neonatos y niños pequeños y resulta de la infección por *S. aureus* productor de estas toxinas. Se caracteriza por la formación de grandes ampollas sin infiltrado de células inflamatorias y separación de extendidos de la epidermis del estrato granuloso, dejando la queratina intacta[45].

Uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus* son las enterotoxinas, proteínas simples, termotolerantes y de bajo peso molecular; las principales detectadas en intoxicaciones alimentarias son *sea, seb, sec, sed, see y seh*[44].

2.2.2.1. Formación de biopelícula

La formación de biopelícula se considera uno de los factores de virulencia en los estafilococos, que les ayuda a adherirse a sus tejidos diana, principalmente implantes y otros materiales de cuerpo extraño, a través de mecanismos adhesivos. Las adhesinas estafilocócicas, que promueven la adhesión a las células hospedadoras, son importantes para las interacciones celulares con proteínas de la superficie celular tales como proteínas de unión a colágeno, fibrinógeno, fibronectina, elastina y laminina y factores de agrupamiento[46].

Algunas cepas de *S. aureus* utilizan un polímero de N-acetil-glucosamina, también referido como adhesina intracelular de polisacárido, para formar biopelículas. El operón ica codifica para la maquinaria que sintetiza este polímero; sin embargo, no todas las cepas poseen dicho elemento genético. Es importante resaltar que deleciones en el operón ica no impiden que la bacteria forme un biopelícula, resaltando la existencia de una vía independiente del operón ica. En este mecanismo alternativo, *S. aureus* expresa una variedad de adhesinas que le permiten unirse y colonizar un gran número de superficies diferentes. Se ha descrito la presencia de un grupo de proteínas denominadas Bap (proteínas asociadas a biopelícula) que participan en este proceso. Las proteínas Bap se encuentran ancladas en la pared celular de S. *aureus* y favorecen la unión de la bacteria, probablemente interactuando con otras proteínas en la superficie de sus células vecinas[47].

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.1. Caracteristicas

Es un bacilo gram-negativo, aeróbico, no esporulado, no fermentador de glucosa, oxidasa positiva, móvil debido a la presencia de un flagelo polar y puede crecer a temperaturas

superiores a 42 °C. Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de los pigmentos piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración[48-49].

Pseudomonas aeruginosa es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud; *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales[49]. A menudo se asocia a infecciones en pacientes inmunosuprimidos internados en unidades de cuidados intensivos, debido a la exposición constante a procedimientos invasivos, como catéteres, sondas, instrumentos y dispositivos de ventilación mecánica[48].

2.3.2. Factores de virulencia

P. aeruginosa produce una amplia variedad de factores de virulencia, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descrita como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias (*pili*), matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas. Los estudiados son el alginato (producido por un subgrupo de cepas), polímero de polisacáridos, que facilita la adherencia a la superficie epitelial

pulmonar, es una barrera para los fagocitos, para los antibióticos, inhibe a los anticuerpos y atenúa la respuesta del hospedero. La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección. El sistema de secreción de tipo III es el responsable por la secreción de las toxinas exoS, exoT, exoU y exoY; las primeras 3 han sido vinculadas a la virulencia. ExoS y ExoT desorganizan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis y causan la muerte celular, en tanto ExoU favorece la inflamación excesiva, incrementa el daño tisular y también causa la muerte celular[50].

2.3.2.1. Formación de biopelícula

La resistencia a diversos antibióticos y sustancias con actividad antimicrobiana ha sido asociada con la formación de biopelículas bacterianas, así como la fagocitosis por componentes del sistema inmune adaptativo. Así mismo, diversas infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa* han sido relacionadas con su capacidad para desarrollar biopelículas; las cuales, están embebidas en una matriz extracelular formada por proteínas de membrana externa, pili, EPS y ácidos nucleicos. Los componentes de los EPS involucrados en la

formación de biopelículas de *P. aeruginosa* están codificados principalmente por diversos genes que se encuentran localizados en tres operones independientes: *algU, psl y pel*[51].

Los pili tipo IV (T4P) producidos por *P. aeruginosa* presentan un movimiento independiente del flagelo a través de una superficie sólida, por una acción de relajación y contracción, llamado *twitching motility.* Los T4P han sido asociados con la formación de biopelículas, un evento esencial en la colonización de los hospederos. Estas estructuras filamentosas, localizadas en un polo de la bacteria, están involucradas en diversos mecanismos, como la adhesión a células humanas, formación de microcolonias, agregación bacteriana, receptor por fagos, evasión de la respuesta inmune y señalización celular[4].

2.4. Acero inoxidable

El acero inoxidable es un material con propiedades mecánicas y químicas compatibles con un amplio rango de uso en muchos campos. En instalaciones médicas, la mayoría de las herramientas quirúrgicas, mesas de operaciones, pero también objetos comunes como pasamanos, manijas y cubiertos están hechos de acero inoxidable. En la industria, se puede utilizar para tanques de

almacenamiento, tuberías, herramientas de corte, tablas, entre muchos otros ejemplos[53].

Cuando está en contacto con un entorno biológico, el acero inoxidable puede estar contaminado por diferentes tipos de microorganismos presentes en su entorno, como bacterias, hongos, levaduras o incluso virus. Esta biocontaminación de la superficie podría involucrar bacterias patógenas y, por lo tanto, ser el comienzo de problemas de salud pública cuando ocurre en entornos críticos. Entre estos patógenos nocivos, *Pseudomonas aeruginosa* es un ejemplo de patógenos peligrosos, ya que es responsable de la mayoría de las infecciones nosocomiales en hospitales y centros de salud y se asocia con algunas de las mayores tolerancias a los tratamientos con antibióticos[54].

A la luz de tales amenazas, el control de la biocontaminación de la superficie de acero inoxidable parece ser primordial para numerosas industrias. Hoy en día, las biocontaminaciones se manejan con el uso de compuestos químicos, pero su eficacia puede estar limitada por cambios fisiológicos cuando las bacterias se organizan en biopelículas en una superficie. Se han propuesto alternativas a estos procedimientos de limpieza, entre las cuales la prevención de la adhesión y el crecimiento de la biopelícula por modificaciones físicas o químicas de la superficie[53].

2.5. Desinfectante

La OMS define aun desinfectante como un agente químico que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos en

fase vegetativa o no esporulada. Los desinfectantes no necesariamente matan todos los organismos, pero los reducen a un nivel que no dañan la salud ni la calidad de los bienes perecederos. Los desinfectantes se aplican sobre objetos y materiales inanimados, como instrumentos y superficies, para tratar y prevenir la infección[55].

Características de un desinfectante[56]:

- ✓ Soluble en agua.
- ✓ Amplio espectro de actividad.
- ✓ Estable: tiempo prolongado de vida útil.
- ✓ No debe reaccionar con materia orgánica ni inactivarse en presencia de ella.
- ✓ Escasa o nula toxicidad para el ser humano.
- ✓ Acción rápida.
- ✓ Capacidad de penetración.
- ✓ Acción residual.
- ✓ Compatible con todos los materiales.
- ✓ Disponibilidad y buena relación costo riesgo-beneficio.
- ✓ No debe afectar al medio ambiente.

Los métodos químicos líquidos para la desinfección son los más utilizados en nuestro sistema hospitalario, existiendo múltiples agentes germicidas en forma líquida. Los principales desinfectantes utilizados en el ámbito hospitalario son: orthophthaldehído, glutaraldehído, cloro y compuestos clorados, formaldehido, peróxido

de hidrógeno, ácido peracético, fenoles, biguanida y amonio cuaternario[57].

2.5.1. Cloro y compuestos clorados

Los desinfectantes basados en cloro, generalmente están disponibles en forma líquida (hipoclorito de sodio - lejía) o sólido (hipoclorito de calcio, dicloroisocianurato de sodio). Su mecanismo de acción está basada en la inhibición de las reacciones enzimáticas, desnaturalización de las proteínas e inactivación de los ácidos nucleicos[58].

Su espectro de acción es virucida, fungicida y bactericida (micobactericida); algunas de sus ventajas es que su acción es rápida, de bajo costo y es de fácil manejo. Algunas de sus limitaciones es su actividad corrosiva, se inactiva en presencia de materia orgánica, produce irritación de las mucosas, se polimeriza con los rayos del sol y necesita estar protegida en envases opacos. Las soluciones de cloro no deben conservarse en envases destapados por más de 12 horas debido a la evaporación del producto activo[57].

2.5.2. Biguanidas poliméricas

Las biguanidas poliméricas han encontrado uso como agentes desinfectantes generales en la industria alimentaria y, con mucho éxito, para la desinfección de piscinas. Es un activo contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, aunque *P. aeruginosa* y *Proteus vulgaris* son menos sensibles. No es esporicida. El Polihexametileno biguanida (PHMB) es un

agente activo de membrana que también deteriora la integridad de la membrana externa de bacterias gram-negativas, aunque la membrana también puede actuar como una barrera de permeabilidad. La actividad de PHMB aumenta en una base de peso con niveles crecientes de polimerización, que se ha relacionado con una mayor perturbación de la membrana interna[59].

PHMB provoca la formación de dominio de los fosfolípidos ácidos de la membrana citoplasmática. Se producen cambios de permeabilidad, y se cree que hay una función alterada de algunas enzimas asociadas a la membrana. La secuencia propuesta de eventos durante su interacción con la envoltura celular de *E. coli* es: (i) existe una atracción rápida de PHMB hacia la superficie celular bacteriana cargada negativamente, con una adsorción fuerte y específica a compuestos que contienen fosfato; (ii) la integridad de la membrana externa está alterada, y PHMB se siente atraído por la membrana interna; (iii) se produce la unión de PHMB a fosfolípidos, con un aumento en la permeabilidad de la membrana interna (pérdida de K +) acompañada de bacteriostasis; y (iv) sigue la pérdida completa de la función de la membrana, con la precipitación de constituyentes intracelulares y un efecto bactericida[60].

2.5.3. Compuestos de amonio cuaternario

Los Compuesto de amonio cuaternario (QAC) son detergentes catiónicos (surfactantes o agentes tensioactivos). Reducen la tensión superficial y forman micelas, lo que permite la dispersión en un líquido. Los compuestos más usados en las unidades hospitalarias son cloruro de alquil dimetil bencil amonio, cloruro de alquil didecil dimetil amonio y el cloruro de dialquil dimetil amonio[57].

Muchos productos antimicrobianos contienen mezclas de QAC y otros complementos para aumentar su eficacia o para dirigirse a un grupo específico de organismos[61]. La gran variedad de estructuras químicas posibles con QAC han permitido una evolución de su efectividad y una expansión de sus aplicaciones en el último siglo. Esto ha resultado en un aumento continuo de la eficacia a la vez que se reducen los costos y se reduce la toxicidad[62].

Mc Donnell propuso la siguiente serie de eventos implicados en la acción de los QAC contra los microorganismos: (i) adsorción de QAC y penetración de la pared celular; (ii) reacción con la membrana citoplásmica (lípido o proteína), seguido de desorganización de la membrana; (iii) fuga de material intracelular de menor peso; (iv) degradación de proteínas y ácidos nucleicos; y (v) lisis de la pared celular causada por enzimas autolíticas[63].

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y equipos

Desinfectantes de uso hospitalario a evaluar:

- Dezavid® (ADEQUATE TECHNOLOGIES): es un producto microbicida universal de nueva generación altamente eficiente sobre la base del polímero soluble en agua y de la combinación del compuesto de amonio cuaternario (QAC), especialmente formulado para el proceso de la desinfección, limpieza previa a esterilización y esterilización química en el campo médico y desinfección de superficies en general. Composición: clorhidrato de polihexametileno guanidina (PHMB) 9,0 %, cloruro de alquil dimetil bencil amonio (cloruro de benzalconio) 1,0 % y agua 90,0 %[64]. (Anexo 1)

- Supersafe-D® (ROKER): detergente no iónico de pH neutro, con actividad frente a materia orgánica. Principio activo: amonio cuaternario de última generación (alquil dimetil bencil amonio con derivados de amonio cuaternario al 0,25 %). Pulverizado en áreas extensas otorga una desinfección adecuada de cuartos de hospitalización, tópicos de emergencia, salas de operaciones, etc[65]. (Anexo 2)

- Lejía tradicional (HIGIENE Y LIMPIEZA S.R.L): solución acuosa de hipoclorito de sodio, potente liberador de oxigeno por lo que es un buen agente de desinfección, blanqueo y desodorización. Composición: hipoclorito de sodio 5,80 % p/p y agua desionizada 94,20 % p/p. (Anexo 3)

Microorganismos de ensayo

- *Staphylococcus aureus* (cepa clínica formadora de biopelícula)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cepa formadora de biopelícula)
- *Pseudomonas aeruginosa* (cepa clínica formadora de biopelícula)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (cepa formadora de biopelícula)

Medios de Cultivo

- Agua peptona bufferada (BD)
- Agar Plate Count (OXOID)
- Agar Tripticasa de Soya - TSA (Merck)
- Agar Cetrimide (Merck)
- Agar Manitol Salado (Merck)
- Agar Infusión Cerebro Corazón (OXOID)
- Agar Test Desoxirribonucleasa – DNAsa (Merck)
- Caldo Tripticasa de Soya - TSB (Merck)
- Agar Columbia (Merck)
- Agar Nutritivo (Merck)

