

Especialización en Esterilización
Trabajo Final Integrador

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE DIFERENTES DETERGENTES EN LA REMOCIÓN DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS

Alumno: Natalia Belén Scalzadona

Tutores: Dra. María Cecilia Becerra

Farm. Esp. Fernando González

Año: 2019

Integrantes de tribunal evaluador:

⇒ Dra. Virginia Aiassa

⇒ Dra. Fabiana Alovero

⇒ Farm. Esp. Valeria Capra

“No hagan nada por rivalidad o por orgullo, sino con humildad, y que cada uno considere a los demás como mejores que él mismo. Ninguno busque únicamente su propio bien, sino también el bien de los otros.”

La Biblia

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada una de las personas que formaron parte e hicieron posible que esté finalizando esta etapa de mi vida.

Gracias a la Institución, Facultad de Ciencias Químicas (UNC), principalmente por mi formación de grado pero también por generar este espacio, la Especialización en Esterilización, que me permitió continuar capacitándome.

Gracias a los profesores que nos dedicaron su tiempo y conocimiento, particularmente a aquellos que nos recibieron en su lugar de trabajo y nos permitieron hacer las prácticas allí.

Gracias a mis nueve compañeros. Risas, chistes, dudas, momentos difíciles, aliento, casamientos, nacimientos, consejos, experiencia, quejas, magdalenas, meriendas, burlas, ayuda, whatsapp; son las palabras que se me vienen a la mente cuando miro para atrás y recorro este camino que transitamos juntos. Particularmente, gracias Juan por insistirme y convencerme de que nos inscribamos y por no dejar que afloje; gracias Claudia por ser mi apoyo y aliento en este último tirón, fundamental para terminar a tiempo.

Gracias a todos los que contribuyeron de alguna forma con este trabajo: las chicas de la Central de Esterilización del Hospital Aeronáutico Córdoba, Farm. Esp. Valeria Anchorena, Farm. Esp. Matías Pérez Cabral, Lectus S.A., por aportar material; Farm. Esp. Fernando González y Dra. María Cecilia Becerra por el tiempo y el conocimiento primordiales para realizar este trabajo. Especialmente, gracias Ceci porque sin tu empuje, tus mensajes, tus llamados, tus límites, seguramente no estaría terminando hoy, gracias por restarle tiempo a todas tus responsabilidades para dármele a mí, aunque no siempre lo demostré lo valoré mucho.

Por último y lo más importante para mí gracias a: mi familia amada, mis padres que siempre me inculcaron el valor del estudio e incentivaron a ir por más, Emi que me tuvo paciencia y alentó a seguir desde que éramos novios hasta hoy que es mi esposo y podemos compartir este logro juntos, y a Dios que pone tanto el querer como el hacer en mí.

CONTENIDO

I. RESUMEN	5
II. ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Limpieza.....	7
1.1.1. Lavado.....	8
1.2. Infecciones intrahospitalarias	12
1.2.1. Biopelículas	13
1.3. Generalidades.....	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano	18
3.2. Ensayo de la eficacia de los detergentes en cultivos planctónicos	18
3.2.1. Preparación de Detergentes	18
3.2.2. Preparación de Neutralizante	19
3.2.3. Preparación del Inóculo	19
3.2.4. Ensayo con Detergentes	20
3.2.5. Ensayo con Detergentes y Neutralizante.....	20
3.3. Ensayo de la eficacia de los detergentes en biopelículas	20
3.3.1. Preparación de Detergentes	20
3.3.2. Preparación del Inóculo	20
3.3.3. Ensayo con Detergentes	20
3.4. Análisis estadístico.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Ensayo de la eficacia de los detergentes en cultivos planctónicos.....	23
4.2. Ensayo de la eficacia de los detergentes en biopelículas	23
4.2.1. Cuantificación de la masa de biopelícula con la tinción con CV ...	23
4.2.2. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT	25
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES	30
7. GLOSARIO	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33
9. ANEXOS	36

I. RESUMEN

Las infecciones hospitalarias son una problemática actual, más aún en la última década en que se ha hecho énfasis en la presencia de biopelículas directamente relacionadas a estas infecciones. Debido a la posible presencia de biopelículas en instrumental y/o material procesado dentro de la Central de Esterilización es que se debe poner especial atención en la correcta realización del lavado, particularmente en la eficacia que exhibe el detergente utilizado. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de detergentes enzimáticos y no enzimáticos frente a cultivos planctónicos y biopelículas bacterianas.

Se evaluó la eficacia de cinco detergentes, tres trienzimáticos (D 1, D 2, D 3), un pentaenzimático (D 4) y un no enzimático (D 5), frente a cepas clínicas y cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los ensayos se realizaron tanto en bacterias en suspensión como en biopelículas. La concentración, el tiempo de exposición y la temperatura utilizados fueron los indicados para cada detergente según lo especificado por el fabricante. Para evaluar la eficacia de los detergentes en bacterias en suspensión se efectuaron cultivos y posterior recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). La cuantificación de la biomasa se realizó mediante tinción con cristal violeta y se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de XTT a dos tiempos de contacto con los detergentes.

Se pudo observar que los detergentes que inhibieron en mayor proporción el crecimiento de bacterias en suspensión fueron D 3 y D 5. Ninguno de los detergentes probados logró erradicar las biopelículas. Hubo una significativa disminución de la viabilidad celular, siendo D 5 el único que la redujo por completo. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular cuando se compararon los dos tiempos de contacto con cada detergente.

Si bien todos los detergentes probados disminuyeron la viabilidad celular, ninguno erradicó biopelículas, lo que puede generar una futura acumulación en sectores difíciles de friccionar. Es por esto que, la limpieza debe ser realizada correctamente evitando así la formación de biopelículas, teniendo como objetivo garantizar la seguridad del paciente.

