

Evaluación in Vitro e in Situ de la Eficacia y Eficiencia de Productos para el proceso de Limpieza, Desinfección y Esterilización en Ambientes Veterinarios.

Palabras Clave: Amonio cuaternario, Antiviral, Citotoxicidad, Glutaraldehído, Microbicida, Proteasa.

Resumen

La presencia de microorganismos patógenos resistentes en instrumentos quirúrgicos y lugares donde se realizan procedimientos es un hecho muy común, este tipo de temas son muy importantes y robustos en humanos, por esta razón, el estudio de resistencia bacteriana es popular, el problema radica cuando se compara con áreas ganaderas, el problema es el mismo, pero menos estudio, esto representa una gran pérdida económica anual, ya que se ha reportado que en diferentes ambientes pecuarios los niveles de contaminación pueden alcanzar hasta el 82% en periodos de hasta 5 años, esto indica una necesidad de investigación, por eso el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad y eficiencia de los productos para el proceso de limpieza, desinfección y esterilización en ambientes veterinarios, el objetivo de esta investigación fue desarrollar diferentes metodologías, para realizar identificaciones microbiológicas previas, bioensayos con cuatro productos: 1) detergente monoenzimático (proteasa) y amonio cuaternario, 2) desinfectante de alto nivel detergente a base de glutaraldehído potencializado (0,17%) y amonio cuaternario, 3) detergente desinfectante de áreas amplias a base de amonio cuaternario con fragancia a pomelo y 4) detergente desinfectante de mobiliario a base de amonio cuaternario. Además, se determinaron las actividades citotóxicas, extracelulares e in situ, a partir de las cuales se pudo concluir que todos los productos evaluados tienen actividad bactericida, fungicida y virucida, sin afectar las células o tejidos donde se encontraron los microorganismos.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) y expertos internacionales de salud pública, sanidad animal y medio ambiente declararon la resistencia de bacterias a los antibióticos, junto al virus de la rabia y la influenza de origen animal, como las tres principales amenazas mundiales emergentes (FAO et al. 2011). Desde los años 70, la resistencia bacteriana viene acompañada de la aparición de enfermedades nuevas u ocultas que se caracterizan por su carácter zoonótico y pandémico.

Este fenómeno adquiere mayores dimensiones en el ambiente hospitalario, debido a la presión ejercida por el uso de los antimicrobianos, promoviendo la selección y acumulación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas residentes (Sahoo et al., 2010). Esta situación ha hecho que la resistencia a los antibióticos haya pasado a ser considerada por algunos países y por los organismos internacionales antes mencionados, un desafío mundial por dos motivos: a) la capacidad de las bacterias de transmitir información genética y b) la globalización que facilita enormemente la posibilidad de difundir esa resistencia en cortos períodos (Andrews 2013).

En los hospitales, esta resistencia tiene un alto impacto sobre las tasas de morbilidad y mortalidad, debido a que limita las opciones terapéuticas e



Journal of Veterinary Science & Medicine

Adiela María Cortés Cortés¹, Jhon Henry Galvis García^{1*} and Marco Tulio Jaramillo Salzar²

¹Research and Development Department, Alkamedica S.A.S. Villamaria, The Republic of Colombia

²University of Caldas, GEAS Group, The Republic of Colombia

*Address for Correspondence

Jhon Henry Galvis García, Research and Development Department, Technical Director, Alkamedica S.A.S. Villamaria, The Republic of Colombia, E-mail: liderproyectos@alkamedica.com

Submission: September 05, 2017

Accepted: September 28, 2017

Published: October 04, 2017

Copyright: © 2017 Cortés AM, et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

incrementa los costos por concepto de terapia alternativa y estadía hospitalaria. Se considera que las infecciones intrahospitalarias conllevan un costo de US\$ 28.4 a 33.8 billones en Estados Unidos y que el 70% de ellas son causadas por microorganismos resistentes, en un momento donde las enfermedades infecciosas constituyen la principal causa de mortalidad en países de ingresos bajos, tanto en humanos como en animales (Scott 2009).