Reactivos

- Cristal Violeta
- Rojo de Congo (Sigma-Aldrich)
- Peróxido de Hidrógeno al 3%
- Etanol (J.T.Baker)
- Acetona (Merck)
- Sangre de carnero (Arez)

- Sacarosa (Merck)
- Glucosa (Merck)

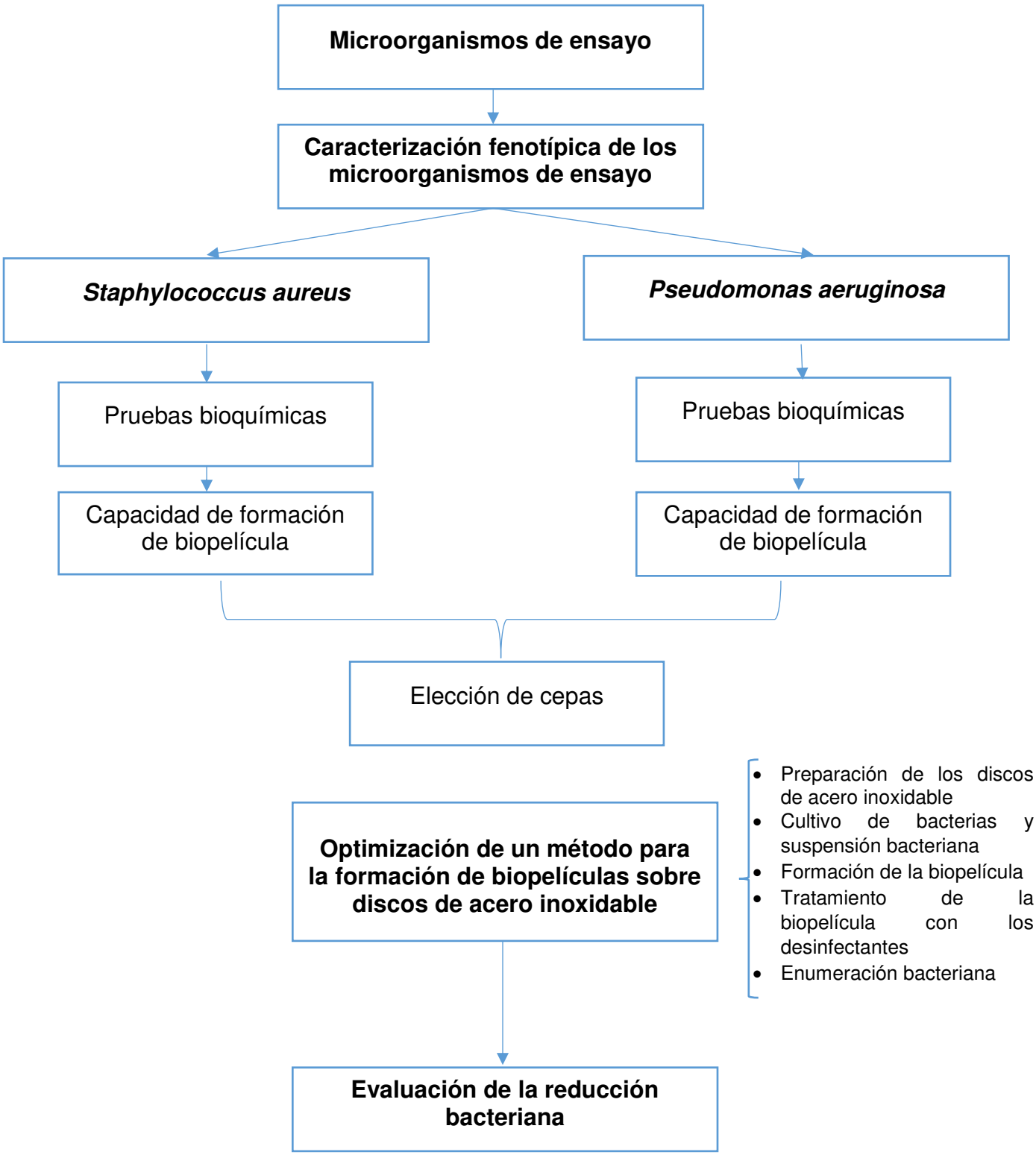
Equipos

- Autoclave Digital (ALP MC-30LDP)
- Incubadora Digital (INCUCELL)
- Balanza Digital (Derver XP-300)
- Estufa (MEMMERT)
- Agitador Vórtex (THERMOLAB)

Otros materiales

- Discos de acero inoxidable de 1 cm de diámetro y 1 mm de espesor grado médico pulido 304. (Anexo 4)
- Perlas de vidrio de 1,00mm-1,05mm (B. BRAUN)
- Micropipeta de 100-1000 µL (BOECO)
- Micropipeta de 10-100 µL (BOECO)
- Placas Petri de vidrio estériles 15 x 100 mm (Pyrex)
- Tubos de ensayo de vidrio (borosilicato)
- Viales de vidrio
- Tips estériles de 100 y 1000 µL
- Tubos cónicos de 15 mL

3.2. Flujograma del trabajo experimental



3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Tipo de estudio

Experimental y prospectivo.

3.3.2. Lugar de Ejecución

Instituto de Química Biológica, Microbiológica y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo". Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima; Julio del 2017 – Mayo del 2018.

3.3.3. Caracterización fenotípica de los microorganismos de ensayo

Para verificar que los microorganismos de ensayo son *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se realizó pruebas bioquímicas. Para ello se sembró las cepas en Agar Tripticasa Soya (TSA) y se incubó a 37 °C por 24 horas. A las cepas aisladas, se les sometió a las siguientes pruebas:

3.3.3.1. Pruebas bioquímicas para *Staphylococcus aureus*

a) Coloración Gram

Se realizó la coloración Gram, se identifica como positivo porque se observan cocos Gram positivos en racimos[66].

b) Prueba de la catalasa

Se utiliza para probar la capacidad del microorganismo para producir la enzima catalasa, la cual facilita la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno[67]. La prueba es

positiva cuando la bacteria reacciona produciendo la liberación de burbujas, que es la característica dada por la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno[68].

c) Crecimiento en Agar Manitol Salado

Se emplea para el aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus*. El agar manitol salado contiene una concentración de cloruro sódico de 7,5 %, el cual inhibe parcial o completamente a los microorganismos bacterianos diferentes de los estafilococos. Los estafilococos coagulasa (+) (*Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo porque tienen la capacidad de fermentar el manitol, formando ácidos que modifica el pH del medio y vira el indicador de pH de color rojo al amarillo[69].

d) Crecimiento en Agar Sangre

Las colonias de *Staphylococcus aureus* sembradas en agar sangre de carnero al 5 % son medianas a grandes, lisas, ligeramente elevadas, de borde entero y la mayoría se ellas presentan un pigmento amarillo cremoso. Suelen presentar la mayoría β-hemólisis.[70]

e) Prueba de la coagulasa

Se realiza para comprobar la facultad de la bacteria de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa, la cual aumenta la velocidad de coagulación del plasma. El resultado final es la formación de un coágulo de fibrina[66].

3.3.3.2. Pruebas bioquímicas para *Pseudomonas aeruginosa*

a) Coloración Gram

Se identificó por observación microscópica de las cepas aisladas mediante la tinción Gram. La identificación positiva es la observación de bacilos gram negativos rectos o ligeramente curvados que pueden estar agrupados o en parejas[71].

b) Crecimiento en Agar Cetrimide

La mayor parte de las cepas produce piocianina (pigmento verde). Además presentan un olor característico a uvas, las colonias son grandes y pueden ser mucoides[72].

c) Prueba de Oxidasa

Se trabajó a partir del crecimiento bacteriano en TSA. Se humedece una fracción de papel de filtro con el reactivo dentro de una placa de Petri. Con la ayuda de un palillo se escoge la colonia a probar y se coloca extendiéndola sobre el papel filtro. La

prueba será positiva cuando haya un viraje hacia el azul-violeta, con el reactivo N,N,N,N, tetrametil-p-fenilendiamina (Sigma) después de 10-15 segundos. En la prueba negativa no hay viraje de color[66].

d) Crecimiento a 42 °C

Todas las cepas de *P. aeruginosa* crecen a 42°C[70].

e) Agar TSI

En este medio se determina la capacidad de la bacteria del uso de hidratos de carbono como la lactosa, glucosa y sacarosa. También se evalúa la producción de gas y ácido sulfhídrico (H_2S). Si hay uso de azucares, cambia el medio a color amarillo y se coloca "A", la producción de gas y del ácido sulfhídrico se representa con un "+", la ausencia de estos es con un "-" y el no uso de los azúcares se representa mediante una "K" o "N". *Pseudomonas aeruginosa* da una reacción K/K o N/N y no hay producción de gas ni de ácido sulfhídrico[73].

f) Utilización de Citrato:

Este método sirve para la determinación si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo. La prueba es positiva si el crecimiento se da con una coloración azul intensa[72].

3.3.3.3. Capacidad de formación de biopelícula para *Staphylococcus aureus*

Método Rojo de Congo: Para demostrar la capacidad de formación de biopelícula de las cepas de *Staphylococcus aureus* se utilizó el método Rojo de Congo. El medio está compuesto por agar BHI 37 g/L, sacarosa 50 g/L y Rojo de Congo 0,8 g/L**.** Se sembró las cepas de *Staphylococcus aureus* a evaluar y se incubó a 37°C por 48 horas. Se considera a los microorganismos con capacidad formadora de biopelículas si el crecimiento de las colonias es de color negro. Se considera negativa la prueba si las colonias presentan coloración roja o rosada[74].

3.3.3.4. Capacidad de formación de biopelícula para *Pseudomonas aeruginosa*

Método de Christensen, *et al*: Para demostrar la capacidad de formación de biopelícula de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó el método descrito por Christensen *et al*. En este método el Caldo Tripticasa de Soya (TSB) suplementado con glucosa se inoculó con un cultivo fresco de microorganismo, se incuba 24 horas a 37 °C. Terminada la incubación se realizó una dilución del inoculo en caldo TSB suplementado y se transfirió 2

mL a un tubo de vidrio, se incubo a 37 °C por 48 horas. Los tubos luego se decantaron y lavaron con suero fisiológico y se secaron a temperatura ambiente. Los tubos secos luego se colorearon con cristal violeta al 1 %. El exceso de colorante se removió y los tubos se lavaron con agua desionizada. Luego se dejaron secar los tubos en posición invertida y se observó la formación de biopelículas. Se considera que la prueba es positiva, cuando una película fina pero visible está adherida a la pared y al fondo del tubo[75].

3.3.4. Optimización de un método para la formación de biopelículas sobre discos de acero inoxidable

- **Preparación de los discos de acero inoxidable**

  Los discos de acero inoxidable se lavaron con agua destilada y se limpiaron antes de su uso. Para eliminar la grasa, los discos se remojaron en acetona durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada, luego se limpiaron con etanol y se enjuagaron con agua destilada. A continuación, los discos fueron colocados en agua destilada hirviente durante 10 min y se secaron a 40 °C. Como etapa final, se autoclavaron durante 15 minutos a 121 ºC[76].

- **Cultivo de bacterias y suspensión bacteriana**

  Una colonia de cada aislado de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* de un cultivo en TSA de 24 horas se inoculó en 10 mL de TSB y se incubó a 37 ºC durante 24 horas; se recolectó por centrifugación a 4000 rpm por 20 min. Se lavó tres veces con Agua peptonada bufferada (APB), finalmente se resuspendió en TSB, equivalente a 0,5 de la escala McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) [77].

- **Formación de la biopelícula**

  Se colocó un disco de acero inoxidable en un tubo cónico de 15 mL de capacidad que contenía 6 mL de suspensión bacteriana. Se dejó a 4 °C por 24 horas, se procedió a sacar los discos con pinzas estériles y lavarlos con 50 mL de APB con agitación breve, los discos fueron transferidos a tubos que contenían 6 mL de TSB y fueron incubados a 37°C por 6 días; tiempo durante el cual se reemplazó el medio cada día con el fin de dejar sólo los microorganismos adheridos en la superficie del disco y proporcionar nutrientes frescos[78]. (Figura 2.A y 3.A)

- **Tratamiento de la biopelícula con los desinfectantes**

  Luego de 6 días, los discos de acero inoxidable se extrajeron con una pinza estéril y fueron lavados con 50 mL de APB con agitación. Se colocaron en recipientes de vidrio estériles y fueron sometidos a los tres desinfectantes

durante el tiempo especificado. Además se trabajó con un grupo control, el cual no se sometió a ningún desinfectante.

El desinfectante Dezavid® se utilizó en las mínimas concentraciones recomendadas según su hoja técnica: 0,05 %, 0,10 % y 1,00 % y por el tiempo indicado (Figura 2.B). El desinfectante Supersafe-D® en spray fue aplicado sobre los discos de forma directa a una distancia de 30 cm[79] y se dejó en contacto durante 10 minutos (Figura 3.B). La lejía tradicional se preparó a una concentración de 1:20 y se dejó actuar durante 5 minutos. (Figura 2.B)

- **Enumeración bacteriana**

Después del tratamiento, los discos de acero inoxidable se lavaron dos veces con APB. A continuación, los discos se transfirieron a tubos cónicos que contenían 6 mL de APB y 3 g de perlas de vidrio estériles (1,00 mm - 1,05 mm); se agitó con vórtex durante 1 min. Se plaqueó en Agar Plate Count (PC) 1 mL de suspensión de células sin diluir y las diluciones en APB de 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} y 10^{-7} por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 horas. Después del tiempo de incubación se procedió a realizar el recuento de colonias (UFC/disco). (Figura 2.C Y 3.C) [77].