II. ABREVIATURAS

ATS: Agar Tripteína Soya

BFS: Buffer Fosfato Salino

CE: Central de Esterilización

CTS: Caldo Tripteína Soya

CV: Cristal Violeta

DO: Densidad Óptica

EPS: Exopolisacáridos

IH: Infecciones Hospitalarias

OMS: Organización Mundial de la Salud

PMS: Meta sulfato de fenazina

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

VIHDA: Programa Nacional de Epidemiología y Control de Infecciones Hospitalarias

XTT: 2,3 bis (2 metoxi-4-nitro-5 sulfofenil) 2H tetrazolio, 5 carboxanilida

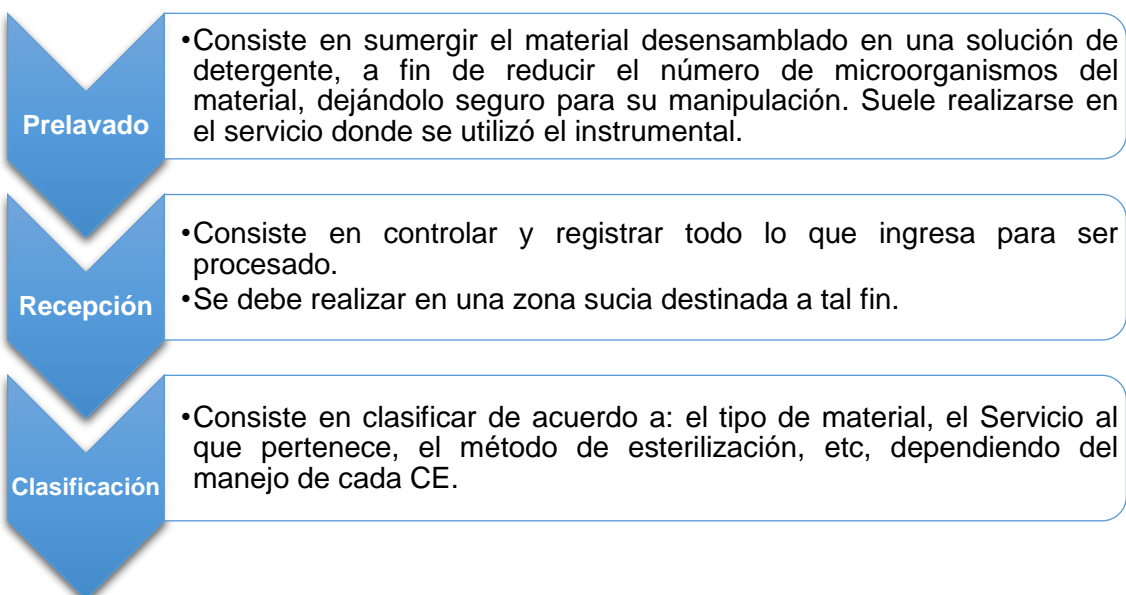
1. INTRODUCCIÓN

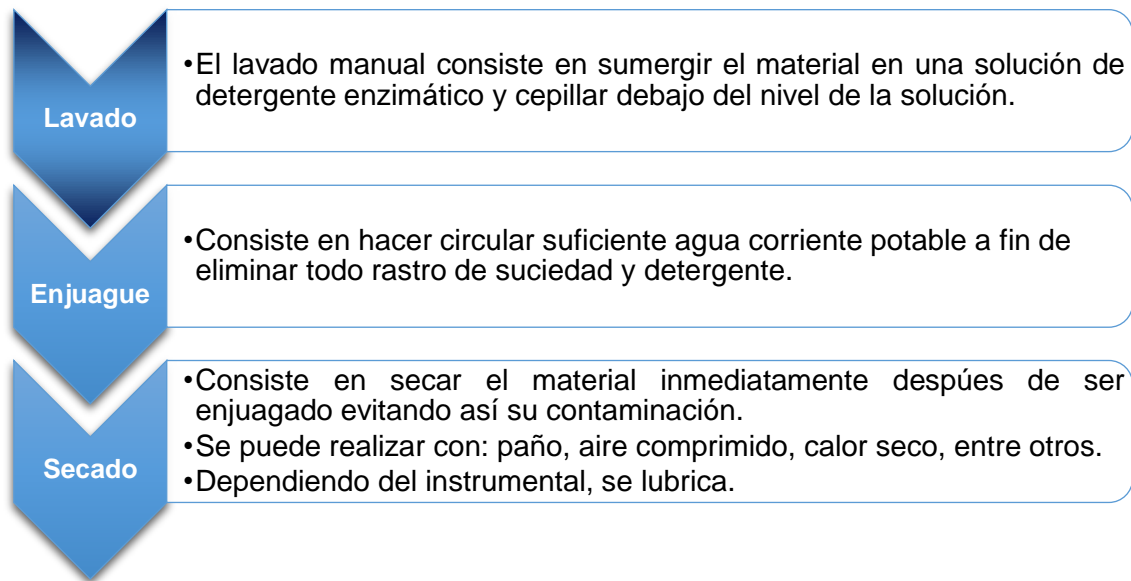
La Central de Esterilización (CE), por definición, es el servicio que recibe, acondiciona, procesa, controla y distribuye textiles (ropa, gasas, apósitos), equipamiento biomédico e instrumental a todos los sectores del hospital, (1) su misión es proporcionar a todos los servicios y unidades el material o equipamiento en las condiciones idóneas de esterilidad en tiempo y coste adecuados, (2) como así también garantizar la seguridad de los mismos tanto para el operador como para el paciente. (1) Para lograr este objetivo, se llevan a cabo procesos de: limpieza-desinfección o limpieza-esterilización; los cuales forman parte de los requisitos fundamentales para el control de infecciones y están orientados a la reducción de la transmisión en los centros de salud.(3) (4)

1.1. Limpieza

La limpieza, entendiéndose por ésta a la eliminación física de materia orgánica de los objetos, es el paso esencial y más importante en la CE,(2) ya que precede a los procesos de desinfección o esterilización y de ella depende la eficacia de los mismos. Esto es así, debido a que la suciedad actúa protegiendo a los microorganismos del contacto con agentes desinfectantes y esterilizantes.

Los pasos que comprenden la limpieza de los materiales son los siguientes (1):





1.1.1. Lavado

El lavado propiamente dicho es el determinante del éxito ya que es el eje central de la limpieza. Actualmente, existen tres tipos de lavado:

- i. Manual, realizado de manera directa por el operador aplicando fricción sobre el material;
- ii. Mecánico, que es llevado a cabo de manera automatizada mediante lavadoras con acción física y química;
- iii. Por ultrasonido, que forma parte del lavado mecánico pero, a diferencia del anterior, utiliza la energía eléctrica para generar burbujas y vibraciones que facilitan la remoción de la suciedad.(3)

El lavado manual, el más común por ser el más accesible en nuestro país, debe ser realizado utilizando protección individual (Figura 1), a fin de evitar accidentes punzo cortantes, tal y como lo indica la Resolución 1547/2007 del Ministerio de Salud de la Nación.(5) Éste debe ser realizado según los pasos mencionados en la Figura 2.



Figura 1. Elementos de protección individual.

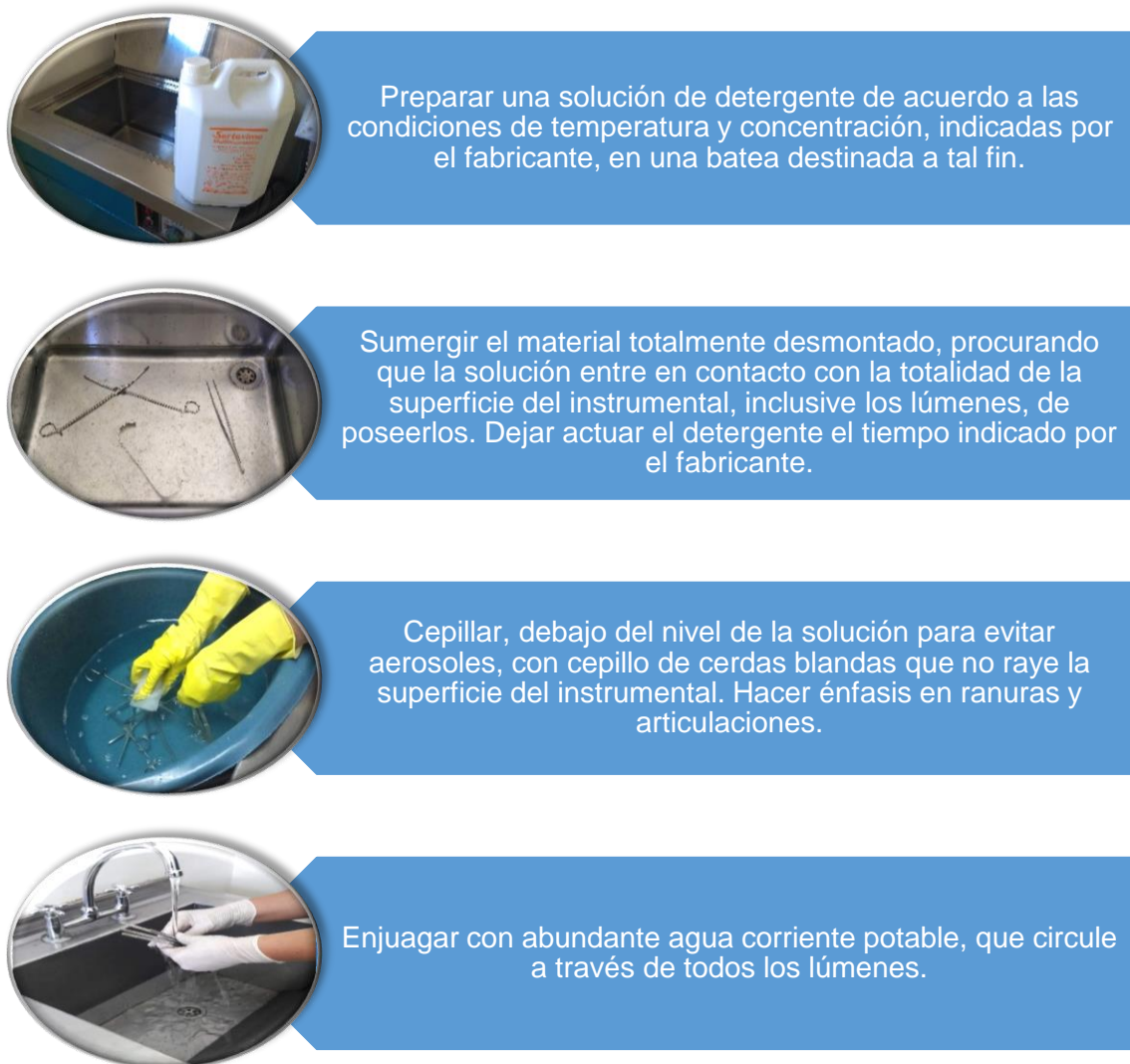


Figura 2. Pasos para realizar Lavado Manual.

Los principales factores involucrados en el lavado son la energía mecánica, térmica y química, de acuerdo al tipo de lavado que se realice puede destacarse uno más que otro. La energía mecánica está dada por la fricción, cepillado, cavitación, entre otras; depende del operador o de la máquina que se utilice para el lavado. La energía térmica está determinada por la temperatura a la que se encuentra el agua, si ésta se encuentra caliente (entre 35° y 40°C) mejora las propiedades de dilución. Por último, la energía química está relacionada con las características del detergente que se utilice.(1)(3)

1.1.1.1. Detergentes

Los detergentes son sustancias que limpian químicamente (6), compuestos de un agente tensioactivo y sustancias auxiliares tales como enzimas, estabilizadores, secuestrantes, entre otras. El primero está formado por moléculas anfifílicas, es decir que poseen una estructura molecular con un grupo polar o hidrofílico y otro grupo apolar o hidrofóbico. Esto le confiere la capacidad de disminuir la tensión superficial y así lograr desprender la suciedad de la superficie sobre la que se utilice, para luego dispersarla en el líquido de lavado. De acuerdo al carácter del extremo hidrófilo, las moléculas tensioactivas se clasifican en iónicas, no iónicas y anfóteras.(7) Por otro lado, según las sustancias auxiliares utilizadas existen otras clasificaciones, entre ellas, la que indica si contienen enzimas en su composición. La Resolución 1547/2007 del Ministerio de Salud de la Nación expresa que el lavado, para que sea eficiente, debe ser realizado utilizando detergentes enzimáticos formulados para uso médico aprobados por la autoridad sanitaria competente.(5)

Los detergentes enzimáticos están formulados a base de tensioactivos no iónicos y enzimas, principalmente. Esto es así, debido a que los tensioactivos no iónicos no liberan iones en soluciones acuosas, lo que facilita las formulaciones complejas. Por otra parte, son utilizados en el campo de la salud gracias al bajo nivel de toxicidad que algunos poseen. Además, al no tener carga, exhiben la ventaja de ser menos sensibles a los electrolitos, lo que permite que sean utilizados en presencia de salinidad alta o aguas duras.(7)

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, son moléculas de naturaleza proteica capaces de acelerar una reacción química específica. Su especificidad es posible debido a la estructura de estas proteínas, de manera que actúan sobre una determinada sustancia denominada sustrato. Luego de transformar al sustrato, las enzimas quedan libres, permaneciendo inalteradas y disponibles para unirse a uno nuevo (Figura 3) (8).