A finales del siglo XX hasta la actualidad, inicia en los países desarrollados la preocupación por la resistencia microbiana a nivel veterinario y la relación entre antibióticos de uso animal y el impacto en la salud pública, por lo anterior, la OIE publicó en el 2003 los estándares internacionales sobre resistencia antimicrobiana, donde ofrece una guía para la vigilancia de la resistencia y el establecimiento de programas de control (Comité Internacional de la OIE 2003). En el 2008 un estudio realizado a 31 hospitales de enseñanza veterinaria de los Estados Unidos acreditados por la AVMA (American Veterinary Medical Association), reporta que el 82% de estos hospitales ha presentado brotes de infección nosocomial durante los 5 años anteriores (Benedict et al. 2008).

En Alemania, se ha identificado un incremento en la prevalencia de *Acinetobacter baumannii* multirresistente en animales hospitalizados en la clínica veterinaria de la Universidad Justus-Liebig de Giessen y en otras clínicas de la ciudad durante un período de 9 años, donde registros del 2000 al 2008 del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de esta Universidad, muestran que de 137 animales hospitalizados de diferente especie, 56 adquirieron infecciones por *Acinetobacter* spp., identificados y diferenciados por combinación de métodos genotípicos y susceptibilidad a los antimicrobianos (Zordan et al. 2011).

Las fuentes de infecciones asociadas a los hospitales incluyen el personal médico, la propia flora del paciente y objetos inanimados. Investigaciones realizadas por el Colegio Veterinario de Ontario, Canadá (CVO), determinaron la prevalencia de contaminación de teléfonos celulares portados por el personal del centro de ciencias de la salud del CVO con SPRM (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina) y SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), donde el 1,6% correspondió a SPRM y el 0,8% a SARM (Zordan et al. 2011).

Los agentes que provocan las enfermedades infecciosas, o agentes patógenos, son muy variados. Los más comunes son virus, bacterias y protozoos, además de parásitos que no son microorganismos, como los ácaros, helmintos o gusanos. En el área veterinaria es de máxima importancia el

diagnóstico oportuno de muchas de estas enfermedades infecciosas, ya que permiten identificar a tiempo el agente patógeno causal y asegurar un correcto tratamiento para garantizar el buen estado de salud del animal motivo de la consulta (Castro 2008; González et al. 2013).

Entre las enfermedades que con más frecuencia se diagnostican está la: Leucemia Viral Felina, Moquillo canino, Parvovirus canina, Ehrlichia, Anaplasma, Inmunodeficiencia Felina (FIV o VIF), Brucelosis, Encefalitis equina, Actinobacillus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae, Virus de aftosa y Aujeszky, Parásitos intestinales, infecciones en oído, piel y orina. En la actualidad existe variedad de pruebas rápidas que permiten identificar el agente causante de la infección, las cuales han permitido conocer la prevalencia de muchas de estas enfermedades, debido principalmente a las prácticas de esterilización del ambiente veterinario (Schudel 2002; Beyli et al 2012).

Las infecciones de origen hospitalario son un importante problema, el cual ha sido documentado en el caso de la medicina humana, sin embargo, no han sido bien documentados en el caso de la medicina veterinaria. Los microorganismos asociados al ambiente hospitalario son generalmente resistentes a un importante número de antibióticos y productos utilizados para la limpieza y desinfección, causando importantes gastos asociados a su tratamiento, así como al incremento de los periodos de hospitalización (Haenni et al. 2012).

Por todo ello, es fundamental asegurar un ambiente limpio, proporcionando el mejor cuidado posible a todos sus pacientes, así como protección al personal que desarrolla sus tareas en él. La profesionalización de los sectores de producción y los estudios científicos que demuestran su utilidad, han hecho que los propios sectores y las administraciones incluyan programas de alcance nacional, muchas veces obligatorios, para el control y erradicación de muchas enfermedades infecciosas. La bioseguridad incluye un conjunto de medidas que tienen como propósito impedir la entrada de agentes patógenos en una explotación y, según el caso, frenar o impedir su difusión en ella y a otras vecinas, así como minimizar el riesgo (si existe) para los empleados. Las prácticas de limpieza y desinfección forman parte principal de los programas y cada día son más importantes (Haenni et al. 2012).