3.3.5. Evaluación de la reducción bacteriana

Se selecciona una única dilución, aquella que produce entre 30 y 300 colonias por placa y se calcula la media de colonias obtenidas por la dilución seleccionada[80].

Posteriormente se calcula las UFC/disco obtenidas tanto en el control como en los discos que fueron sometidos a desinfectantes y se halla el porcentaje.

Estas UFC/disco se convirtieron a unidades de $\log_{10}$ CFU/disco para hallar la reducción logarítmica que evidencia cuanto fue la reducción bacteriana después de cada tratamiento con el desinfectante, el cual se deriva de la siguiente fórmula[81]:

$$\text{Reducción logarítmica} = \text{Log}\,[N_0] - \text{Log}\,[N]$$

Donde:

N_0: es el conteo de UFC/disco previo al tratamiento (control).

N: es el conteo de UFC/disco después del tratamiento con el desinfectante.

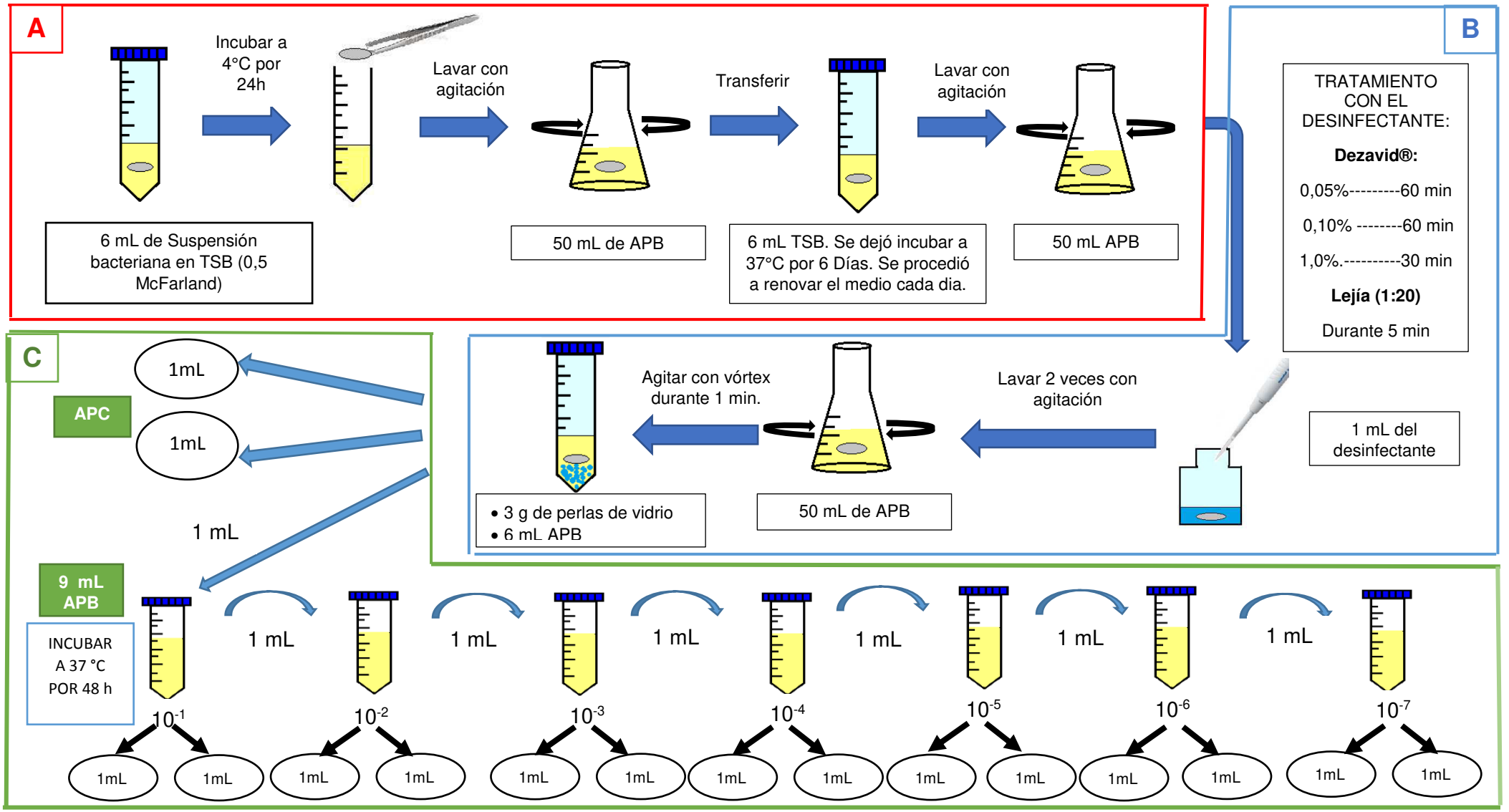


Figura 2. Esquema de trabajo: A. Formación de biopelícula, B. Tratamiento con el desinfectante Dezavid® y lejía, C. Enumeración bacteriana.

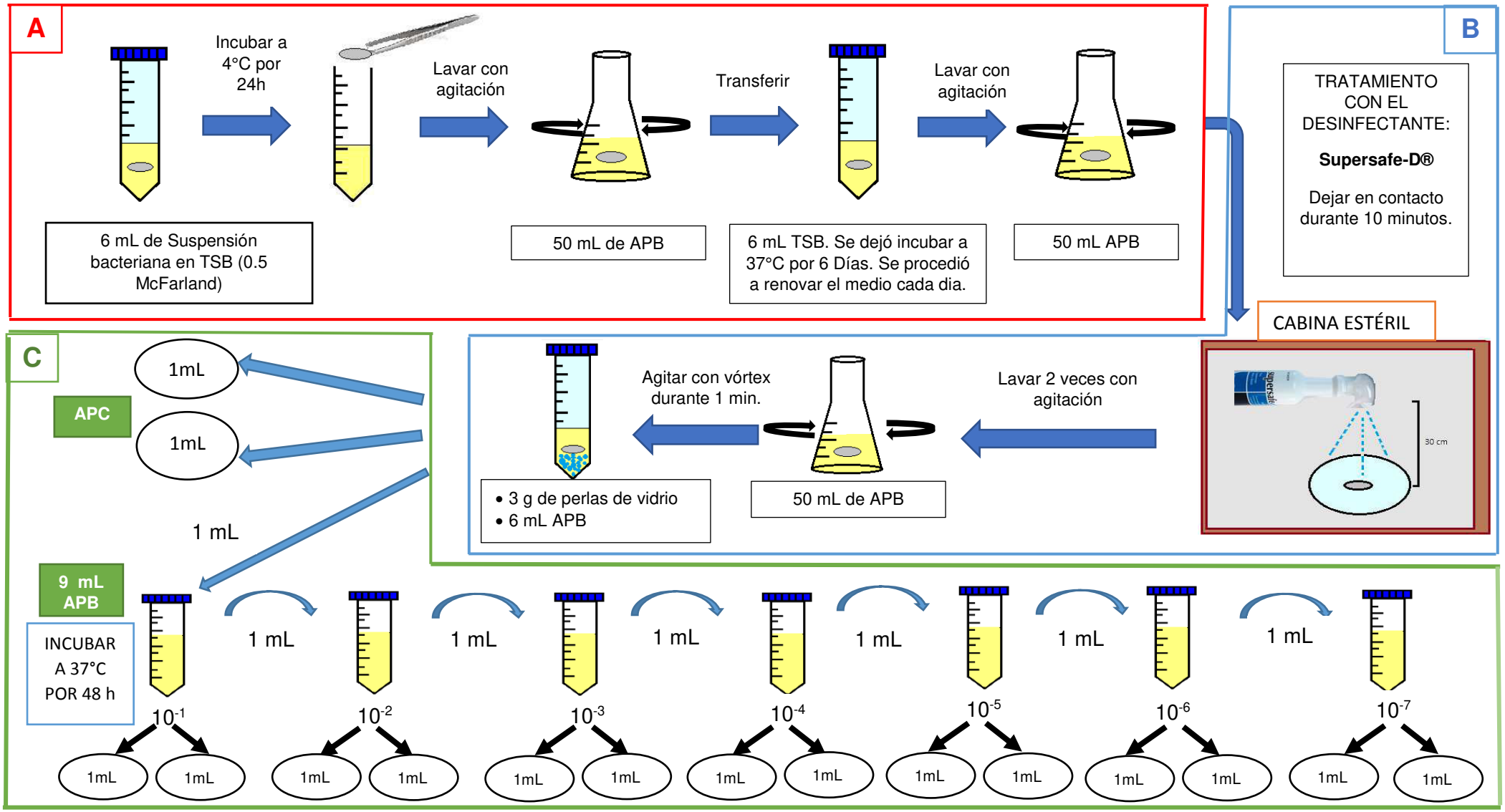


Figura 3. Esquema de trabajo: A. Formación de biopelícula, B. Tratamiento con el desinfectante Supersafe-D®, C. Enumeración bacteriana.

3.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron tres veces, procediendo a generar una base de datos y codificar las variables haciendo uso del programa Microsoft Office Excel 2016 y el paquete estadístico SPSS Vs 24 a fin de dar consistencia a la información obtenida como producto de la ejecución del instrumento de investigación.

En segundo lugar, se procedió a utilizar el análisis descriptivo con el fin de describir y caracterizar cada una de las variables haciendo uso de medidas de tendencia central (media), medidas de dispersión (desviación estándar y desviación estándar relativa), así como también gráficos de barras. En tercer lugar se realizó el análisis ANOVA para observar si los grupos son iguales o diferentes para poder realizar un análisis de comparaciones múltiples “DUNCAN”.

Finalmente, para evaluar la eficacia de los desinfectantes en la investigación se utilizó la reducción logarítmica.

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización fenotípica de los microorganismos de ensayo

4.1.1. Pruebas bioquímicas para *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 1 podemos observar los resultados de las pruebas bioquímicas para *Staphylococcus aureus*, dando resultados positivos para la cepa clínica de *Staphylococcus aureus* tomando como referencia a la cepa ATCC 25923.

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Staphylococcus aureus.*

PRUEBA	RESULTADO
COLORACIÓN GRAM	Cocos gram positivos en racimos.
COAGULASA	(+)
AGAR SANGRE	Colonias lisas, algo elevadas, borde entero y de color crema, presentando β-hemólisis.
AGAR MANITOL SALADO	Colonias de color amarillo en un medio circundante de color amarillo.
CATALASA	(+)

4.1.2. Pruebas bioquímicas para *Pseudomonas aeruginosa*

En la Tabla 2 podemos observar los resultados de las pruebas de identificación para *Pseudomonas aeruginosa*, dando positivo para la cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* tomando como referencia a la cepa ATCC 9027.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación *de Pseudomonas aeruginosa.*

PRUEBA	RESULTADO
COLORACIÓN GRAM	Bacilos gram negativos.
AGAR CETRIMIDE	Colonias lisas, de borde entero, aspecto mucoide y de color verde. Olor a uvas.
CRECIMIENTO A 42°C	(+)
OXIDASA	(+)
CITRATO	(+)
TSI	K/K, Gas (-) y H_2S (-)

4.1.3. Capacidad de formación de biopelícula para *Staphylococcus aureus*

Método Rojo de Congo: los resultados de la evaluación de la capacidad formadora de biopelículas dio positivo para algunas cepas clínicas tomando como referencia a la cepa ATCC 25923 (Figura 4), observando crecimiento de colonias de color negro. Se trabajó con la cepa clínica que presentó mayor formación de biopelícula. (Figura 5)



Figura 4. Resultado del método de Rojo de Congo para *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.



Figura 5. Resultado del método de Rojo de Congo positivo para *Staphylococcus aureus* cepa clínica.

4.1.4. Capacidad de formación de biopelícula para *Pseudomonas aeruginosa*

Método de Christensen, *et al*: los resultados de la evaluación de la capacidad formadora de biopelículas dio positivo para algunas cepas clínicas tomando como referencia a la cepa ATCC 9027 (Figura 6.A), cuando una película fina pero visible está adherida a la pared y al fondo del tubo se considera un resultado positivo (Figura 6.B). Se trabajó con la cepa clínica que presentó mayor formación de biopelícula.

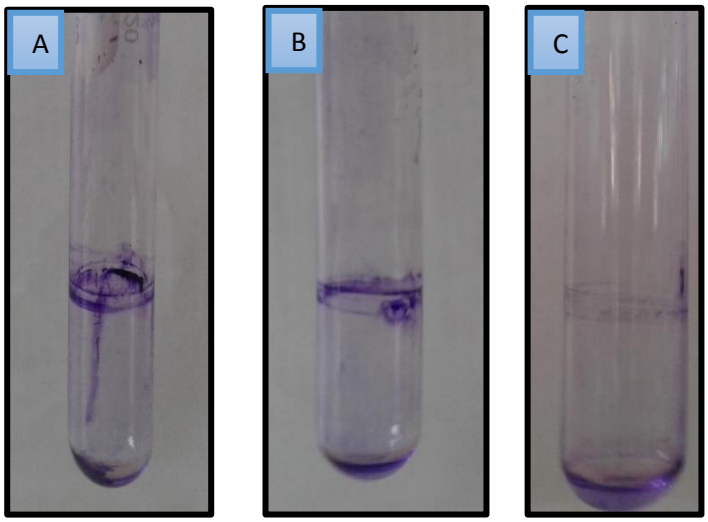


Figura 6. Resultados del Método de Christensen, *et al*: A. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 formadora de biopelícula, B. *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica formadora de biopelícula, C. *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica no formadora de biopelícula.