Figura 3. Actividad catalítica de una enzima. La enzima se une al sustrato formando un complejo, para dar origen a un producto. La enzima, a su vez, se separa del sustrato en forma inalterada.

La actividad de una enzima depende de la temperatura, el pH y la concentración de sustrato. La temperatura óptima es de 35 a 40°C, por encima de ésta la enzima se desnaturaliza y por debajo no posee actividad. Un efecto similar ocurre con cambios extremos en el pH.(8) Las enzimas normalmente utilizadas en la fabricación de detergentes, de acuerdo al tipo específico de reacción que catalizan, son de la clase hidrolasas. De éstas, se destacan: lipasas, catalizan la reacción de triacilglicerol y agua para producir diacilglicerol y un anión de ácido graso;(9) proteasas, catalizan la escisión interna de péptidos o proteínas;(10) amilasas, que escinden almidón, glucógeno y alfa-1,4-glucanos;(11) y celulasas, catalizan la escisión de enlaces 1,4-beta-glucosídicos en celulosa, liquenina y beta-glucanos de cereales.(12)

En la actualidad, el mercado argentino cuenta con distintas formulaciones de detergentes enzimáticos, destacándose los trienzimáticos y pentaenzimáticos. Los detergentes trienzimáticos están formados por proteasa, amilasa y lipasa, estas enzimas facilitan la degradación de la materia orgánica, confiriéndole así su principal indicación: el lavado de instrumental quirúrgico. Por otro lado, los detergentes pentaenzimáticos están constituidos por amilasa, lipasa, dos proteasas complementarias que actúan sobre distintos sustratos y celulasa que degrada sustratos de tipo celulósico que ocasionalmente pueden encontrarse en el contenido intestinal, es por esto que está indicado para el lavado de instrumental quirúrgico, de diagnóstico de gastroenterología, o que pudiera estar en contacto con el contenido intestinal.(13)

1.2. Infecciones hospitalarias

Como se mencionó anteriormente, el objetivo del lavado es eliminar la suciedad reduciendo así la carga microbiana y lograr la desinfección o esterilidad deseada.(1) Esta carga microbiana está compuesta en gran parte por bacterias, las cuales son la principal causa de infecciones hospitalarias (IH). La Organización Mundial de la Salud (OMS) expresa que “en todo momento, más de 1,4 millones de personas en el mundo contraen infecciones en el hospital”.(14) Se entiende como IH a “toda infección adquirida durante la internación y que no estuviese presente o incubándose al momento de la admisión del paciente, o bien en el caso de un recién nacido, cuando ésta fuese adquirida durante su pasaje a través del canal del parto. En el caso de las heridas quirúrgicas, la infección puede manifestarse luego del alta del paciente, hasta 30 días o un año dependiendo de la colocación o no de prótesis.”(15) Según un reporte del Programa Nacional de Epidemiología y Control de Infecciones Hospitalarias (VIHDA) República Argentina, los microorganismos que producen con mayor frecuencia IH dependen de la localización de la infección. Así, en las bacteriemias asociadas a las infecciones por catéteres se destacan: *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras; en neumonías asociadas a respirador: *S. aureus*, *Acinetobacter spp.*, entre otras; y en las infecciones de tracto urinario asociadas a sonda vesical: *E. coli*, *K. pneumoniae*, entre otras.(16) Debido a que *S. aureus* y *E. coli* forman parte de los microorganismos más frecuentes asociados a IH en Argentina, es que han sido utilizados en este estudio.

E. coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, con forma de bacilo, que se encuentra comúnmente en la parte distal del intestino de seres humanos y animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son no patogénicas, pero algunas pueden causar graves diarreas, infección urinaria, síndrome urémico hemolítico, etc.(17)(18) Las enfermedades diarreicas fueron una de las diez principales causas de muerte en el año 2016 a nivel mundial.(19) Por otra parte, *S. aureus* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que posee forma de coco, se encuentran colonizando piel y mucosas tanto de seres humanos como de animales. Dependiendo de las condiciones generales en las que se encuentre el huésped, puede producir

infecciones a nivel local en piel y mucosa, como así también infecciones internas tales como endocarditis, neumonía, osteomielitis, etc.(20)

1.2.1. Biopelículas

Las bacterias pueden encontrarse en la naturaleza en dos formas, como células libres, es decir, planctónicas, o en colonias de microorganismos, rodeadas por una matriz, conocidas como biopelículas. Se ha descubierto que la mayoría de las bacterias se hallan organizadas como biopelículas (21) y que poseen diferencias fenotípicas, bioquímicas y morfológicas respecto a las que se encuentran en forma planctónica.(22) Según Donald, una biopelícula es “una comunidad microbiana sésil, formada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”.(23)(21)

Las biopelículas les proporcionan ventajas a las bacterias, ya que las protegen de los cambios medioambientales, tales como humedad, temperatura, pH, etc. Esta capacidad de protegerse mediante la biopelícula es común en la mayoría de las bacterias. La adhesión que logran, a todo tipo de superficies, es irreversible, por lo que su remoción requiere de mayor esfuerzo.(21)

La composición de las biopelículas está dada principalmente por microcolonias de diferentes células bacterianas y una matriz polimérica formada en un 97% por agua y por macromoléculas de carbohidratos (exopolisacáridos, EPS). Asimismo, se pueden encontrar en menor proporción, proteínas, ácidos nucleicos, desechos bacterianos, entre otros. La hostilidad y la cantidad de nutrientes del medio determinan la producción de EPS como así también la cantidad de bacterias adheridas, es decir, determinan la formación y estructura de la biopelícula.(21) La matriz posee canales abiertos que permiten la circulación de agua, nutrientes y oxígeno, facilitando así la vida en las zonas más profundas de la biopelícula. De tal modo, proporcionan una salida para la excreción de desechos.(24)

La formación de la biopelícula está marcada principalmente por tres etapas: adhesión, crecimiento y desprendimiento, las cuales se esquematizan en la Figura 4.

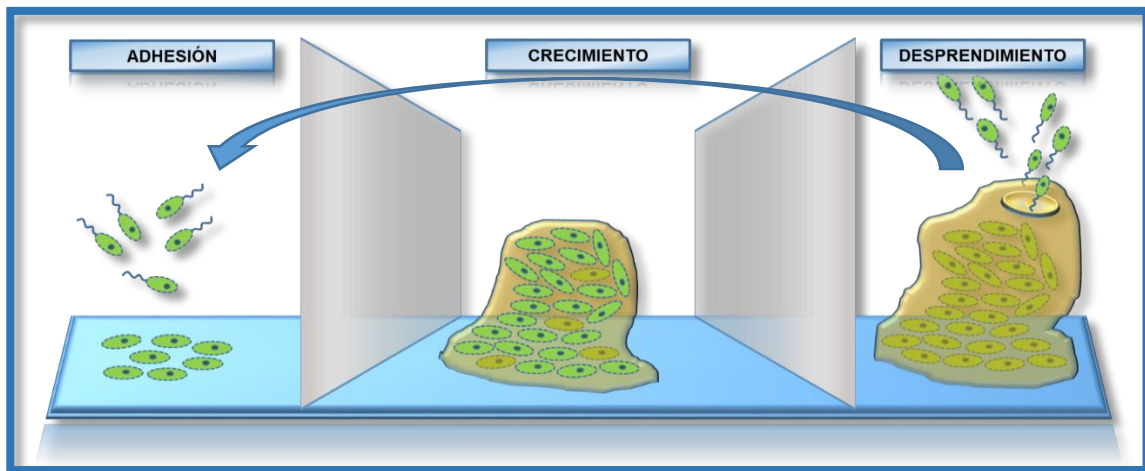


Figura 4. Esquema de las etapas de formación de una biopelícula. Las bacterias planctónicas se **adhieren** reversiblemente a la superficie, debido a las interacciones moleculares, para luego hacerlo de manera irreversible. En una segunda etapa, las bacterias comienzan a secretar EPS y se replican, **crecimiento**, formando la biopelícula con su respectiva estructura (microcolonias y canales). Cuando la biopelícula se encuentra madura comienza la tercera etapa, **desprendimiento**, en donde las bacterias pueden liberarse y volver su estado planctónico.