De acuerdo con lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo la evaluación de la eficacia y eficiencia de productos para el proceso de limpieza, desinfección y desinfección de alto nivel en ambientes veterinarios, cuya composición mayoritaria son amonios cuaternarios de última generación, enzimas (proteasa) y glutaraldehído.

Materiales y Métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en 6 clínicas y centros veterinarios de referencia en la ciudad de Manizales, de las cuales, por razones de confidencialidad, no se divulgará información correspondiente al personal ni de la razón social de las instituciones que avalaron la investigación. En cada lugar, se tomaron muestras (Hisopados), por triplicado, de áreas como consulta externa, hospitalización, cirugía, laboratorio, guardería y peluquería de clínicas y centros veterinarios siguiendo la notación y metodología del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al. 2005).

Identificación microbiológica parcial.

Se determinó la prevalencia de microorganismos presentes en los sitios de estudio, los cuales son causantes de las principales manifestaciones clínicas, específicamente, en caninos, felinos, porcinos, equinos, entre otros. Las identificaciones se realizaron de acuerdo con la notación y metodología de Madigan et al. (2003).

Bioensayos in vitro.

Actividad citotóxica.

La evaluación de la actividad citotóxica in vitro de los productos a base de amonio cuaternario, enzimas (Proteasa) y glutaraldehído, se realizó mediante bioensayos in vitro, a una concentración de 100.000 células/mL, en medio de cultivo RPMI-1640 con cada uno de los productos a base de detergente monoenzimático (proteasa) y amonio cuaternario, detergente desinfectante de alto nivel a base de glutaraldehído potencializado y amonio cuaternario, detergente desinfectante de amplias superficies a base de amonio cuaternario con fragancia a pomelo y detergente desinfectante de mobiliario a base de amonio cuaternario, los cuales fueron preparados de acuerdo a la ficha técnica del fabricante. El efecto se determinó mediante espectrofotometría a 570 nm de emisión. Como control de viabilidad se usaron células cultivadas en ausencia de los productos (Sundstrom & Nilsson 1976; Haenni et al. 2012).

Actividad antiviral

La evaluación de la actividad antiviral se realizó en tejido de cultivo de embrión de pollo suplementado con SFB (10%), mediante determinación de viabilidad celular por el método de Rojo Neutro (Wyde et al. 1993, Swierkosz & Biron 1995), utilizando placas de 96 pozos. En este ensayo se adicionaron 100 mL de medio de cultivo que contenían las formulaciones de los productos a evaluar. Después de 90 min de incubación a 37°C, se añadieron 10 mL/pozo de las suspensiones virales (ATCC CCL-34 y ATCC VR-2299). Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, durante 5 días (Hitoshi et al. 1991; Haenni et al. 2012).

Actividad antiviral extracelular

Para determinar la inactivación directa las partículas de ATCC CCL-34 y ATCC VR-2299, se procedió a mezclar volúmenes iguales de cada una de las cepas (independientes) y concentraciones dobles de los productos a evaluar, incubándose durante 30 min a 37°C. Al cabo de este tiempo, cada mezcla fue añadida a los cultivos celulares de embrión de pollo (50 mL/pozo), en placas de 96 pozos, empleando 4 réplicas por cada concentración. A los 5 días de incubación a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, se procedió a determinar la actividad antiviral por el método del rojo neutro (CE50). El experimento se realizó por triplicado (Hitoshi et al. 1991; Haenni et al. 2012).

Bioensayos in situ

Se aplicaron los productos en cada una de las áreas de los centros e instituciones veterinarias y ambientes agropecuarios. Las formulaciones se realizaron de acuerdo a la ficha técnica de los productos, adicionalmente el protocolo de uso se realizó de acuerdo a las especificaciones y recomendaciones del fabricante. Con el fin de evaluar la prevalencia (presencia/ausencia) de microorganismos, se recolectaron muestras (hisopado) antes y después de la aplicación de los productos, evaluando la limpieza y desinfección por medio de Luminometría (SystemSURE Plus) (Costa et al. 2004, Boyce et al. 2009, Dávila-Ramírez et al. 2014).