4.2. Optimización de un método para la formación de biopelículas sobre discos de acero inoxidable

Se optimizó un método para la formación de biopelículas sobre discos de acero inoxidable tomando como base diferentes

investigaciones realizadas en el tema[76-79]. Los datos obtenidos tuvieron un % RSD menor al 15 %.

Enumeración bacteriana del Control

- El recuento de colonias obtenido en el control de *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica de los discos de acero inoxidable que no se les sometió a ningún desinfectante lo podemos observar en la Tabla 3. Se tomó como recuento significativo la dilución que produjo un número de colonias entre 30 y 300.

Tabla 3. Recuento de colonias del control para *Staphylococcus aureus.*

BACTERIA	ensayo	DILUCIONES															
Staphylococcus aureus		DIRECTO		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}	
ATCC	1	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	202	203	90	88	23	20	0	0
	2	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	200	202	89	90	22	22	0	0
	3	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	200	201	90	90	21	22	0	0
CLINICA	1	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	280	282	100	101	22	24	0	0
	2	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	280	282	99	100	23	24	0	0
	3	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	+300	281	281	101	101	24	25	0	0

- El recuento de colonias obtenido en el control de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica de los discos de acero inoxidable que no se les sometió a ningún desinfectante lo podemos observar en la Tabla 4. Se tomó como recuento significativo la dilución que produjo un número de colonias entre 30 y 300.

Tabla 4. Recuento de colonias del control para *Pseudomonas aeruginosa.*

BACTERIA	ensayo	DILUCIONES															
Pseudomonas aeruginosa		DIRECTO		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}	
ATCC	1	+300	+300	+300	+300	+300	+300	265	263	70	68	10	9	0	0	0	0
	2	+300	+300	+300	+300	+300	+300	265	264	69	69	9	8	0	0	0	0
	3	+300	+300	+300	+300	+300	+300	266	265	70	69	9	9	0	0	0	0
CLINICA	1	+300	+300	+300	+300	+300	+300	270	271	77	76	10	11	0	0	0	0
	2	+300	+300	+300	+300	+300	+300	272	270	77	78	12	10	0	0	0	0
	3	+300	+300	+300	+300	+300	+300	270	273	78	77	11	12	0	0	0	0

En la Tabla 5 podemos observar que el recuento de colonias (UFC/disco) del control en el cual los discos de acero inoxidable no fueron sometidos a ningún desinfectante para *Staphylococcus aureus* ATCC fue 8,95 x 10^6 y para *Staphylococcus aureus* cepa clínica fue 10,03 x 10^6, mientras que para Pseudomonas *aeruginosa* ATCC fue 6,92 x 10^5 y *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica fue 7,72 x 10^5.

Tabla 5. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* del control.

Bacteria		N	Media UFC/Disco	Desviación estándar	% RSD
Staphylococcus aureus	ATCC	6	8,95 x 10^6	83666,00	0,93
	Clínica	6	10,03 x 10^6	81649,66	0,81
Pseudomonas aeruginosa	ATCC	6	6,92 x 10^5	7527,73	1,09
	Clínica	6	7,72 x 10^5	7527,73	0,98

En la Figura 7 podemos observar que del grupo control en el cual los discos de acero inoxidable no fueron sometidos a ningún desinfectante *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica tuvieron un mayor recuento de colonias (UFC/disco) que *Pseudomonas aeruginosa ATCC y cepa clínica.*

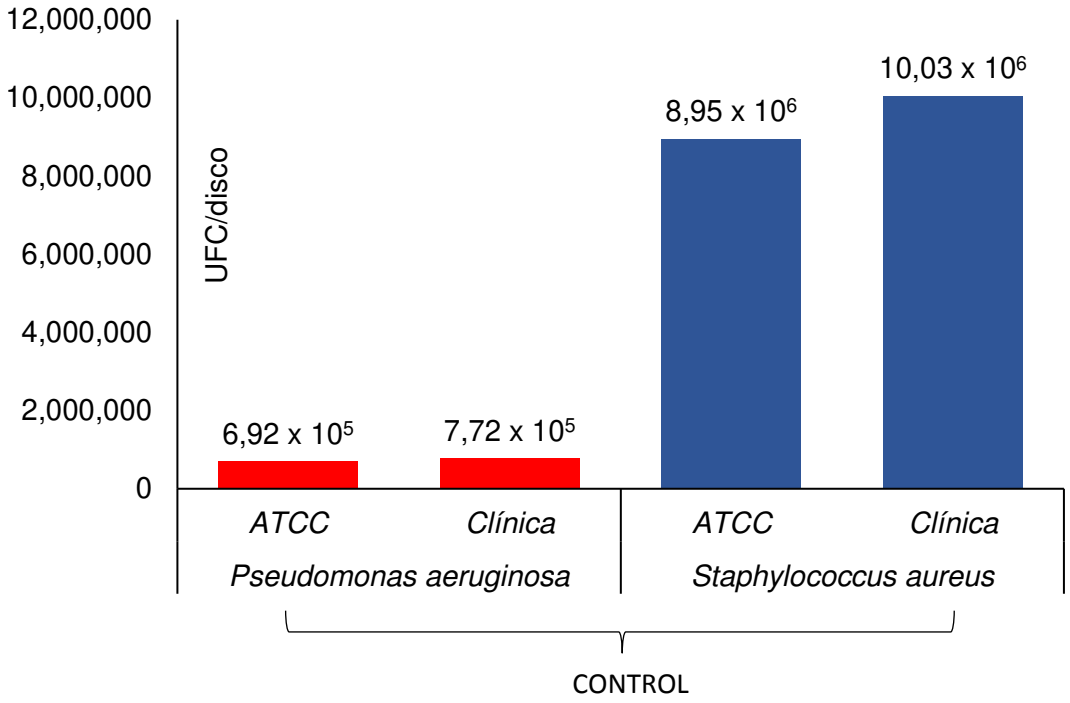


Figura 7. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* del control.

Enumeración bacteriana después del tratamiento con Lejía tradicional (1:20):

- Después del tratamiento con Lejía (1:20) el recuento de colonias para *Staphylococcus aureus* ATCC fue 3,45 x 10^3 UFC/disco, mientras que para *Staphylococcus aureus* cepa clínica fue 4,32 x 10^3 UFC/disco. (Anexo 5)
- Después del tratamiento con Lejía (1:20) el recuento de colonias para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC fue 4,28 x 10^3

UFC/disco, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica fue 5,63 x 10^3 UFC/disco. (Anexo 6)

Tabla 6. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Lejía tradicional.

Bacteria		N	Media (UFC/Disco)	Desviación estándar	% RSD
Staphylococcus aureus	ATCC	6	3,45 x10^3	207,36	6,01
	Clínica	6	4,32 x10^3	222,86	5,16
Pseudomonas aeruginosa	ATCC	6	4,28 x10^3	636,92	14,87
	Clínica	6	5,63 x10^3	773,74	13,73

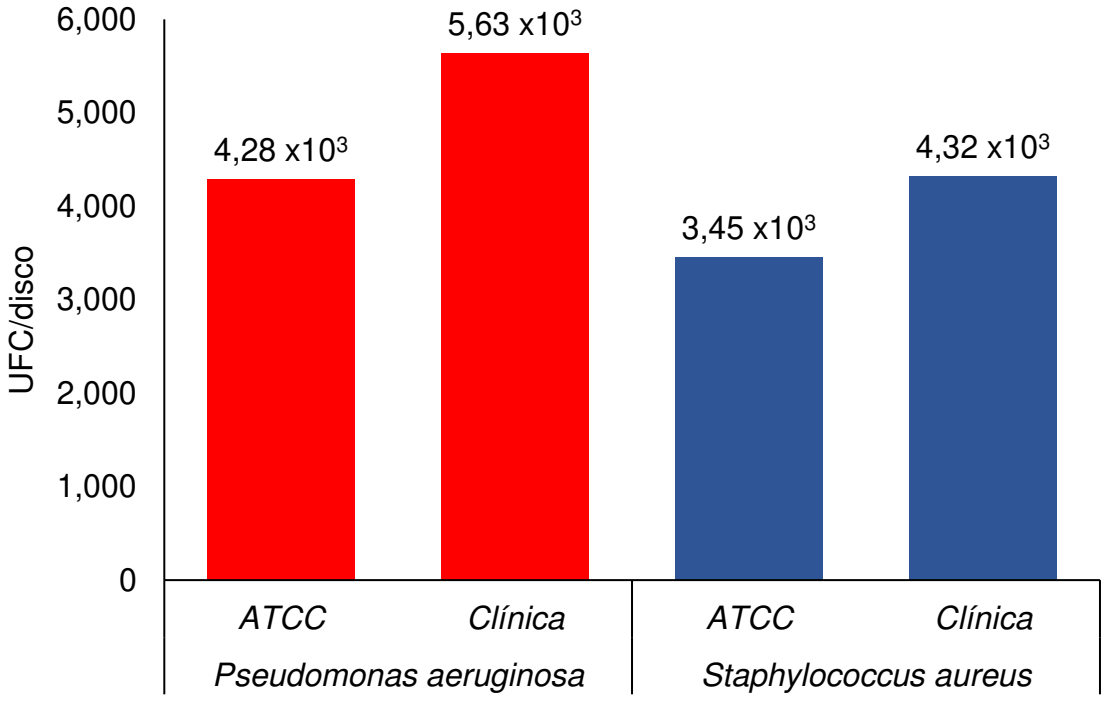


Figura 8. Comparación de UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Lejía tradicional.

Enumeración bacteriana después del tratamiento con Supersafe-D®:

No hubo un recuento significativo para ninguna de las cepas bacterianas. (Anexo 5 y 6)

Enumeración bacteriana después del tratamiento con Dezavid®:

- Dezavid® concentración 0,05 % (Tabla 7 y Figura 9)

- Después del tratamiento con Dezavid® 0,05 % el recuento de colonias para *Staphylococcus aureus* ATCC fue 4,70 x 10^4 UFC/disco, mientras que para *Staphylococcus aureus* cepa clínica fue 4,73 x 10^4 UFC/disco.
- Después del tratamiento con Dezavid® 0,05 % el recuento de colonias para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC fue 6,05 x 10^4 UFC/disco, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica fue 6,58 x 10^4 UFC/disco.

- Dezavid® concentración 0,10 % (Tabla 7 y Figura 9)

- Después del tratamiento con Dezavid® 0,10 % el recuento de colonias para *Staphylococcus aureus* ATCC fue 1,10 x 10^3 UFC/disco, mientras que para *Staphylococcus aureus* cepa clínica fue 1,12 x 10^3 UFC/disco.
- Después del tratamiento con Dezavid® 0,10% el recuento de colonias para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC fue 4,95 x 10^3 UFC/disco, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica fue 4,93 x 10^3 UFC/disco.

- Dezavid® concentración 1,00 %

No hubo crecimiento para ninguna de las cepas bacterianas. (Anexo 5 y 6)

Tabla 7. UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Dezavid® 0,05 % y 0,10 %.

Bacteria		N	0,05 %			0,10 %		
			Media	Desviación estándar	% RSD	Media	Desviación estándar	% RSD
Staphylococcus aureus	ATCC	6	$4{,}70 \times 10^4$	5019,96	10,68	$1{,}10 \times 10^3$	11,69	1,06
	Clínica	6	$4{,}73 \times 10^4$	1366,26	2,89	$1{,}12 \times 10^3$	17,89	1,60
Pseudomonas aeruginosa	ATCC	6	$6{,}05 \times 10^4$	2588,44	4,28	$4{,}95 \times 10^3$	301,66	6,09
	Clínica	6	$6{,}58 \times 10^4$	2857,74	4,34	$4{,}93 \times 10^3$	242,21	4,91

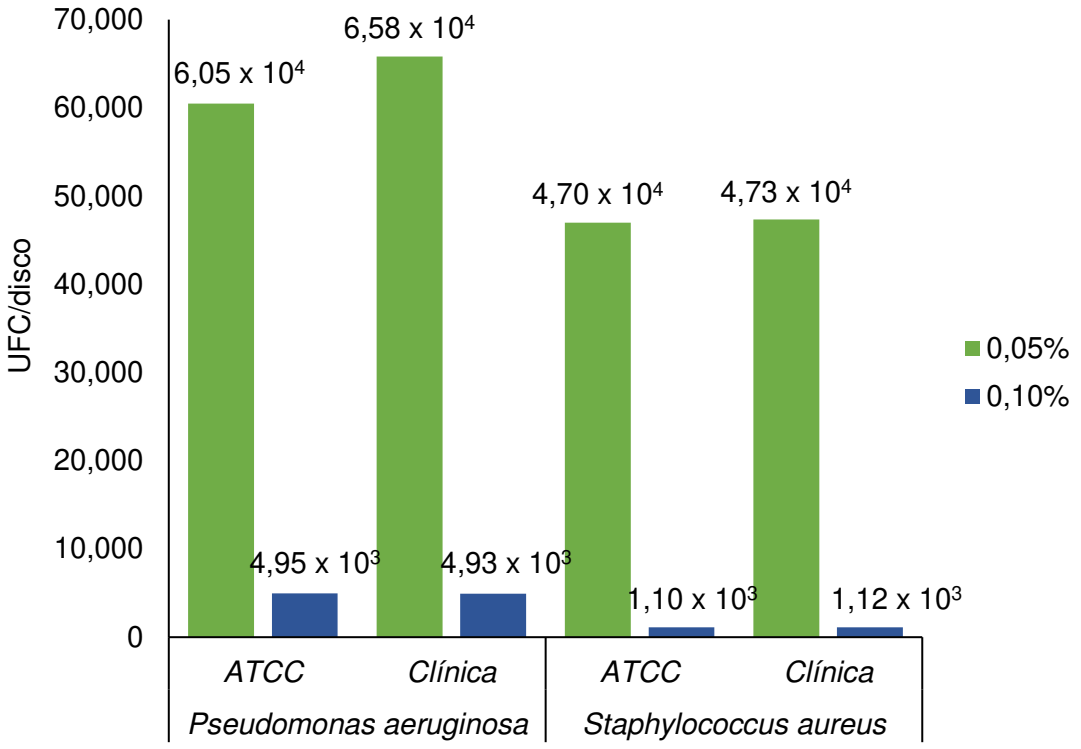


Figura 9. Comparación de UFC/disco de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* después del tratamiento con Dezavid® 0,05 % y 0,10 %.