Para que ocurra la primera etapa, es necesario la adsorción de una fina película orgánica sobre la superficie, esto modifica el sustrato y favorece la *adhesión*. Debido a las fuerzas de repulsión existentes entre la superficie bacteriana y la del sustrato, es que se adhieren de manera reversible, es decir, pueden abandonar la superficie y volver a la forma planctónica. Gracias a apéndices extracelulares como pilis, flagelos o fimbrias, las bacterias logran vencer estas fuerzas generando una adhesión irreversible. La adhesión se ve facilitada de acuerdo a ciertas características de la superficie del sustrato tales como aspereza, hidrofobicidad, polaridad, rugosidad, entre otras.

En una segunda etapa, *crecimiento*, las bacterias adheridas comienzan a dividirse y colonizar la superficie, a su vez producen EPS, que constituye la matriz de la biopelícula. Se obtiene como resultado la compleja estructura de la biopelícula, incluyendo sus canales y la distribución de las microcolonias. El crecimiento está limitado por la disponibilidad de nutrientes del medio.

En la última etapa, *desprendimiento*, la biopelícula se encuentra madura, por distintas causas que no están completamente establecidas, se produce una

liberación de bacterias, libres o en grupo, capaces de retomar su forma planctónica y así colonizar nuevas superficies. De esta manera, se completa el ciclo de la biopelícula.(21)(24)

Las biopelículas pueden encontrarse en una gran diversidad de ambientes ya que los requisitos para que los microorganismos puedan formarlas son mínimos, un medio hidratado y una pequeña cantidad de nutrientes. Esto las convierte en una problemática para la comunidad, principalmente por la resistencia que le confiere la matriz polimérica ante antibióticos y desinfectantes.(25) Se estima que el 65% de las infecciones hospitalarias están relacionadas directamente con biopelículas,(26) se las ha vinculado con infecciones tales como placa dental, osteomielitis, endocarditis, cistitis crónica, entre otras, como así también a infecciones ocasionadas por el uso de productos médicos, catéteres endovenosos, marcapasos, prótesis, sondas vesicales, etc., (Figura 5). (21)(27) Así, algunos ejemplos de estas infecciones son el estudio realizado por Mena Viveros y col. donde postulan la presencia de biopelículas en infecciones del área otorrinolaringológica,(28) y el realizado por Andreu y col. donde indican que las infecciones urinarias causadas por *E. coli* son recurrentes debido a que utilizan la biopelícula como refugio para subsistir.(29)

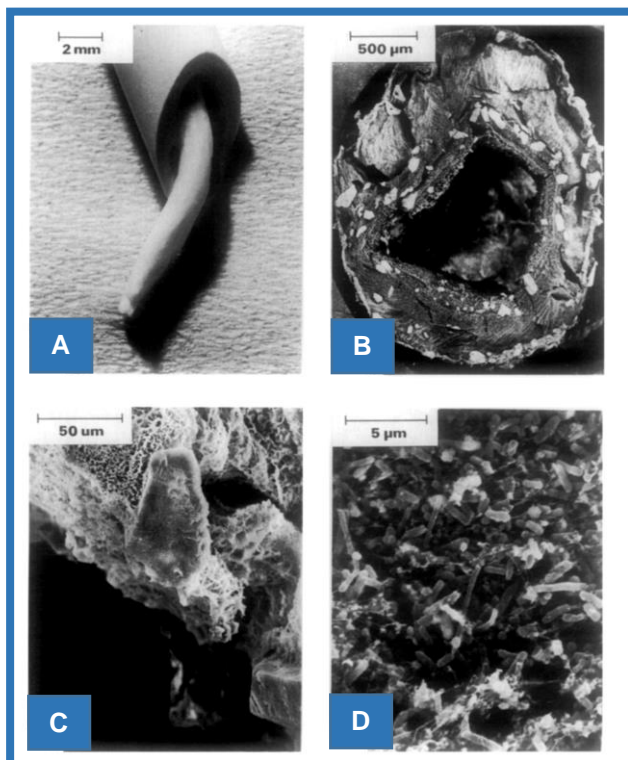


Figura 5. Cuatro imágenes de un catéter uretral obstruido por biopelículas.

A) Corte del catéter en el que se observa una estructura similar a la de un "gusano" ocluyendo el lumen. B) Micrografía electrónica de barrido de baja potencia de una sección transversal fracturada por congelación del catéter bloqueado. C) Superficie exterior de una preparación liofilizada del material que bloquea al catéter en la que se aprecian formaciones cristalinas. D) Muestra fija y seca en la que se observa que, debajo de las capas cristalinas, los cilindros del catéter se componen de una masa de cocos y bacilos. (27)

1.3. Generalidades

Como se mencionó anteriormente, el lavado es el paso fundamental dentro de una CE, principalmente en un nosocomio en donde las IH son una problemática actual, más aún en la última década en que se ha hecho énfasis en la presencia de biopelículas directamente relacionadas a estas infecciones.

Debido a la posible presencia de biopelículas en instrumental y/o material procesado dentro de la CE es que se debe poner especial atención en la correcta realización del lavado, particularmente en la eficacia que posea el detergente utilizado para lograr la erradicación de dichas biopelículas. La bibliografía encontrada acerca del tema presenta resultados controvertidos en función de la metodología realizada por los distintos investigadores; así Fang y col.(30) y Vickery y col.(31) mostraron que los detergentes no enzimáticos eran más efectivos que los enzimáticos, a diferencia del estudio realizado por Costa Luciano y col.(26) en donde expresan que los detergentes enzimáticos y los no enzimáticos no son efectivos frente a biopelículas.

Por lo antes expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar la eficacia de detergentes enzimáticos y no enzimáticos frente a cultivos planctónicos y biopelículas bacterianas.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad detergente de cinco productos comercializados en Argentina en cultivos planctónicos.
- Comparar la eficacia de remoción de biopelículas bacterianas entre detergentes trienzimáticos frente a detergentes pentaenzimáticos.
- Comparar la eficacia de remoción de biopelículas bacterianas entre detergentes enzimáticos y no enzimáticos comercializados en Argentina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Los cultivos se conservaron en caldo tripteína soya (CTS, Britania) y glicerol en la relación 90:10 a -20°C . Para los experimentos, las cepas se cultivaron por 18 h a $35 - 37^{\circ}\text{C}$, en agar tripteína soya (ATS, Britania). Se utilizaron las siguientes cepas clínicas: *S. aureus* cepas 9455 y 771, resistentes a meticilina, *E. coli* cepa 1 y las cepas de referencia: *E. coli* ATCC 35218 y *S. aureus* ATCC 29213. Las cepas clínicas fueron provistas por el Sanatorio Aconcagua de la Ciudad de Córdoba.

3.2. Ensayo de la eficacia de los detergentes en cultivos planctónicos

Los ensayos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en Farmacopea Argentina, VII ed. y en otras bibliografías relacionadas al tema.(32)

3.2.1. Preparación de Detergentes

- *Detergentes enzimáticos*

Se prepararon 5 mL de solución de cada detergente. La concentración, el tiempo de exposición y la temperatura utilizados son los indicados por cada fabricante y se detallan en la Tabla 1.

- *Detergente no enzimático*

Se prepararon 45 mL de solución de detergente. La concentración, el tiempo de exposición y la temperatura utilizados son los indicados por el fabricante y se detallan en la Tabla 1.



Figura 6. Muestras de los detergentes utilizados.

Tabla 1. Descripción de detergentes.

Nombre	Tipo	Compañía	Concentración de uso	Tiempo y temperatura
D1	Trienzimático	Adox S.A. Buenos Aires, Argentina.	3 mL / L	10 min, 35°C
D2	Trienzimático	Lectus S.A. Buenos Aires, Argentina.	5 mL / L	10 min, 35°C
D3	Trienzimático	Sertex S.R.L. Buenos Aires, Argentina.	10 mL / L	10 min, 35°C
D4	Pentaenzimático	Covidex S.R.L. Buenos Aires, Argentina.	5 mL / L	10 min, 35°C
D5	No enzimático	IQB SRL. Buenos Aires, Argentina.	2,25 g / L	10 min, 35°C

3.2.2. Preparación de Neutralizante

Se prepararon 100 ml de neutralizante de acuerdo a Farmacopea Argentina, VII ed. Tween 80 (6% p/v), lecitina (0.6% p/v), tiosulfato de sodio (1% p/v), L-histidina (0.2% p/v) y 500 µL de agua destilada estéril.

- *Control de Neutralizante*

Se colocaron 900 µL de neutralizante y 100 µL de inóculo bacteriano. Se realizaron dos diluciones, 1:100 y 1:1000. Todas las muestras se procesaron por duplicado. Se sembró en placa de ATS y se cultivó por 24 h en estufa a 35 - 37°C.

3.2.3. Preparación del Inóculo

Se seleccionaron las siguientes cepas clínicas: *S. aureus* 9455 resistente a meticilina y *E. coli* cepa 1, las que fueron cultivadas en CTS durante 24 h a 35 - 37°C. Con cada cepa, se realizó una suspensión correspondiente a la escala de 0,5 de Mc Farland de 10^8 UFC/mL. A las suspensiones se les efectuó una dilución 1:100 con CTS, para obtener un inóculo de 10^6 UFC/mL.