Los hisopos fueron almacenados de acuerdo con la notación y metodología del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al. 2005), los cuales fueron transportados al Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad de Caldas. Las muestras fueron incubadas en agar y caldo nutritivo, ambos formulados con los tratamientos de interés, durante 24 horas a 37°C. Como control de efectividad, tanto el agar como el caldo nutritivo, se formularon con Ampicilina-Sulbactam y Anfotericina B[®] (Madigan et al. 2003, EUCAST 2011) y como control de viabilidad se formuló el agar en ausencia de los productos evaluados. Posterior al periodo de incubación, en el medio sólido, se evaluó el crecimiento de microorganismos por medio de colonias (Madigan et al. 2003). En el medio líquido, se evaluó el crecimiento microbiano por medio de la turbidez medida por espectrofotometría de acuerdo con la escala 0,5 de McFarland (1970).

Resultados

Identificación bacteriana preliminar

La identificación se realizó de las muestras obtenidas de áreas críticas (e. g. Hospitalización, cirugía y consulta externa). Se realizó la incubación a 35°C durante 72 horas en agar nutritivo. Cumplido este tiempo, se logró la identificación cualitativa de estos microorganismos por medio de tinción de gram. Se observaron tonos marrones, característico de microorganismos del género *Bacillus* y *Staphylococcus*, de igual forma, se observó coloración roja/violeta específico de bacterias gram positivas. Adicionalmente, se identificó la posición de la espora, parámetro importante con el fin de identificar la especie probable de *Bacillus* presente en las muestras analizadas (Figura 1). Todas las bacterias presentaron la espora en posición central, de forma oval o cilíndrica y esporangio no distendido (Tabla 1).

Los productos evaluados presentaron potencial antimicrobiano, así como los controles de efectividad (ampicilina / sulbactam y anfotericina B®). Se identificó una mayor inhibición en contacto con **P1** (detergente bactericida monoenzimático, dosis soluble en agua de 20 g), **P2** (Desinfectante de Alto Nivel, Glutaraldehído Potencializado al 0.17%, pH = 6), **P3** (detergente desinfectante, quinta generación de amonio cuaternario 30, 50 g / Kg, pH = 5,0 en 750 ml) y **P4** (detergente desinfectante de superficie, amonio cuaternario de quinta generación, dosis soluble en agua de 5 ml con aroma a fruta de uva). Se resalta la mayor actividad de los productos en contraste con los controles (Figura 2). Con respecto al objetivo, se evidencia el crecimiento microbiano en la solución que carece de los productos evaluados y los controles de efectividad.

Bioensayos

Actividad biológica in vitro e in situ

Se realizó la siembra del producto de los hisopados en medios de cultivo no selectivos (RPMI 1640, agar y caldo nutritivo) para los análisis in vivo e in situ. Posterior al tiempo de incubación (24 horas y 5 días a 37°C), se evidenció actividad bactericida, fungicida y antiviral de todos los productos evaluados, siendo el producto monoenzimático la formulación que presentó mayor actividad, en relación con el tiempo y a la actividad

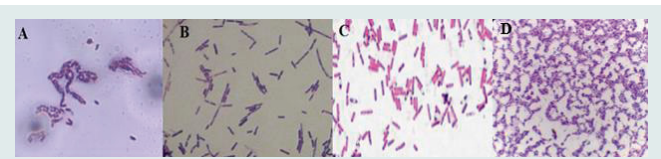


Figura 1: Identificación de *Bacillus* tinción de gram.
A. Hospitalización, B. Cirugía, C. Consulta externa y D. Sala de sacrificio.

Tabla 1: Características de especies representativas del género *Bacillus* tomado de Madigan 2003.