Comparación del recuento bacteriana (UFC/disco) del grupo control en el cual los discos de acero inoxidable no se les sometieron a ningún tratamiento con desinfectante y el recuento bacteriana (UFC/disco) de los discos de acero inoxidable que si se les sometió al tratamiento con los desinfectantes por el tiempo especificado por el fabricante; se observa que después del tratamiento con los desinfectantes hubo reducción del recuento bacteriano para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica. (Figura 10)

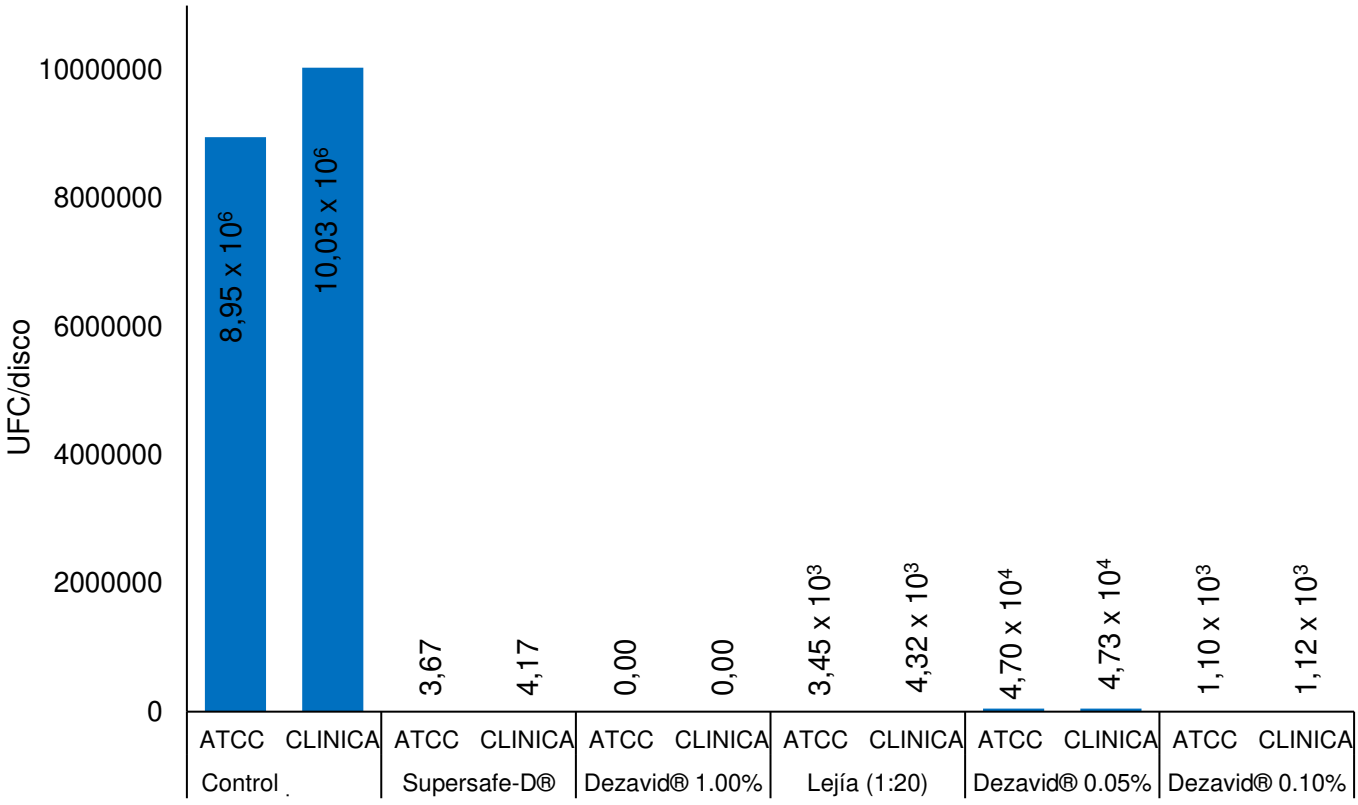


Figura 10. Comparación de UFC/disco del control y UFC/disco después del tratamiento con Lejía tradicional, Supersafe-D® y Dezavid® 0,05 %, 0,10 %y 1,00 % para *Staphylococcus aureus*.

Comparación del recuento bacteriana (UFC/disco) del grupo control en el cual los discos de acero inoxidable no se les sometieron a ningún tratamiento con desinfectante y el recuento bacteriano (UFC/disco) de los discos de acero inoxidable que si se les sometió al tratamiento con los desinfectantes por el tiempo especificado por el fabricante; se observa que después del tratamiento con los desinfectantes hubo reducción del recuento bacteriano para *Pseudomonas aeruginosa ATCC* y cepa clínica. (Figura 11)

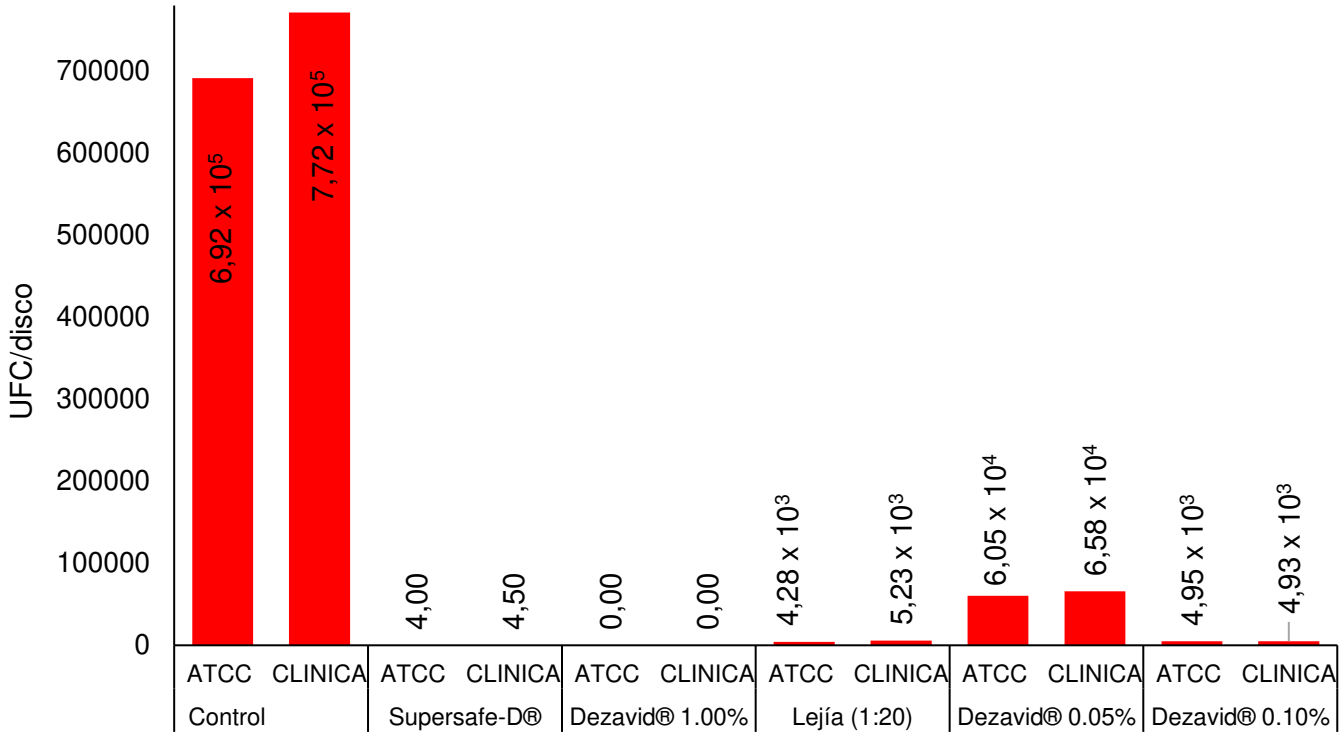


Figura 11. Comparación de UFC/disco del control y UFC/disco después del tratamiento con Lejía tradicional, Supersafe-D® y Dezavid® 0,05 %, 0,10 %y 1,00 % para *Pseudomonas aeruginosa.*

4.3. Evaluación de la reducción bacteriana

4.3.1. Reducción logarítmica

Se halló la reducción logarítmica de los desinfectantes: Lejía tradicional, Supersafe-D® y Dezavid® 0,05 %, 0,10 %y 1,00 % para evaluar la eficacia de los desinfectantes contra biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* sobre discos de acero inoxidable.

Tabla 8. Porcentaje y Reducción logarítmica de los desinfectantes para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

DESINFECTANTE	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	BACTERIA	CEPA	CONTROL UFC/disco	Bacterias después del tratamiento UFC/disco	Reducción logarítmica Log [N0]-Log [N]	(%)
Lejía (1:20)	5 min	*S. aureus*	ATCC	$8,95 \times 10^6$	$3,45 \times 10^3$	3,41	99,96145
			CLÍNICA	$10,03 \times 10^6$	$4,32 \times 10^3$	3,36	99,95693
		P. aeruginosa	ATCC	$6,92 \times 10^5$	$4,28 \times 10^3$	2,21	99,38150
			CLÍNICA	$7,72 \times 10^5$	$5,63 \times 10^3$	2,14	99,27073
Supersafe-D®	10 min	*S. aureus*	ATCC	$8,95 \times 10^6$	3,67	6,39	99,99996
			CLÍNICA	$10,03 \times 10^6$	4,17	6,38	99,99996
		P. aeruginosa	ATCC	$6,92 \times 10^5$	4,00	5,24	99,99942
			CLÍNICA	$7,72 \times 10^5$	4,17	5,27	99,99946
Dezavid® 0,05 %	60 min	*S. aureus*	ATCC	$8,95 \times 10^6$	$4,70 \times 10^4$	2,28	99,47486
			CLÍNICA	$10,03 \times 10^6$	$4,73 \times 10^4$	2,33	99,52841
		P. aeruginosa	ATCC	$6,92 \times 10^5$	$6,05 \times 10^4$	1,06	91,25723
			CLÍNICA	$7,72 \times 10^5$	$6,58 \times 10^4$	1,07	91,47668
Dezavid® 0,10 %	60 min	*S. aureus*	ATCC	$8,95 \times 10^6$	$1,10 \times 10^3$	3,91	99,98771
			CLÍNICA	$10,03 \times 10^6$	$1,12 \times 10^3$	3,95	99,98883
		P. aeruginosa	ATCC	$6,92 \times 10^5$	$4,95 \times 10^3$	2,15	99,28468
			CLÍNICA	$7,72 \times 10^5$	$4,93 \times 10^3$	2,20	99,36140
Dezavid® 1,00 %	30 min	*S. aureus*	ATCC	$8,95 \times 10^6$	0	6,95	100,00000
			CLÍNICA	$10,03 \times 10^6$	0	7,00	100,00000
		P. aeruginosa	ATCC	$6,92 \times 10^5$	0	5,84	100,00000
			CLÍNICA	$7,72 \times 10^5$	0	5,89	100,00000

4.4. Comparación estadística de la eficacia

Se separó en 4 familias los datos (*S. aureus* ATCC, *S. aureus* cepa clínica, *P. aeruginosa* ATCC y *P. aeruginosa* cepa clínica) y por cada familia se separó 6 grupos (control, Lejía, Dezavid® 0,05 %, Dezavid® 0,10 %, Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D®); se ingresaron los datos en el SPSS v24 para hallar las medias automáticamente y determinar mediante el test de ANOVA si existe diferencias significativas entre alguno de los grupos.

Como se observa en la Tabla 8, todas las familias resultan con diferencias significativas menores a 0,05 lo cual rechaza la hipótesis nula de que todas las medias son iguales. Una vez realizado esto, se pasa a la prueba pos hoc de DUNCAN para comparar los grupos entre sí.

Tabla 9. Análisis de ANOVA de los desinfectantes y el grupo control.