- *Control de Inóculo*

Se colocaron 900 µL de CTS en un tubo estéril y 100 µL de inóculo bacteriano (Control A). Se realizaron dos diluciones, 1:100 y 1:1000. Todas las muestras se efectuaron por duplicado. Se sembró en placa de ATS y se cultivó por 24 h en estufa a 35 - 37°C.

3.2.4. Ensayo con Detergentes

Se colocaron 450 μ L de detergente al doble de concentración, 450 μ L de Buffer fosfato salino (BFS, pH 7) y 100 μ L de inóculo bacteriano. Se incubó por 10 min, se realizaron dos diluciones, 1:100 y 1:1000. Se sembraron, la muestra pura y las diluciones, en placa de ATS y se cultivó por 24 h en estufa a 35 - 37°C. Todas las muestras se efectuaron por triplicado.

3.2.5. Ensayo con Detergentes y Neutralizante

Se colocaron 450 μ L de detergente al doble de concentración y 100 μ L de inóculo bacteriano, (Control B). Se incubó por 10 min y se agregó 450 μ L de Neutralizante. Se realizaron dos diluciones, 1:100 y 1:1000. Se sembraron, la muestra pura y las diluciones, en placa de ATS y se cultivó por 24 h en estufa a 35 - 37°C. Todas las muestras se efectuaron por triplicado.

3.3. Ensayo de la eficacia de los detergentes en biopelículas

Los ensayos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en Farmacopea Argentina, VII ed. y en otras bibliografías relacionadas al tema.(32)

3.3.1. Preparación de Detergentes

Los detergentes fueron preparados según lo indicado en el punto 1.2.1, Tabla 1.

3.3.2. Preparación del Inóculo

Se realizaron cultivos de cinco cepas (Cepa clínica: *S. aureus* 9455, *S. aureus* 771, *E. coli* cepa 1 y cepas ATCC: *E. coli* 35218, y *S. aureus* 29213) en CTS por 24 h a 35 - 37°C. Luego, se realizó una dilución 1:100 con CTS suplementado con 0,25% p/v de glucosa.(33)

3.3.3. Ensayo con Detergentes

Se colocaron 200 μ L de cada suspensión bacteriana en placas de poliestireno de 96 wells o pocillos por triplicado. Se incubó 48 h en agitador a

35 - 37°C, se descartó el sobrenadante y se lo lavó tres veces con BFS pH 7, para eliminar las células planctónicas.(33)

Se agregaron 200 μ L de cada detergente, preparado de acuerdo a lo especificado por el fabricante (Tabla 1), y se colocó en agitador orbital durante 10 min a 37°C. Cada muestra se realizó por triplicado. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se lavó cada pocillo tres veces con 200 μ L de BFS.

3.3.3.1. Cuantificación de la masa de biopelícula con tinción con Cristal Violeta (CV)

El CV interacciona con las cargas negativas de la superficie de la matriz extracelular de la biopelícula, así como también con la pared de las células planctónicas. Tanto las células viables, las muertas y la matriz pueden teñirse con CV, por lo que esta tinción proporciona una medida de la cantidad de masa de la biopelícula.(34)

Una vez tratados las biopelículas con los detergentes, se añadieron 200 μ L de una solución de CV al 1% a cada pocillo, se lavó el exceso de CV dos veces con BFS y se fijó el colorante con 50 μ L de etanol al 95% durante 15 min. La absorbancia se midió a 595 nm (33) (Figura 7).

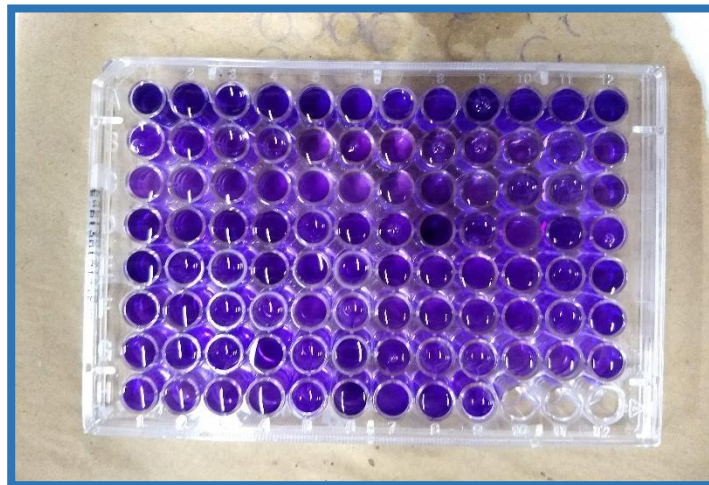


Figura 7. Cuantificación de la masa de la biopelícula con la tinción con CV.

3.3.3.2. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT

La inhibición de la biopelícula se midió indirectamente de forma semicuantitativa colorimétrica usando un ensayo de reducción de 2,3 bis (2

metoxi-4-nitro-5 sulfofenil) 2H tetrazolio, 5 carboxanilida (XTT) y meta sulfato de fenazina (PMS). El fundamento radica en la reducción de la sal de tetrazolio a su forma soluble en agua.(35) La absorbancia que arroja es indicativa de la masa de células metabólicamente activas. El ensayo permite la cuantificación de células viables tanto en biopelículas como cultivos planctónicos.(36)

A las biopelículas de las cepas clínicas *S. aureus* 9455 y *S. aureus* 771, se los trató con los detergentes mencionados en la Tabla 1 durante 10 y 20 min. A cada tiempo evaluado se descartó el sobrenadante, se enjuagó la biopelícula tres veces, se agregaron 250 μ L de la solución del colorante (XTT/PMS) y se incubó en oscuridad por un período de 3 h a 35°C. Ambos reactivos (XTT/PMS) se diluyeron en 100 μ L de DMSO (0,01% en la solución final) y las soluciones se realizaron en BFS a las concentraciones finales de 200 μ g/mL (XTT) y 20 μ g/mL (PMS). Se midió espectrofotométricamente a 490 nm (Figura 8).

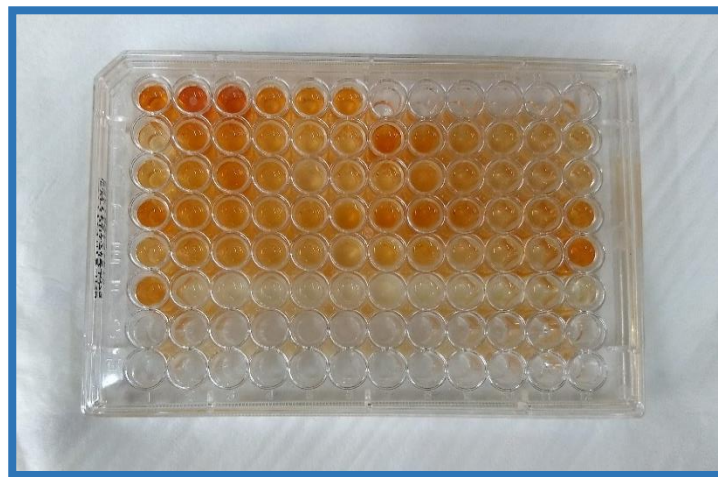


Figura 8. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT.

3.4. Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva (media y desviación estándar) de los valores obtenidos en cada ensayo. Los gráficos representan los resultados expresados como media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados por comparación de medias usando el test de *t de Student* con un nivel de significancia del 95%. Las diferencias * $p < 0,05$ y ** $p < 0,1$ fueron consideradas significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayo de la eficacia de los detergentes en cultivos planctónicos

Los resultados obtenidos, luego de tratar las suspensiones bacterianas de las cepas clínicas *S. aureus* 9455 y *E. coli* cepa 1 con los distintos detergentes en las condiciones indicadas por el fabricante se presentan en la Tabla 2. Se pudo observar que, los detergentes que inhibieron en mayor proporción el crecimiento fueron el trienzimático Sertex (D 3) y el no enzimático IQB (D 5). Mientras que, con el resto de los detergentes se obtuvieron resultados similares al Control A, es decir, no se observó inhibición.

No se encontró diferencia significativa entre el tratamiento con detergente sólo y el detergente más el neutralizante.

Tabla 2. Evaluación de la actividad inhibitoria de detergentes en cultivos planctónicos.

Tratamiento	<i>S. aureus</i> 9455 Log ₁₀ UFC/mL	<i>E. coli</i> Cepa 1 Log ₁₀ UFC/mL
Control A	5	5
Control B	5	-
D1	5	5
D1 + N	5	-
D2	5	5
D2 + N	5	-
D3	3.45 ± 2.2	3.17 ± 3.3
D3 + N	2.85 ± 0.7	-
D4	5	5
D4 + N	5	-
D5	0	0
D5 + N	2.48 ± 4.4	-

Nota: los valores son media ± desviación estándar. UFC: Unidades Formadoras de Colonias. Control A: inóculo + CTS. Control B: inóculo + Neutralizante. N: neutralizante. D1: trienzimático Adox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB.

4.2. Ensayo de la eficacia de los detergentes en biopelículas

4.2.1. Cuantificación de la masa de biopelícula con la tinción con CV

Los resultados obtenidos, una vez tratados las biopelículas de las cepas clínicas resistentes a meticilina: *S. aureus* 9455 y 771, *E. coli* cepa 1, y las cepas de referencia: *E. coli* ATCC 35218 y *S. aureus* ATCC 29213, mediante el

ensayo con tinción con CV, se expresan en la Tabla 3. En la Figura 9 se representan los datos.