Espora oval o cilíndrica, aerobios facultativos; hidrolizan caseína y almidón; esporangio no distendido, pared de la espora delgada.		
Característica	Especie	Posición Espora
Mesófilos	<i>B. licheniformis</i>	Central
	<i>B. cereus</i>	Central
	<i>B. anthracis</i>	Central
	<i>B. megaterium</i>	Central
	<i>B. subtilis</i>	Central
	<i>B. thuringensis</i>	Central

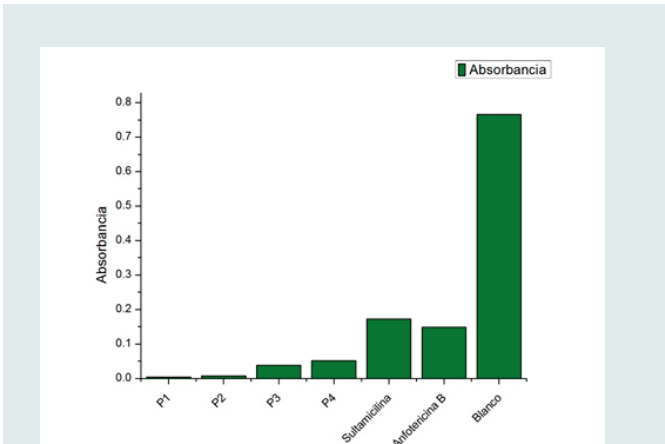


Figura 2: Actividad antimicrobiana de los tratamientos evaluados.
P1 Detergente monoenzimático bactericida (Dosis hidrosoluble),
P2 Desinfectante de alto nivel (Glutaraldehído 0,17%),
P3 Detergente desinfectante (Amonio cuaternario-750mL) y
P4 Detergente desinfectante de superficies (Dosis hidrosoluble).

evaluada, seguido por el producto a base de glutaraldehído potencializado (0,17%), amonio cuaternario para mobiliario y detergente desinfectante de superficies.

Los controles de efectividad utilizados, tanto para la actividad antibacteriana (Ampicilina/Sulbactam) como para la actividad antimicótica (Anfotericina B®), formulados de acuerdo con la notación y metodología propuesta por European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2011), evidenciaron la ausencia del crecimiento de los microorganismos colectados por medio del hisopado, después de 10 minutos de transcurrido el bioensayo.

Actividad antiviral in vitro

Se evidenció ausencia del crecimiento de las cepas evaluadas (ATCC CCL-34 y ATCC VR-2209), reportando (Concentración Efectiva Media) CE50 desde 0,0186 µg/mL hasta 0,0901 µg/mL de los productos evaluados (Tabla 1). De acuerdo a los datos de la (Concentración Letal Media) CL50, se evidenció la baja toxicidad generada sobre las células de embrión de pollo, utilizadas para el establecimiento de los organismos ensayo, respecto a los cultivos no tratados ($p < 0,05$) (Tabla 2).

La variabilidad en la actividad virucida, puede deberse a la variante en concentración de los componentes presentes en los productos. La acción virucida extracelular, dada por el hecho de que a bajas concentraciones del producto ($0,0186 \pm 0,1$ mg/mL), indica inhibición en la replicación viral. Debido a la no toxicidad sobre las células de cultivo para el caso del detergente monoenzimático (dosis hidrosoluble de 20g), no fue posible calcular el Índice de Selectividad.

Respecto al proceso de limpieza y desinfección evaluado in situ por medio de la luminometría, se evidencia la eliminación de microorganismos en diferentes ambientes veterinarios (Consulta externa, hospitalización, cirugía, laboratorio, guardería y peluquería), donde, se colectó el hisopado de mesones, áreas de alimentación (bebederos y comederos), instrumental quirúrgico, entre otros; reportando valores iniciales de 3855 URL (Prevía a la utilización de los productos) y finales de 28,0 URL (Posterior a la aplicación de los productos, sin el tiempo mínimo de contacto) (Tabla 3).