BACTERIAS	GRUPOS	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
***Staphylococcus aureus* ATCC**	Entre grupos	399600334278036,000	5	79920066855607,1 1170873856,222	68256,769	0,000
	Dentro de grupos	35126215686,667	30			
	Total	399635460493722,000	35			
***Staphylococcus aureus* cepa clínica**	Entre grupos	502290664159948,000	5	100458132831990 1111430553,694	90386,334	0,000
	Dentro de grupos	33342916610,833	30			
	Total	502324007076559,000	35			
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC**	Entre grupos	2312899212213,330	5	462579842442,667 10643889,022	43459,664	0,000
	Dentro de grupos	319316670,667	30			
	Total	2313218528884,000	35			
***Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica**	Entre grupos	2879932563056,810	5	575986512611,361 10915111,361	52769,641	0,000
	Dentro de grupos	327453340,833	30			
	Total	2880260016397,640	35			

El test de DUNCAN junta los grupos que no guardan diferencia significativa y los separa de otros con los que guardan diferencia significativa.

Como se observa en Tabla 9 y 10 para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica no se hallaron diferencias estadísticas significativas entre Dezavid® 1,00 %, Dezavid® 0,10 %, Lejía y Supersafe-D®. Tanto el grupo control, como Dezavid® 0,05 % son significativamente diferentes con los demás grupos.

Tabla 10. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Staphylococcus aureus* ATCC.

GRUPOS	N	1	2	3
Dezavid® 1,00 %	6	0,00		
Supersafe-D®	6	3,67		
Dezavid® 0,10%	6	1101,67		
Lejía	6	3450,00		
Dezavid® 0,05%	6		47000,00	
Control	6			8950000,00
Sig.	-	0,875	1,000	1,000

Tabla 11. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Staphylococcus aureus* cepa clínica.

GRUPOS	N	1	2	3
Dezavid® 1,00 %	6	0,00		
Supersafe-D®	6	4,17		
Dezavid® 0,10%	6	1120,00		
Lejía	6	4316,67		
Dezavid® 0,05%	6		47333,33	
Control	6			10033333,33
Sig.	-	0,840	1,000	1,000

Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica como se observa en Tabla 11 y 12 no se hallaron diferencias estadísticas significativas entre Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D®; tampoco se halló entre Dezavid® 0,10 % y Lejía. Tanto el grupo control, como Dezavid® 0,05 % son significativamente diferentes con los demás grupos. Además entre Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D® son significativamente diferentes a Dezavid® 0,10 % y Lejía.

Tabla 12. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

GRUPOS	N	1	2	3	4
Dezavid® 1,00 %	6	0,00			
Supersafe-D®	6	4,00			
Lejía	6		4283,33		
Dezavid® 0,10%	6		4950,00		
Dezavid® 0,05%	6			60500,00	
Control	6				691666,67
Sig.	-	0,998	0,726	1,000	1,000

Tabla 13. Análisis de comparaciones múltiples "DUNCAN" para *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica.

GRUPOS	N	1	2	3	4
Dezavid® 1,00 %	6	0,00			
Supersafe-D®	6	4,50			
Lejía	6		5633,33		
Dezavid® 0,10%	6		4933,33		
Dezavid® 0,05%	6			65833,33	
Control	6				771666,67
Sig.	-	0,998	0,716	1,000	1,000

V. DISCUSIÓN

Una biopelícula se puede definir como una comunidad microbiana organizada en las EPS que se adhiere a las superficies vivas o inanimadas. Numerosas bacterias gram-positivas, gram-negativas y hongos de importancia clínica pueden formar biopelículas[82], siendo difíciles de erradicar porque son altamente resistentes a los desinfectantes por uno o más mecanismos, además se considera que son responsables de hasta el 60 % de todas las infecciones en humanos[83]. *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son productores notorios de biopelículas, el primero es nosocomial y responsable principalmente de infecciones asociadas a dispositivos médicos y superficies[84,85] y el segundo es un patógeno oportunista que causa infecciones potencialmente mortales principalmente en pacientes de UCI, inmunosuprimidos y pacientes con fibrosis quística[84,86].

Aunque la evidencia epidemiológica apunta a que las biopelículas son fuente de numerosas enfermedades infecciosas, los mecanismos exactos por los cuales los provocan son poco conocidos, algunos de ellos que podrían iniciar el proceso de la enfermedad son el desprendimiento de células o agregados celulares, la producción de endotoxinas, el aumento de la resistencia al sistema inmune del huésped y la provisión de un nicho para la generación de organismos resistentes. En este entorno, es necesario que los desinfectantes sean eficaces sobre las biopelículas y se apliquen procedimientos de control de infecciones para limitar el riesgo[87]. Hasta la fecha, la selección de desinfectantes para hospitales generalmente se ha basado en su actividad contra las bacterias planctónicas. Sin embargo, una selección adecuada de un desinfectante

debería depender de la actividad de este sobre biopelículas; es por ello que se vienen realizando múltiples estudios sobre la eficacia de desinfectantes en biopelículas[6, 77, 78, 82, 88-92].

El objetivo de este trabajo fué evaluar la eficacia de dos desinfectantes de uso hospitalario frente a biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* formadas sobre acero inoxidable que es un material encontrado universalmente en el entorno hospitalario porque es ampliamente utilizado para superficies y equipos[93].

Se evaluó la eficacia del desinfectante Dezavid® (cloruro de benzalconio 1 % y PHMB 9 %) y Supersafe-D® (amonio cuaternario de última generación 0,25 %); adicionalmente se demostró la eficacia de la lejía tradicional (1:20) (hipoclorito de sodio 0,30 %) como un desinfectante de uso común en los hospitales.

La norma española UNE-EN:2015 nos indica que para que un desinfectante sea efectivo este debe demostrar una reducción logarítmica ≥ 4 log (≥ 99,99 %)[94]. Al no existir un umbral logarítmico establecido de la reducción que debe alcanzarse para determinar la eficacia de los desinfectantes contra biopelículas, algunos estudios toman como referencia este parámetro[81], sin embargo se sabe que la resistencia de las biopelículas a los desinfectantes es mucho mayor que el de células planctónicas por los diferentes motivos que se ha venido explicando en el presente estudio, es por ello que se considera que una reducción de 2 o 3 logaritmos es significativo en la eficacia de los desinfectantes.

Para Dezavid® 0,05 % (cloruro de benzalconio 0,0005 % y PHMB 0,0045 %) en *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica tuvo una reducción

logarítmica de 2,28 log (99,47 %) y 2,33 log (99,53 %) respectivamente; y para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica fue de 1,06 log (91,26 %) y 1,07 log (91,48 %) respectivamente; en Dezavid® 0,10 % (cloruro de benzalconio 0,001 % y PHMB 0,009 %) en *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica tuvo una reducción de 3,91 log (99,99 %) y 3,95 log (99,99 %) respectivamente; y para *Pseudomonas aeruginosa* 2,15 log (99,28 %) y 2,20 log (99,36 %) respectivamente. En cuanto al desinfectante Dezavid® 1,00 % (cloruro de benzalconio 0,01 % y PHMB 0,09 %) y Supersafe-D® (amonio cuaternario de última generación 0,25 %) se obtuvo tanto en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* una reducción > 5 log (> 99,999 %). En el caso de lejía (1:20) (hipoclorito de sodio 0,30 %) encontramos una eficacia mayor que para Dezavid® 0,05 %; en *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica tuvo una reducción de 3,41 log (99,96 %) y 3,36 log (99,96 %) respectivamente; y para *Pseudomonas aeruginosa* 2,21 log (99,38 %) y 2,14 log (99,27 %) respectivamente.

En un estudio realizado por Smith k, *et al*. Determinaron la eficacia del desinfectante cloruro de benzalconio al 1 % en discos de acero inoxidable sobre biopeliculas de 8 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron una eficacia del desinfectante del 92-98 % y 30-96 % respectivamente[88]. A pesar de usar una concentración mayor de cloruro de benzalconio los resultados de eficacia son menores a los que obtuvimos en ambas bacterias, esto podría deberse a que el Dezavid® no sólo contiene cloruro de benzalconio sino también PHMB, estos desinfectantes que contienen una mezcla de QAC y otros desinfectantes aumentan su efectividad[95] y el Supersafe-D® contiene un

amonio cuaternario de última generación, la amplia variedad de estructuras químicas posibles con los QAC ha permitido un aumento continuo de la eficacia al tiempo que reduce costos y disminución de la toxicidad[89].

Cabeça T, *et al*. evaluaron la eficacia de los desinfectantes biguanida (0,50 %), compuestos de amonio cuaternario (0,50 %) e hipoclorito de sodio (1,50 %), en biopelículas de *Staphylococcus aureus* obteniendo una reducción logarítmica de 5,7 log con hipoclorito de sodio, 2,6 log con biguanida y 3,1 log con compuestos de amonio cuaternario. Estos datos muestran que el hipoclorito de sodio fue el más efectivo contra las biopeliculas de *Staphylococcus aureus*, mientras que el desinfectante de biguanida fue el menos efectivo[90]; los resultados que se obtuvieron en este estudio del hipoclorito de sodio fue una reducción logarítmica menor (3,39 log), debido a que se trabajó a una concentración menor (0,30 %). De igual forma en otro estudio en *Pseudomonas aeruginosa*, el hipoclorito de sodio a una concentración de 0,20 %, tiene una reducción de 4,90 log que es mayor a lo que se obtuvo en este estudio (2,21 log), habiendo utilizado una concentración menor; además lograron una reducción de 2,4 log para cloruro de benzalconio al 0,20 %[82].

Los resultados obtenidos en el presente estudio también difieren a los obtenidos por Tote K, *et al.* en la que la eficacia del hipoclorito de sodio 1 % fue mayor (99 %) que otros desinfectantes como cloruro de benzalconio al 0,08 % (84 %) y Clorhexidina digluconato (97 %) en biopeliculas de *Staphylococcus aureus*; de la misma forma en biopeliculas de *Pseudomonas aeruginosa* del hipoclorito de sodio 1 % tubo mayor eficacia (86 %) que otros desinfectantes como cloruro de

benzalconio 0,08% (86 %) y Clorhexidina digluconato 1,00 % (47 %)[91]. Además en este estudio no sólo evaluaron la viabilidad de las bacterias, sino también la eliminación de la matriz de la biopelícula demostrando que el hipoclorito de sodio destruye hasta 45 % de la matriz mientras que el cloruro de benzalconio y Clorhexidina digluconato 1,00 % (biguanidina) no tiene ninguna actividad sobre la misma. Este dato es muy importante puesto que si bien el Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D® tienen unan eficacia mayor a 99,999 % (5 log) sobre la viabilidad de las bacterias al ser ambos desinfectantes a base de amonio cuaternario y además una biguanidina en el caso de Dezavid® podrían no tener ningún efecto sobre la matriz de la biopelícula. Para eliminar la contaminación de la biopelícula, el microorganismo dentro de la biopelícula debe ser destruido y la estructura de la biopelícula debe ser removida de la superficie. Si un desinfectante solo mata a la bacteria pero deja la estructura de la biopelícula en su lugar, puede crear un nido al que otras bacterias pueden adherirse para crear una nueva biopelícula más rápidamente. Por otro lado, si un desinfectante elimina la biopelícula sin matar a la bacteria, liberará la bacteria planctónica, que contaminará el medio ambiente circundante[82, 91].

Es complejo comparar los resultados de estos diferentes estudios porque las condiciones para el desarrollo de la biopelícula, concentración de los desinfectantes, cepas clínicas resistentes y tiempos de exposición varían mucho; y estas diferencias pueden ser significativas[92].

VI. CONCLUSIONES

- Se optimizó un método para la formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* sobre discos de acero inoxidable.
- Se evaluó la reducción bacteriana para Dezavid® 0,05 % en *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica los cuales tuvieron una reducción logarítmica de 2,28 log (99,47 %) y 2,33 log (99,53 %) respectivamente; y para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica fue de 1,06 log (91,26 %) y 1,07 log (91,48 %) respectivamente; en Dezavid® 0,10 % para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica tuvo una reducción de 3,91 log (99,99 %) y 3,95 log (99,99 %) respectivamente; y para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica fue de 2,15 log (99,28 %) y 2,20 log (99,36 %) respectivamente. En cuanto al desinfectante Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D® se obtuvo tanto en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* una reducción > 5 log (> 99,999 %).
- Dezavid® 1,00 %; 0,10 % y Supersafe-D® fueron los desinfectantes con mayor eficacia para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica los desinfectantes con mayor eficacia fueron Dezavid® 1,00 % y Supersafe-D®.
- Lejía (1:20) tuvo igual eficacia que Dezavid® 1,00 %; 0,10 % y Supersafe-D® para *Staphylococcus aureus* ATCC y cepa clínica. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y cepa clínica la Lejía (1:20) tuvo igual eficacia que Dezavid® 0,10 %.