Tabla 3. Cuantificación de la masa de biopelícula con la tinción con CV.

Tratamiento	<i>S. aureus</i> 9455	<i>E. coli</i> Cepa 1	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>S. aureus</i> 771	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
Control	4.37 ± 0.28	1.61 ± 0.16	1.07 ± 0.08	2.24 ± 0.12	2.91 ± 0.45
D1	2.26 ± 0.36*	1.30 ± 0.24	1.03 ± 0.17	2.02 ± 0.21	2.21 ± 0.42
D2	2.79 ± 0.74**	1.38 ± 0.08	1.10 ± 0.09	1.34 ± 0.25*	2.15 ± 0.41
D3	4.16 ± 0.16	0.97 ± 0.09*	1.06 ± 0.26	2.06 ± 0.20	2.60 ± 0.10
D4	3.51 ± 0.49	0.84 ± 0.04*	0.71 ± 0.05*	1.96 ± 0.54	1.70 ± 0.17*
D5	4.17 ± 0.05	0.95 ± 0.21*	1.02 ± 0.12	1.49 ± 0.20*	2.44 ± 0.31

Nota: Resultados expresados como densidad óptica. Los valores son media ± desviación estándar. Control: BFS + inóculo bacteriano. D1: trienzimático Adox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB. Significancia respecto del control *p<0,05, **p<0,1.

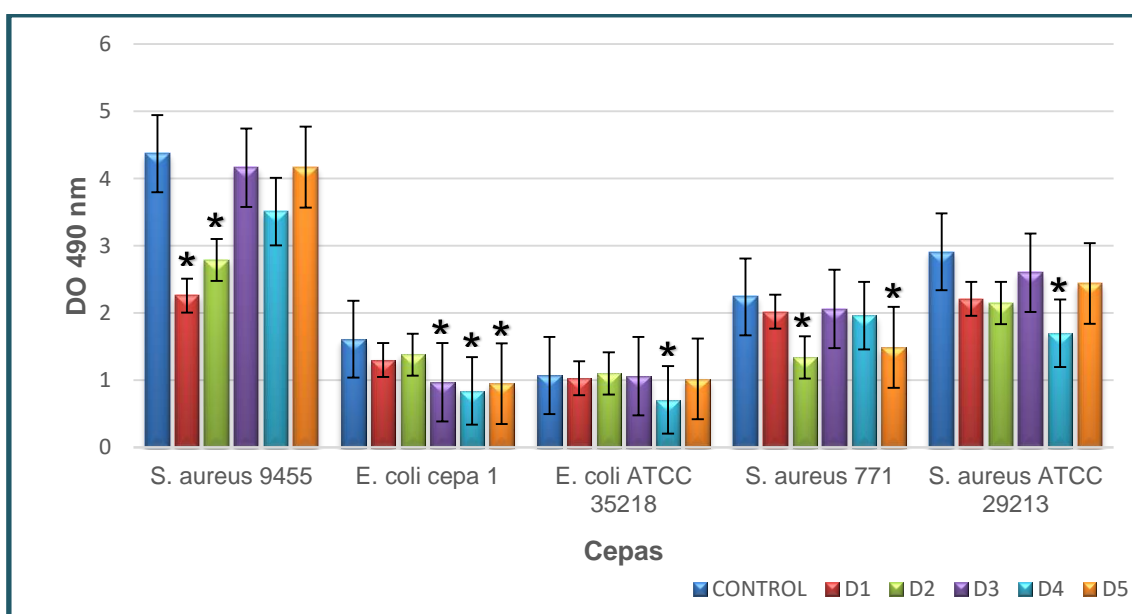


Figura 9. Cuantificación de la masa de biopelícula con la tinción con CV. Control: BFS + inóculo bacteriano. D1: trienzimático Adox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB. * = Significancia respecto del control.

De los datos obtenidos se pudo observar que, la cepa clínica *S.aureus* 9455 fue la más formadora de biopelícula, en comparación con las demás cepas. En relación a la actividad inhibitoria, el detergente trienzimático Lectus (D 2) disminuyó la biomasa de las cepas clínicas *S. aureus* 9455 (36%) y 771

(40%), en forma similar el trienzimático Adox (D 1) disminuyó *S. aureus* 9455 (48%), aunque no mostró eficacia sobre la cepa 771. El detergente trienzimático Sertex (D 3) redujo en forma marcada la biopelícula de la cepa clínica de *E. coli* (40%), mientras que el detergente pentenzimático Covidex (D 4) disminuyó la biopelícula tanto de *S. aureus* (42%) como de *E. coli* (60% para la cepa 1 y 34% para la ATCC 35218), pero no de las cepas más formadoras de biopelícula. Por último, el detergente no enzimático IQB (D 5) redujo la biopelícula de una cepa de *E. coli* (41%) y una cepa de *S. aureus* (34%), ambas cepas clínicas.

4.2.2. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT

Los resultados obtenidos, una vez tratados las biopelículas de las cepas clínicas resistentes a meticilina: *S. aureus* 9455 y 771, con los distintos detergentes durante 10 min, muestran la misma tendencia en ambas cepas, disminuyendo el metabolismo celular.

D 5 disminuyó la viabilidad celular en ambas cepas; seguido por D 4. Los resultados se encuentran expresados en la Tabla 4 y graficados en la Figura 10 y Figura 11.

Tabla 4. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT.

Tratamiento	<i>S. aureus</i> 9455	<i>S. aureus</i> 771
Control	1.85 ± 0.35	0.73 ± 0.08
D1	0.83 ± 0.07**	0.27 ± 0.08*
D2	0.60 ± 0.27*	0.26 ± 0.05*
D3	0.75 ± 0.21*	0.46 ± 0.07*
D4	0.35 ± 0.03*	0.26 ± 0.04*
D5	0.01 ± 0.01*	0.0*

Nota: los valores son media ± desviación estándar. Control: BFS + inóculo bacteriano. D1: trienzimático Adox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB. Significancia respecto del control *p<0,05, **p<0,1.

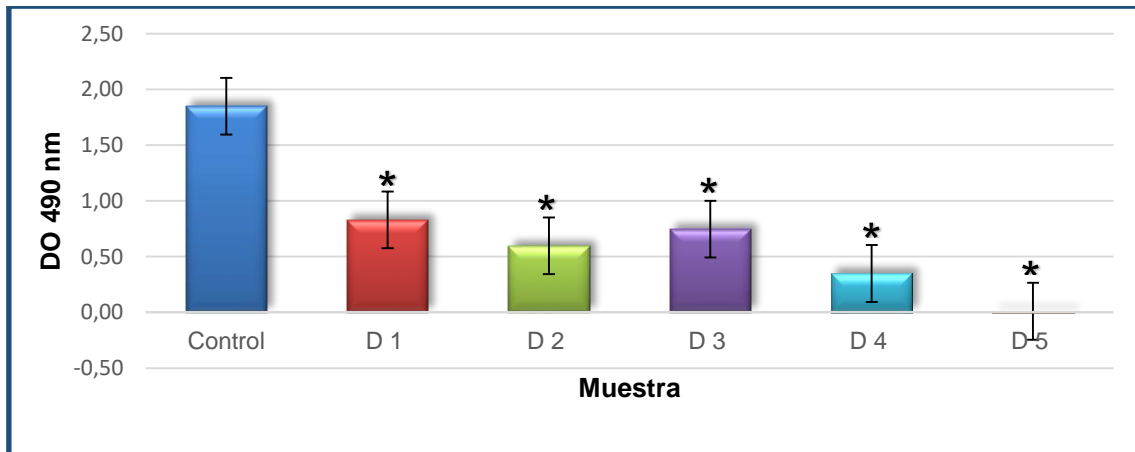


Figura 10. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT en *S. aureus* 9455. D1: trienzimático Adox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB. * = Significancia respecto del control.

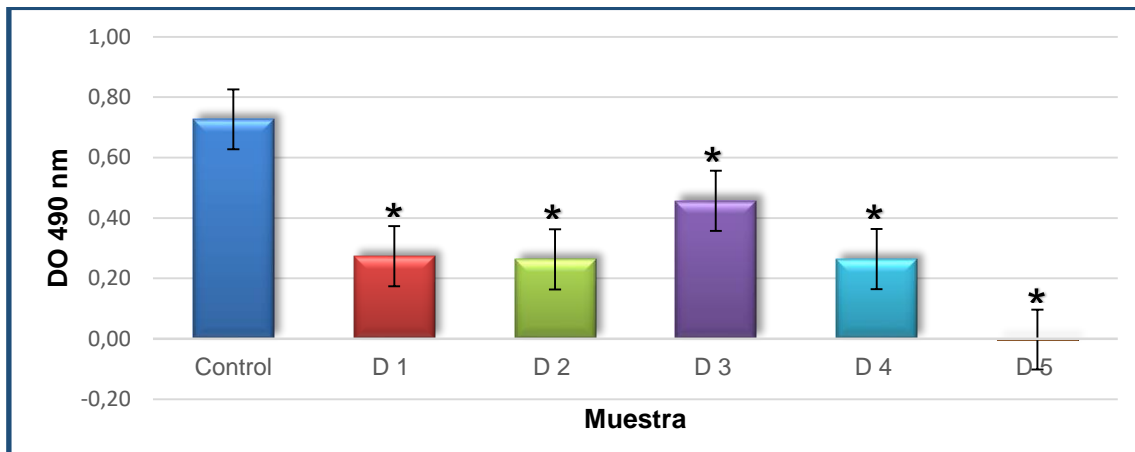


Figura 11. Cuantificación del metabolismo celular de las biopelículas mediante el ensayo del XTT en *S. aureus* 771. D1: trienzimático Adox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB. * = Significancia respecto del control.