VII. RECOMENDACIONES

- Al observar las notables diferencias en la eficacia de los desinfectantes sobre células planctónicas y biopeliculas, es obvio que las actuales normas no son adecuadas para los microorganismos sésiles, lo que respalda la necesidad de una norma para evaluar la eficacia de los desinfectantes en las biopelículas.
- Los programas de limpieza y desinfección deben ser realizados por personal capacitado que entienda la importancia de los factores que afectan la acción de los desinfectantes debido a que la aparición de la resistencia de las biopelículas a los desinfectantes, entre otros podrían estar asociados con el mal uso y el uso excesivo de agentes antimicrobianos.
- Debe supervisarse periódicamente el sistema de limpieza y desinfección para verificar su eficacia.
- La investigación futura para la fabricación de desinfectantes debería centrarse en combinaciones sinérgicas que exploten aún más las propiedades antibiofilm de estos desinfectantes tanto en la viabilidad de las células como en la destrucción de la matriz.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardo D, Dennehy PH, Halverson P, Fishman N, Kohn M, Murphy CL, *et al*. Moving toward Elimination of Healthcare-Associated Infections: A Call to Action. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31(11): 1101-1105.
2. Hidalgo L, Marroquín J, Antigoni J, Samalvides F. Prevalencia de infecciones hospitalarias en un hospital peruano de nivel IV, en el año 2008. Revista Médica Herediana. 2011; 22(2): 5.
3. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, *et al*. Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc. 2018; 81(1): 7-11.
4. Donelli G, Vuotto C. Biofilm-based infections in long-term care facilities. Future Microbiol. 2014; 9(2):175-88.
5. Nazar J. Bacterial biofilms. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. 2007; 67: 61-72.
6. Nasar AM, Mostafa MS, Arnaout HH, Elshimy AAA. The effect of exposure to sub-inhibitory concentrations of hypochlorite and quaternary ammonium compounds on antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa. Am J Infect Control. 2018; 46 (7): 57-63.
7. Martin D, Denyer S, McDonnell G, Maillard J. Resistance and cross-resistance to oxidising agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. J Hosp Infect. 2008; 69(4): 377-383.

8. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. Biofouling. 2011; 27(9): 1017-1032.
9. Moreno IM. Resistance of pathogenic and spoilage microorganisms to disinfectants in the presence of organic matter and their residual effect on stainless steel and polypropylene. J Glob Antimicrob Resist. 2018; 14(23): 197-201.
10. Kouidhi B, Al Qurashi YM, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. Microb Pathog. 2015; 80(1): 39-49.
11. Sun Y, Chen S, Zhang C, Liu Y, Ma L, Zhang X. Effects of sub minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2008; 87(1): 235-241.
12. Kim JG, Yousef AE, Khadre MA. Ozone and its current and future application in the food industry. Adv Food Nutr Res. 2003; 45(1): 167-218.
13. Charlebois A, Jacques M, Boulianne M, Archambault M. Tolerance of Clostridium perfringens biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. Food Microbiol. 2017; 62(1): 32-38.
14. Adal KA, Farr BM. Central venous catheter-related infections: a review. Nutrition. 1996; 12(3): 208-213.

15. Hardy L, Cerca N, Jespers V, Vaneechoutte M. Bacterial biofilms in the vagina. Res Microbiol. 2017; 168(9-10): 865-874.
16. Betancourth M, Botero JE, Rivera SP. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia Médica. 2004; 35(3): 34-39.
17. Zhang X, Bishop P, Kupferle M. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. Water Sci Technol. 1998; 37(4): 345–348.
18. Sutherland IW. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. Trends Microbiol. 2001; 9(5):222-227.
19. Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Prog Nat Sci. 2008; 18(9): 1049-1056.
20. Maric S, Vranes J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. Period Bilogor. 2007; 109: 115-121.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284(5418): 1318-1322.
22. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. Int J Food Microbiol. 1998; 42(1-2): 9-27.
23. Tribedi P, Sil AK. Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas sp.* AKS2. J Appl Microbiol. 2014; 116(2): 295-303.
24. Fletcher M, Loeb GI. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonas* to solid surfaces. Appl Environ Microbiol. 1979; 37(1): 67-72.

25. Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. Appl Environ Microbiol. 1983; 45(3): 811-817.
26. Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, Zehnder AJ. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(11): 3973-3977.
27. Mckenney D, Hubner J, Muller E, Wang Y. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. Infect Immun. 1998; 66(10): 4711-4720.
28. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(4): 847-867.
29. Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. J Microbiol Exp. 2014; 1(3): 14-30.
30. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 1998; 280(5361): 295-298.
31. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. J Clin Invest. 2003; 112(9): 1291-1299.
32. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 2003; 57: 677-701.
33. Sutherland IW. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. Carbohydr Polym. 1999; 38(4): 319-328.
34. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu Rev Med. 2013; 64(1):175-188.

35. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2(2):114-122.
36. Martin KL, An YH. Basic equipment and microbiological techniques for studying bacterial adhesión. In: An YH, Friedman RJ. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications. Humana Press. Totowa: Humana Press; 2000. p. 103-120.
37. Frioni A, Natalizi T, Tendini M, Fraveto A, Pantanella F, Berlutti F, *et al*. Biotimer assay for counting bacterial biofilm. Biophys Bioeng Lett. 2010; 3(2): 862-871.
38. Christensen GD, Simpson WA, Anglen JO, Gainor BJ. Methods for evaluating attached bacteria and biofilms, In: An YH, Friedman RJ. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications. Humana Press. Totowa: Humana Press; 2000. p. 213-233.
39. Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. Comparison of three assays for the quantification of Candida biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. J Microbiol Methods. 2005; 63(3): 287-295.
40. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000; 40(2): 175-179.
41. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, *et al*. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. J Exp Med. 2005; 202(2): 209-215.

42. Plata K, Rosato AE, Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochim Pol. 2009; 56(4): 597-612.
43. Paganini M, Della PL, Muller BO, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, *et al*. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. Rev chil infectol. 2009; 26(5): 406-412.
44. Rodríguez AF, Carpinelli L. Frecuencia de genes que codifican factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurrieron al Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú, durante el año 2010. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2015; 13(1): 58-66.
45. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M. Regulatory mechanism for Exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2011; 79(4):1660-1670.
46. Vasil M, Farkasova Z, Eleckol J, Illek J, Zigo F. Comparison of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from sheep milk using three diagnostic methods. Pol J Vet Sci. 2017; 20(4): 795-801.
47. Castañón C. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Evid Med Invest Salud. 2012; 5(3): 79-84.
48. Ferreira H, Lala ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. Rev Panam Infectol. 2010; 12: 44-50.
49. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. 2009; 73(4): 338-344.

50. Luján DA. *Pseudomonas aeruginosa:* a dangerous adversary. Acta bioquím clín latinoam. 2014; 48 (4): 465-474.
51. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol. 2007; 10(6): 644-648.
52. Ochoa A, López FM, Escalona G, Cruz A. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. Bol Med Hosp Infant Mex. 2013; 70(2): 138-150.
53. Bruzaud J, Tarrade J, Celia E, Darmanin T, Givenchy ET, Guittard F, *et al*. The design of superhydrophobic stainless steel surfaces by controlling nanostructures: A key parameter to reduce the implantation of pathogenic bacteria. Mater Sci Eng. 2017; 73(1): 40-47.
54. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Arch Microbiol. 2014; 196 (7):453-472.
55. Organización Mundial de la Salud: Desinfectantes y antisépticos [Internet]. London: Royal Farmaceutical Society of Great Britain; 2014 [Citado 10 de junio del 2018]. Disponible en: http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/19.html
56. Instituto de Salud Pública. Guía general para la realización y presentación de ensayos de eficacia de productos desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico. Chile; 2014. 3.

57. Ministerio de salud. Manual de desinfección y esterilización hospitalaria. Lima. 2002. 36-43.
58. Sánchez L, Sáenz E. Antisépticos y desinfectantes. Dermatología Peruana. 2005; 15(2): 82-103
59. Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE. Synergism within polyhexamethylene biguanide biocide formulations. J Appl Bacteriol. 1990; 69(4): 593-598.
60. McDonnell G, Denver AR. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1): 147-179.
61. Moore LE, Ledder RG, Gilbert P, McBain AJ. In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(15): 4825-4834.
62. Ison S, Beattie M. Disinfection, sterilization, and preservation. 5th ed. USA: Lippincott Williams Wilkins; 2001.
63. McDonnell GE. Antisepsis, disinfection, and sterilization: Types, Action and Resistance. 1st ed. Washington: ASM Press; 2007.
64. Presentación del producto DEZAVID+ - DEZAVID+ [Internet]. Sites.google.com. 2017 [citado 11 Noviembre 2017]. Disponible en: https://sites.google.com/a/corpadler.com/dezavid/project-definition
65. SUPERSAFE D – Desinfectante de superficies - ROKER [Internet]. ROKER. 2017 [citado 08 Octubre 2017]. Disponible en: http://roker.com.pe/web/productos-roker-peru/roker-peru-productos-de-la-linea-horeca/supersafe-d-desinfectante-de-superficies/

66. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: INS - MINSA; 2005. 31-35.
67. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
68. Núñez MJ. Detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia antibacteriana en niños portadores asintomáticos de Pachuca, Hidalgo. [Tesina Médico Cirujano]. México: Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2007.
69. Forsythe SJ. Alimentos seguros: Microbiología. Zaragoza: Editorial Acribia S. A; 2000.
70. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott: diagnóstico microbiológico. 12th ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2009.
71. Pfaller M, Murray P, Rosenthal K. Microbiología Médica. Madrid: Editorial Elsevier S.A.; 2006.
72. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. 5th ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 1997.
73. Mendo M. Medios de cultivo en microbiología. 6th ed. Lima: Ebisa ediciones; 2014.
74. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulasa negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989; 42(8): 872-874.

75. Christensen GD, Baddour LM, Simpson WA. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. Infect Immun. 1987; 55(12): 2870-2877.
76. Amalaradjou M, Norris C, Venkitanarayanan K. Effect of Octenidine Hydrochloride on Planktonic Cells and Biofilms of Listeria monocytogenes. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(12): 4089-4092.
77. Park SH, Cheon HL, Park KH, Chung MS, Choi SH, Ryu S, *et al*. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. Int J Food Microbiol. 2012; 154(3):130-131.
78. Wirtanen G, Salo S, Helander I, Mattila-Sandholm T. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. Colloids Surf B Biointerfaces. 2001; 20(1):37-50.
79. Association of Official Analytical Chemists. AOAC 961.02: Germicidal Spray Products as Disinfectants. AOAC; 1995.
80. Toro DR. Manual para la introducción al laboratorio de microbiología. Manizales: Editorial Universidad de Caldas; 2005.
81. Burguet N, Brito L y Cánovas I. Evaluation of the effectiveness of a disinfectant through the contact plate method. Rev Cubana Farm. 2013; 47(2): 185-192.
82. Marchand P, Desrosiers D, Côté A, Touchette M, Mamouret N. Comparative study on the efficacy of disinfectants against bacterial contamination caused by biofilm. Can J Infect Dis. 2017; 32(4): 193-198.

83. Dongari B. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6(2): 201-208.
84. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. Int J Artif Organs. 2005; 28(11):1062-1068.
85. Clinical Infection Diseases. Manual of clinical microbiology. Washington: Editorial American society for microbiology; 2007. 153.
86. Vinogradov E, Sadovskaya I, Li J, Jabbouri S. Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. Carbohydr Res. 2006; 341(6): 738-743.
87. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol. 2007; 10(6): 644-648.
88. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J Med Microbiol. 2008; 57(8):966-973.
89. Moore LE, Ledder RG, Gilbert P, McBain AJ. In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(15):4825–4834.
90. Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Activity of disinfectants against foodborne pathogens in suspension and adhered to stainless steel surfaces. Braz J Microbiol. 2012; 43(3):1112-9.
91. Tote K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of

Staphylococcus aureus and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 2010; 76(10): 3135-3142.

92. Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. Alim Nutr Rev. 2006; 17(2): 121–125.
93. Donlan RM, Costernon JW. Biofilms: survival Mechanisms of Clinically Relevant Microoganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167-193.
94. Norma Española. UNE-EN 13697: Antisépticos y desinfectantes químicos. Madrid: AENOR; 2015.
95. Gerba CP. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. Appl Environ Microbiol. 2015; 81(2): 464-469.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Ficha técnica de Dezavid®

DEZAVID+

INFORME TÉCNICO DEL PRODUCTO

DEZAVID+

TU 9392-002-49340960-2007

Fabricante

ADEQUATE TECHNOLOGIES

Adequate Technologies Co., LTD.
Rusia, 121170, Moscú, Kutuzovsky pr., 36-3
Tel/fax: 495-933-73-27
E-mail: adetech@df.ru http:\\www.dezavid.ru

Importador

Corporación Adler SAC
RUC 20518997689
Av. La Molina 648 of. 305
La Molina, Lima – Perú
E-mail: corporacionadler@corpadler.com

Descripción:

DEZAVID+ es un producto-microbicida universal de nueva generación altamente eficiente sobre la base del polímero soluble en agua (PGMG) y de la combinación del amonio cuaternario (QAS), especialmente formulado para el proceso de la desinfección, limpieza previa a esterilización y esterilización química en el campo médico y desinfección de superficies en general. Su composición especial asegura una efectiva y eficaz acción microbicida contra todo tipo de gérmenes que originan enfermedades infecciosas. Inofensivo para la salud humana, medio ambiente y materiales tratados. 100% ecológico.

Composición:

CLORHIDRATO DE POLIHEXAMETILENO GUANIDINA (PGMG)	9,0%
CLORURO DE ALQUIL DIMETILBENCILAMONIO (QAS)	1,0%
AGUA POTABLE	90,0%

Propiedades:

- Actividad bactericida contra bacterias G+ y G-.
- Actividad micobactericida (tuberculosis).
- Actividad virucida (incluido infecciones respiratorias agudas, herpes, poliomielitis, hepatitis de todo tipo (incluido A, B y C), VIH, adenovirus).
- Actividad fungicida (incluida candidiasis, dermatofitosis, moho).
- Actividad esporicida.
- Efectivo contra gérmenes que causan infecciones intrahospitalarias.
- Efectivo contra gérmenes que causan infecciones altamente peligrosas como cólera, peste, carbunco.
- Proporciona un efecto prolongado en todo tipo de superficies.
- No fija la suciedad orgánica.
- Eficiente en bajas concentraciones de soluciones del producto.
- Eficiente en tiempo mínimo de exposición.
- No contiene componentes tóxicos (cloro, fenol, aldehídos).

DEZAVID

INFORME TÉCNICO DEL PRODUCTO

- Inofensivo para las personas que trabajan con el producto o para aquellas que están presentes en los procesos de desinfección.
- No es obligatoria la protección especial durante su aplicación.
- No es corrosivo, no daña, no afecta ningún material tratado.
- No afecta ni daña el medio ambiente.
- Uso universal.
- Fácil de aplicar.
- Mantiene sus propiedades al ser congelado y descongelado.
- Periodo largo de almacenamiento: 3 años.
- Económico.

Datos técnicos:

Aspecto:	**Liquido transparente incoloro o de color amarillento. Durante su almacenamiento pueden presentarse pequeños sedimentos en el producto.**
Densidad:	**1 g/cm^3 (Igual a H_2O)**
Solubilidad en H_2O:	**100%**
pH de la solución al 1%:	**6,0+-1.0**
Peso unitario:	**9.81 kN/m^3 (Igual a H_2O)**
Punto de ebullición:	**100 ^{0}C (Igual a H_2O)**
Punto de congelamiento:	**0 ^{0}C (Igual a H_2O)**

Aplicación:

- Esterilización química de materiales e instrumental médico y odontológico (incluido termosensibles).
- Desinfección profiláctica, corriente y final.
- Desinfección de instalaciones y equipos médicos (incluido los equipos de anestesia, incubadoras).
- Desinfección de instrumentos quirúrgicos y odontológicos.
- Desinfección de materiales médicos y odontológicos.
- Desinfección de alto nivel de endoscopios y sus instrumentos.
- Desinfección (incluida la desinfección combinada con la limpieza previa a esterilización (método manual y mecanizado) de materiales e instrumental médico y odontológico.
- Limpieza previa a esterilización y limpieza final de materiales e instrumental médico y odontológico
- Desinfección y limpieza de superficies en general (pisos, paredes, muebles) en hospitales y centros de salud.
- Desinfección de desechos médicos y restos de comida.
- Desinfección de artefactos para el cuidado de pacientes.
- Desinfección de tapices y alfombras.
- Desinfección de juguetes.
- Desinfección de ropa.
- Desinfección de material de limpieza.
- Desinfección de vajilla de comedor, laboratorio y farmacia.
- Desinfección y limpieza en general (superficies, instalaciones y equipos incluido los que tienen contacto con alimentos) en lugares públicos.
- Desinfección profiláctica contra hongos de calzado en general.
- Desinfección de transporte.
- Desinfección, limpieza y desodoración de contenedores, compactadores y recolectores de basura.
- Desinfección de baños portátiles.
- Desinfección de equipos de ventilación y aire acondicionado.
- Desinfección del aire.
- Desinfección de los objetos de veterinaria.
- Desinfección de material biológico (sangre y excreciones biológicas).

DEZAVID+

INFORME TÉCNICO DEL PRODUCTO

Para ser usado en:

- En todas las áreas de hospitales, clínicas, consultorios médicos en general (incluido laboratorios de diagnostico clínico, laboratorio bacteriológico, departamento de neonatología, casas de maternidad e incubadoras, bancos de sangre, centros de transfusión de sangre y toma de sangre).
- Establecimientos para el cuidado infantil (pre-escolares, escolares y otros centros educativos).
- Centros penitenciarios.
- Lugares de servicio público como hoteles, albergues, restaurantes, mercados, tiendas, lavanderías, piscinas, saunas, baños públicos, peluquerías, salones de masajes, salones de belleza, clubs y otros.
- Unidades de transporte.

Modo de empleo:

Véase la información detallada sobre la aplicación, regímenes y objetos de limpieza, desinfección y esterilización en los siguientes manuales:

- Instrucción № DP-01/08 de 20.02.2008 de aplicación del producto "DEZAVID+" para la limpieza previa a esterilización, desinfección y esterilización (Adequate Technologies Co., LTD).
- Instrucción № DP-02/08 de 20.02.2008 de aplicación del producto "DEZAVID+" para la desinfección de material biológico (Adequate Technologies Co., LTD).

Modo de actuación sobre el agente biológico:

Todos los microorganismos patógenos (bacterias, virus, hongos) tienen la carga negativa en la superficie de sus membranas. El principal componente de DEZAVID+, Clorhidrato de polihexametileno guanidina (PGMG), es un polímero con carga positiva (catión). Por la diferencia de la carga eléctrica surge el efecto magnético entre el microorganismo y la molécula del polímero. Moléculas del polímero se acercan al microorganismo y envuelven su célula formando una película muy fina e impenetrable e impidiendo el acceso de oxigeno, sustancias alimenticias e intercambio de metabolitos a través de la membrana. El microorganismo trata de liberarse de la película y dentro de su célula se genera un aumento de presión lo que conlleva a que su membrana se adelgace, facilitando de esta manera el acceso del segundo componente activo (QAS). Macromolécula de esta sustancia penetra la membrana de la célula, se liga con los fosfolípidos y proteínas de la membrana celular, bloquea los fermentos y provoca el deterioro irreversible de la estructura de la célula a nivel de membrana, núcleo, citoplasma. Ese proceso determina la perdida de las propiedades patógenas y la muerte del microorganismo.

Precauciones y advertencias:

Diluir según el manual de instrucciones. Uso externo. Durante la preparación de las soluciones evitar el contacto del producto con los ojos y la piel. No ingerir. La desinfección por el método de frotamiento se puede realizar en presencia de pacientes y no requiere protección individual; la desinfección por el método de rociamiento se recomienda realizar en la ausencia de pacientes y con protección respiratoria individual. Al terminar el trabajo lavar la cara y las manos con jabón.

"NO COMBINAR CON NINGUN PRODUCTO DE LIMPIEZA".

DEZAVID

INFORME TÉCNICO DEL PRODUCTO

Almacenamiento y transporte:

Transportar en cualquier tipo de vehículo cerrado con la finalidad de garantizar la integridad del envase del producto. Almacenar en un lugar seco y oscuro, en envase del fabricante con temperatura entre 0 ^{0}C y +40 ^{0}C. Evitar la exposición prolongada al sol y contacto con objetos calientes. Mantener fuera del alcance de los niños. Plazo de validez del producto en el envase sellado es de 3 años, plazo de validez de las soluciones del producto es de 14 días.

Medidas de protección:

- Protección personal: No es obligatoria. Es posible usar las gafas protectoras.
- Protección para el medio ambiente: Eliminación simple mecánica; no existe peligro para el medio ambiente.

Envase:

- Botella de polietileno (PEHD) de 1 litro.
- Código de barra: 46069340003364

PRODUCTO ORIGINAL RUSO

Ac

ANEXO 2

Etiqueta de Supersafe-D®



ANEXO 3

Ficha técnica de Lejía Tradicional

HIGIENE Y LIMPIEZA S.R.L.

FABRICACIÓN DE PRODUCTOS DE LIMPIEZA – FERRETERIA
DISTRIBUCION EXCLUSIVO DE SAPOLIO-PROCTER & GAMBLE KIMBERLY- CLARK
JHONSONS - TEKNO

ALTA CALIDAD EN LIMPEZA

DOCUMENTO: FICHA TECNICA

PRODUCTO: LEJIA TRADICIONAL HI LIMP

DESCRIPCION:

Solución acuosa de Hipoclorito de sodio, potente liberadora de oxigeno por lo que es un buen agente de desinfección, blanqueo y desodorización.

Fórmula Cuantitativa:

NOMBRE DEL COMPONENTE	PORCENTAJE (%p/p)
HIPOCLORITO DE SODIO	*5.80*
AGUA DESIONIZADA	*94.20*
	100 %

CARACTERISTICAS:

Aspecto:	Líquido
Color:	Ligeramente amarillo
Densidad a 25°C:	1.08 – 1.10 gr/ml
Concentración:	5.80 +- 0.2

PROPIEDADES:

- Es un excelente germicida usado para fines de desinfección.
- Para desodorizar lugares de acumulación de basura y deshechos.

MODO DE EMPLEO:

- Usar un recipiente limpio para realizar la dilución.
- Para desinfectar baños, fregaderos, pisos: Utilizar Lejía Tradicional HI LIMP pura o ligeramente diluida en agua en proporción 1:20 (una taza diluir en 4 litros de agua), dejar actuar 5 minutos y enjuagar con agua.

PRECAUCIONES:

- Irritante para la piel y ojos, si hay contacto lavar con abundante agua por 15 minutos. En caso de ingestión acudir al médico llevando este envase.

Av. Paseo de La República 1040 – 1044 Santa Beatriz – Lima 01

Telf.: 265-4101 / 471-2789 / RPM: #943108464 / Entel: 83*5768 / 831*6684

- No mezclar con ácidos, ni bases como soda caustica o amoniaco.
- El cloro tiende a descomponerse al exponerse al calor y al contacto con algunos metales contaminados. Se requiere almacenarse en lugares frescos y secos.

PRESENTACIÓN:

- Cilindros x 55 Galones (de material plástico PVC)
- Bidón x 5 galones (de material plástico PVC)
- Galón x 4 Litros (de material plástico PET, Tereftalato de polietileno)
- Frascos x 1 Litro (de material plástico PET, Tereftalato de polietileno)

Una vez usado el producto deseche los envases, incinerar en plantas autorizadas.

FABRICADO POR:

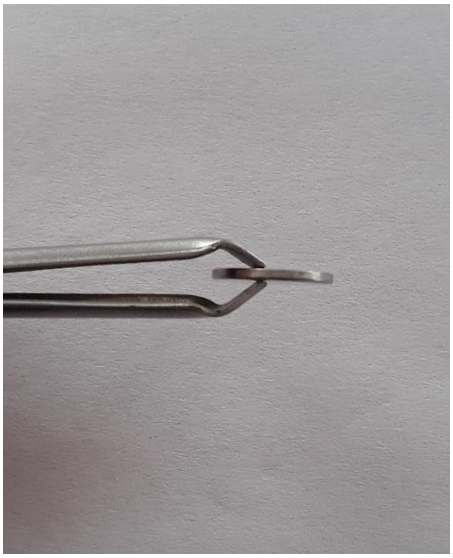
HIGIENE Y LIMPIEZA S.R.Ltda.

Av. Paseo de la Republica 1040 – Lima TELEF. 265-4101

ANEXO 4

Discos de acero inoxidable de 1 cm de diámetro y 1 mm de espesor grado médico pulido 304





ANEXO 5

Recuento total de colonias de *Staphylococcus aureus*

Desinfectante	Concentración	BACTERIA	ensayo	DILUCIONES															
		Staphylococcus aureus		DIRECTO		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}	
Leiía	(1:20)	ATCC	1	+300	+300	160	155	32	33	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	170	169	35	35	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	163	168	38	34	5	8	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	+300	+300	154	161	40	44	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	165	155	42	42	9	7	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	159	158	45	46	12	9	0	0	0	0	0	0	0	0
Supersafe-D®	DIRECTO	ATCC	1	4	5	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	3	4	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	3	3	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	5	3	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	4	6	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	5	2	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Dezavid®	0,05 %	ATCC	1	+300	+300	285	284	154	157	45	57	8	8	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	288	287	159	156	46	46	8	9	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	289	291	155	156	45	43	10	9	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	+300	+300	290	293	159	159	48	49	11	11	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	290	289	168	160	47	48	9	10	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	290	289	161	160	45	47	11	10	0	0	0	0	0	0
	0,10 %	ATCC	1	287	288	111	110	22	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	288	291	109	112	19	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	290	289	110	109	24	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	289	293	114	113	22	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	293	295	111	113	25	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	295	295	112	109	23	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,00 %	ATCC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO 6

Recuento total de colonias de *Pseudomonas aeruginosa*

Desinfectante	Concentración	BACTERIA	ensayo	DILUCIONES															
		Pseudomonas aeruginosa		DIRECTO		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}	
Leiía	(1:20)	ATCC	1	+300	+300	170	174	40	38	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	180	173	38	39	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	175	181	51	51	7	9	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	+300	+300	190	181	65	64	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	195	185	55	59	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	189	193	47	48	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Supersafe-D®	DIRECTO	ATCC	1	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dezavid®	0,05 %	ATCC	1	+300	+300	+300	+300	287	289	62	65	12	15	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	+300	+300	295	299	60	59	18	20	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	+300	+300	280	275	59	58	15	17	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	+300	+300	+300	+300	285	288	66	62	17	16	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	+300	+300	290	291	64	65	17	15	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	+300	+300	290	287	68	70	14	13	0	0	0	0	0	0
	0,10 %	ATCC	1	+300	+300	190	189	45	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	185	184	50	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	188	188	48	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	+300	+300	191	195	49	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	+300	+300	189	187	47	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	+300	+300	193	193	48	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,00 %	ATCC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		CLINICA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0