No se observaron diferencias significativas en la viabilidad bacteriana cuando se compararon los dos tiempos de contacto utilizados para los cinco detergentes probados en *S. aureus* 9455. Los resultados se encuentran graficados en la Figura 12.

En *S. aureus* 771, se encontró diferencia significativa cuando fueron tratados con los detergentes D 2 y D 4 en ambos tiempos de contacto, (Figura 13).

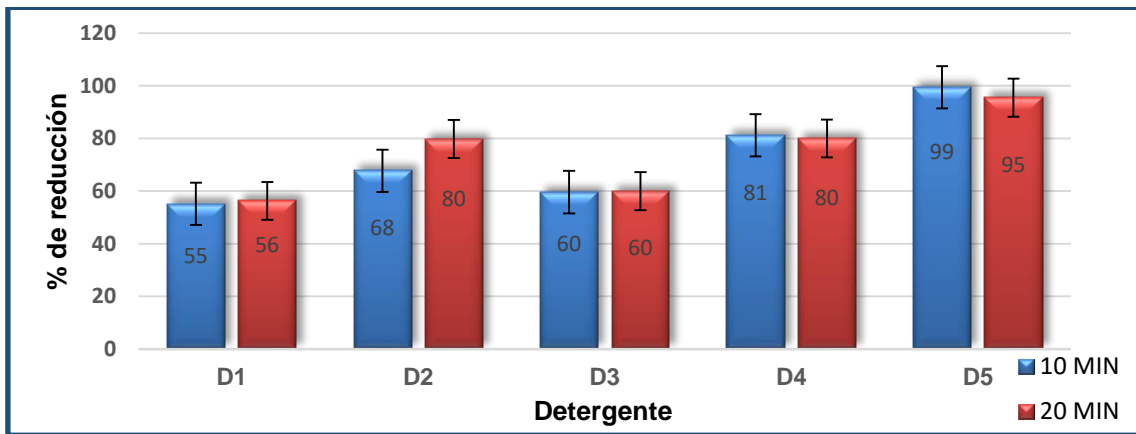


Figura 12. Porcentaje de reducción de viabilidad de *S. aureus* 9455 luego de 10 min (azul) de contacto con el detergente y luego de 20 min (rojo) de contacto con el detergente. D1: trienzimático Atox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB.

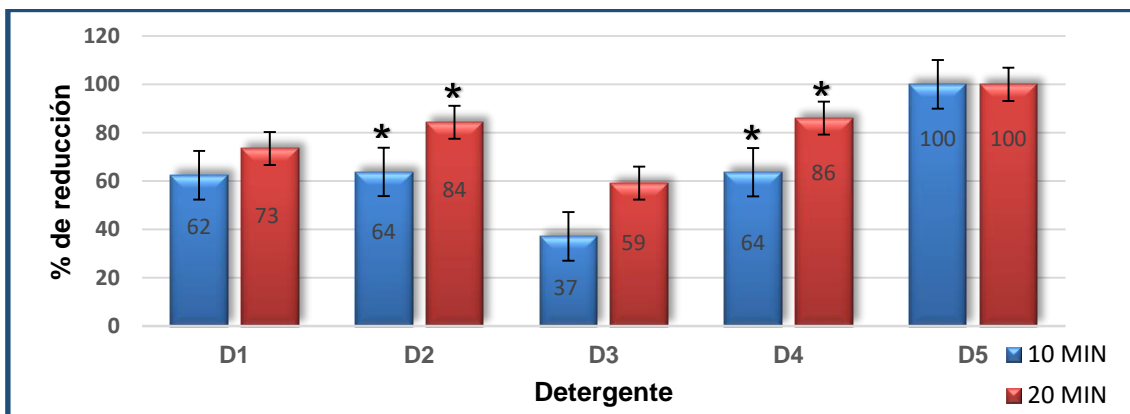


Figura 13. Porcentaje de reducción de viabilidad de *S. aureus* 771 luego de 10 min (azul) de contacto con el detergente y luego de 20 min (rojo) de contacto con el detergente. D1: trienzimático Atox. D2: trienzimático Lectus. D3: trienzimático Sertex. D4: pentaenzimático Covidex. D5: no enzimático IQB. * = Significancia entre ambos tiempos.

5. DISCUSIÓN

En este estudio experimental se evaluó la eficacia de cuatro detergentes enzimáticos y uno no enzimático frente a distintas cepas de *E. coli* y *S. aureus*, tanto clínicas como cepas de referencia, en la forma planctónica y en biopelículas. La elección de las cepas mencionadas se realizó considerando la incidencia de estos microorganismos en patologías intrahospitalarias, y la potencial contaminación de productos médicos. Para esta última forma se probó, además, a dos tiempos de contacto con el detergente, al tiempo indicado por el fabricante y a un tiempo superior.

Los reportes en cuanto a la efectividad de los detergentes enzimáticos o no enzimáticos en biopelículas son controvertidos, por lo que en este trabajo se planteó la realización de un estudio comparativo.

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad de los detergentes frente a las bacterias en suspensión indicaron que el detergente que causó mayor inhibición del crecimiento fue el no enzimático, a diferencia de los resultados publicados en el estudio de Da Costa Luciano y col.(26) en donde indican que los detergentes enzimáticos fueron significativamente más efectivos. Esta diferencia puede deberse a que en el estudio mencionado se utilizaron otras cepas, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Ren y col.(25) realizaron ensayos sobre *E. coli* ATCC 25922 y Vickery y col.(31) sobre una cepa clínica de *E. coli*, los resultados de estos estudios indicaron que los detergentes no enzimáticos fueron más efectivos que los enzimáticos en la eliminación de biopelículas. Lo cual difiere con los resultados obtenidos en este estudio ya que, tanto para la cepa clínica de *E. coli* como para la cepa *E. coli* ATCC 35218, se observó que el detergente que produjo mayor eliminación de biopelícula era el pentaenzimático (D 4). Esta diferencia puede deberse a las distintas metodologías utilizadas.

Da Costa Luciano y col.(26) obtuvieron resultados similares a los del presente estudio, concluyendo que los detergentes enzimáticos y los no enzimáticos no logran erradicar las biopelículas formadas por las bacterias. Cabe destacar que se utilizaron bacterias y metodologías diferentes.

De acuerdo a los ensayos de viabilidad celular realizados en este estudio, se pudo observar que, todos los detergentes disminuyen la viabilidad de manera significativa, siendo el detergente no enzimático (D 5) el único que la reduce por completo. Datos similares obtuvieron Fang y col.(30) que indicaron que hubo diferencia significativa en la reducción de viabilidad para detergentes no enzimáticos; pero, a diferencia del presente trabajo, no encontraron resultados significativos para detergentes enzimáticos.

Si bien se probaron tiempos de contacto diferentes, tanto en este estudio como en el realizado por Ren y col.(25) se obtuvieron los mismos resultados, no existen diferencias significativas después de tratar las biopelículas con los detergentes a diferentes tiempos de contacto.

Las condiciones experimentales con las que se trabajó en los distintos ensayos de eficacia representaron el “peor caso”, es decir, se utilizaron condiciones que en la práctica presentan mayor dificultad para realizar la limpieza. Así, por ejemplo, se emplearon cepas clínicas de bacterias que normalmente causan infecciones hospitalarias las cuales, además, son formadoras de biopelículas. Conjuntamente, no se realizó cepillado durante el lavado, esto representó aquellos sitios de los productos médicos en los que, debido a su forma, no es posible acceder con facilidad.

6. CONCLUSIONES

Las bacterias dentro de las biopelículas son resistentes a los antimicrobianos hasta 1000 veces más que aquellas que están en suspensión. Distintos factores están involucrados en la formación de las biopelículas: forma del dispositivo, material del que está fabricado, fluido con el que se encuentra en contacto, pH, temperatura, etc.(30) Es por esto que, el lavado de productos médicos previo a desinfección o esterilización debe estar validado y debe ser realizado siguiendo protocolos escritos.

Las pruebas realizadas en bacterias en suspensión mostraron que el detergente trienzimático Sertex (D 3) fue el más efectivo dentro de los detergentes enzimáticos, siendo superado por el no enzimático IQB (D 5); esto indicaría que los detergentes enzimáticos no poseen mayor efectividad que los no enzimáticos.

De los resultados obtenidos se pudo concluir que ningún tipo de detergente erradica biopelículas, lo que puede generar una futura acumulación en sectores difíciles de friccionar; es por esto que la limpieza debe ser realizada correctamente evitando así la formación de biopelículas.

Comparando los distintos detergentes enzimáticos se obtuvo mejor resultado con el pentaenzimático (D 4), lo cual indicaría que la formulación de este último contribuye a una mayor reducción de biopelículas.

Entre los detergentes trienzimáticos probados el que mostró mejores resultados fue Lectus (D 2), aunque no fue significativamente superior a las otras marcas.

La viabilidad celular se vio reducida frente a todos los detergentes probados. D 5 redujo por completo la viabilidad, seguido de D 4. Si bien todos reducen la viabilidad, ninguno erradica las biopelículas, por lo que es fundamental el desarrollo de nuevos detergentes.

Los ensayos realizados a distintos tiempos indican que no es necesario utilizar tiempos superiores a los especificados por el fabricante ya que no ofrecen mejores resultados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos acerca de los distintos detergentes es que se destaca la necesidad de concientizar al personal acerca

de la importancia de realizar el trabajo correctamente, actualizar los procedimientos de acuerdo a las nuevas bibliografías y validar los procesos que se llevan a cabo.

7. GLOSARIO

- Adsorción: fenómeno por el cual un sólido o un líquido atrae y retiene en su superficie gases, vapores, líquidos o cuerpos disueltos.
- Anfótero: sustancia que puede reaccionar ya sea como ácido o base.
- Biopelícula: ecosistema microbiano organizado, conformado por una o varias especies de microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.
- Catalizador: Que acelera o favorece una reacción química sin participar en ella.
- Cavitación: proceso por el cual los bolsillos de aire implosionan (revientan hacia adentro) liberando partículas de suciedad o restos de tejidos.
- Desinfección: es el proceso por el cual se mata o se destruye la mayoría de los microorganismos patógenos, con la excepción de los esporos bacterianos. Los desinfectantes son usados sobre objetos inanimados.
- Esterilización: en el ámbito sanitario es un proceso diseñado y validado para eliminar la carga microbiana, tanto en forma vegetativa como esporulada, presente en un dispositivo médico, asegurando su esterilidad con una probabilidad de 10^{-6} .
- Hidrófilo: sustancia que tiene afinidad por el agua.
- Hidrófobo: aquellas sustancias que son repelidas por el agua.
- Inóculo: cantidad de bacterias que son introducidas en un medio de cultivo particular.
- Limpieza: proceso que elimina la suciedad orgánica e inorgánica, o cualquier otro material extraño.
- Patógeno: microorganismo que causa o produce enfermedad.
- Tensioactivo no iónico: tensioactivo que no contienen grupos funcionales disociables (ionizables) y, por lo tanto, no se disocian en el agua en iones.
- Tensión superficial: cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie de un líquido por unidad de área.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-Gnass S, Stempliuk V. Manual de esterilización para centros de salud. Organización Panamericana de la Salud. 2008. 187 p.
2. Silvestre C, Fagoaga L, Garciandía M, Lanzeta I, Mateo M, Zapata M. Anales del sistema sanitario de Navarra. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2009;23(0):95–103. Disponible en: <https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/6428/5134>
3. Sanchez AM. Manual De Desinfeccion Y Esterilizacion Hospitalaria [Internet]. 2012. 140 p. Disponible en:
<http://angelms.es/trabajos/esterilizacion.pdf%5Cangelms.es>
4. Sánchez Fdez, Ana M^a . Llano Membiela, Belén . Martínez Ortega C. Guía técnica de limpieza, desinfección y esterilización [Internet]. Servicio De Salud Del Principado De Asturias. 2011. p. 68. Disponible en: https://www.asturias.es/Astursalud/Articulos/AS_SESPA/AS_GestionClinica/AS_SeguridadPaciente/PDF LIMPIEZA.pdf
5. Ministerio de Salud de la Nación. Resolución 1547/2007 - GUIA DE PROCEDIMIENTOS Y METODOS DE ESTERILIZACION Y DESINFECCION PARA ESTABLECIMIENTOS DE SALUD PUBLICOS Y PRIVADOS. 2007 p. 8.
6. Real Academia Española. detergente | Definición de detergente - Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario [Internet]. [acceso 2018 Jun 17]. Disponible en: <http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=detergente>
7. Ascensión Sanz Tejedor. Química Orgánica Industrial [Internet]. [acceso 2018 Jun 17]. Disponible en: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-10.php>
8. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke CLC. Introducción a la microbiología [Internet]. [acceso 2018 Jun 20]. Disponible en: <https://books.google.com.ar/books?id=Nxb3iETuwplC&pg=PR18&dq=introduccion+a+la+microbiologia+enzimas+pagina+116&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj4-bKukuPbAhVLIJAKHYIvDT4Q6AEIJjAA#v=onepage&q=introduccion a la microbiologia enzimas pagina 116&f=false>
9. Dorland 27th ed. Lipase - MeSH - NCBI [Internet]. [acceso 2018 Jun 20]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68008049>
10. Endopeptidases - MeSH - NCBI [Internet]. [acceso 2018 Jun 20]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010450>
11. Stedman 25th ed. Amylases - MeSH - NCBI [Internet]. [acceso 2018 Jun 20]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000681>
12. Cellulase - MeSH - NCBI [Internet]. [acceso 2018 Jun 20]. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68002480>
13. Covidex. Detergentes enzimáticos de alta performance.
 14. OMS | Una atención más limpia es una atención más segura. WHO [Internet]. World Health Organization; 2013 [acceso 2018 Nov 22]; Disponible en: <https://www.who.int/gpsc/background/es/>
 15. Programa Nacional de Epidemiología y Control de Infecciones Hospitalarias (VIHDA) República Argentina [Internet]. [acceso 2018 Nov 22]. Disponible en: http://www.vihda.gov.ar/sitio_vihdaii/vihda/ih.asp
 16. Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional De Epidemiologia Y Control De Infecciones Hospitalarias. 2010; Disponible en: http://www.vihda.gov.ar/sitio_vihdaii/archivospublicaciones/infecciones_hospitalarias_una_endemoepidemia_de_alcance_mundial.pdf
 17. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. E. coli [Internet]. [acceso 2018 Nov 22]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
 18. *Escherichia coli* - MeSH - NCBI [Internet]. [acceso 2018 Nov 22]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004926>
 19. OMS. Las 10 principales causas de defunción [Internet]. [acceso 2018 Nov 21]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
 20. Trabajo IN de S e H en el T. *Staphylococcus aureus* [Internet]. 2012. p. 4. Disponible en: http://www.insht.es/riesgosbiologicos/contenidos/fichas_de_agentes_biologicos/fichas/bacterias/staphylococcus_aureus.pdf
 21. Nazar J. Biofilms bacterianos. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. 2009;67:61–72.
 22. Gómez J, Gómez-lus ML, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre JR. Original ¿ Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos ? 2013;26(2):97–102.
 23. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881–90.
 24. Diaz C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: Influencia de la topografía y composición química de la superficie. Microbiología. Universidad Nacional de la Plata; 2011.
 25. Ren W, Sheng X, Huang X, Zhi F, Cai W. Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes. Am J Infect Control. 2013;41(9):1–4.
 26. da Costa Luciano C, Olson N, Tipple AFV, Alfa M. Evaluation of the ability of

- different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. *Am J Infect Control* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;44(11):e243–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.040>
27. D.J. Stickler,* J. B. King CW and SLM. Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *J Infect*. 1993;133–5.
 28. Mena Viveros N. Biofilms en otorrinolaringología. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2014;65(1):47–52.
 29. Andreu A. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23(SUPPL.4):15–21.
 30. Fang Y, Shen Z, Li L, Cao Y, Gu LY, Gu Q, et al. A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. *World J Gastroenterol*. 2010;16(8):1019–24.
 31. Vickery K, Pajkos A, Cossart Y. Removal of biofilm from endoscopes: Evaluation of detergent efficiency. *Am J Infect Control*. 2004;32(3):170–6.
 32. Russell H& A. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 5th ed. Adam P. Fraise, Jean-Yves Maillard SS, editor. West Sussex: John Wiley & Sons; 2012. 624 p.
 33. Aiassa V, Barnes AI Al. Macromolecular oxidation in planktonic population and biofilms of *Proteus mirabilis* exposed to ciprofloxacin. *Cell Biochem Biophys*. 2014;68:49-54.
 34. Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L DY. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr Microbiol*. 2016;73:474-82.
 35. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM G AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991;142:257-65.
 36. Gabrielson J, Hart M, Jarelöv A, Kühn I, McKenzie D MR. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Methods*. 2002;50:63-73.

9. ANEXOS

Anexo N° 1: Hoja técnica Detergente Multienzimático DM3 PLUS.

Anexo N° 2: Indicaciones de uso Detergente Multienzimático Aniosyme DLT.

Anexo N° 3: Indicaciones de uso Detergente Sertexime Multienzimático.

Anexo N° 4: Indicaciones de uso Detergente Multienzimático Pentadex.

Anexo N° 5: Indicaciones de uso Detergente Quirúrgico IQB polvo.

Anexo N° 6: Hoja técnica de Tripteína Soya Caldo y Tripteína Soya Agar.

Anexo N° 7: Composición de la solución reguladora de fosfato.

Anexo N° 8: Resolución Ministerio de Salud de la Nación 1547/2007.