Tabla 2: Actividad citotóxica y antiviral *in vitro* de los productos evaluados.

aNombre producto	bLC ₅₀ (µg/mL) 0 ± SD	cEC ₅₀ (µg/mL) 0 ± SD		dÍndice selectividad (SI)	
		ATCC CCL-34	ATCC VR-2209	ATCC CCL-34	ATCC VR-2209
P1	> 200	0,0186 ± 0,1	0,0201 ± 0,1	DN	DN
P2	32,60 ± 0,1	0,0370 ± 0,1	0,0264 ± 0,1	881,08	1,2 x 10 ³
P3	177,66 ± 0,1	0,0572 ± 0,1	0,0400 ± 0,1	3,1 x 10 ³	4,44 x 10 ³
P4	81,47 ± 0,1	0,0901 ± 0,1	0,0734 ± 0,1	904,21	1,1 x 10 ³

a. P1: Detergente monoenzimático bactericida (Dosis hidrosoluble), P2: Desinfectante de alto nivel (Glutaraldehído 0,17%), P3: Detergente desinfectante (Amonio cuaternario-750mL) y P4: : Detergente desinfectante de superficies (Dosis hidrosoluble). b. LC₅₀: Concentración Letal Media; c. EC₅₀: Concentración Efectiva Media; d. ND: Dato No Calculado.

Tabla 3: Evaluación de los procesos de limpieza y desinfección de los productos evaluados en diferentes áreas de las clínicas, centros veterinarios y ambientes pecuarios.

Area	Unidad de Muestra	a Iniciales URL	abURL Finales			
			P1	P2	P3	P4
Consulta Externa	Mesón	1835	0,0	0,0	0,0	0,0
Hospitalización	Cánula	629	0,0	0,0	0,0	0,0
	Mesón	1047	0,0	0,0	0,0	0,0
Cirugía	Escalpelo	1633	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pinzas	1062	0,0	0,0	0,0	0,0
Laboratorio	Cajas de petri	486	0,0	0,0	0,0	0,0
	Autoclave	1773	0,0	0,0	0,0	0,0
	Mesón	830	0,0	0,0	0,0	0,0
Guardería	Guacal	3409	35,0	28,0	42,0	44,0
	Bebedores	3010	40,0	30,0	53,0	52,0
	Comedores	3855	40,0	33,0	47,0	48,0
Peluquería	Peines	496	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tinas	2841	0,0	0,0	0,0	0,0
	Baldes	296	0,0	0,0	0,0	0,0

a. URL: Unidades Relativas de Luz; b. Productos evaluados por fuera del tiempo indicado por la ficha técnica para los procesos de limpieza y desinfección (< 1 min de aplicación de los productos).

Discusión

La presente investigación demuestra la actividad biológica tanto *in vitro* como *in situ* de los productos para limpieza, desinfección y esterilización contra bacterias, hongos y virus causantes de patologías en ambientes veterinarios y pecuarios, donde, uno de los criterios más usados para considerar la efectividad de un producto antiviral, es la obtención de un valor de índice de selectividad por encima de 10,18.

El hecho de que el índice de selectividad (IS) sea mayor en el experimento virucida, cuando se incuban las células desde 1 hora previo a la infección, demuestra la potente acción virucida de cada uno de los productos. Estos resultados indican la capacidad de reducir el título infectivo en 2 logaritmos (Log2). Por otro lado, no se descartan otros posibles mecanismos de inhibición presentes, junto al hecho de la cantidad de compuestos activos en los productos evaluados en los ensayos.

De acuerdo a los datos reportados por medio de la luminometría, se evidencia la alta eficiencia y eficacia en la eliminación de materia orgánica

y microorganismos en diferentes ubicaciones en los sitios de estudio, destacando que los productos no fueron evaluados en el tiempo requerido e indicado por la ficha técnica, sin embargo, se determinó la disminución en la actividad evaluada, donde, para los ambientes veterinarios la máxima medición luminométrica (3855 URLs), verificó una disminución de la materia orgánica y de microorganismos hasta del 98,76% (48,0 URLs), denotando una reducción en la materia orgánica y en la presencia de microorganismos en las superficies.

El hecho de que, a los 2 minutos al inicio del bioensayo y 3 días de tratamiento, el ensayo al que se le suministró el detergente monoenzimático en dosis hidrosoluble de 20g (0,5%) (Recomendaciones del fabricante), haya mostrado tanto una inhibición de los virus, como una reducción significativa de la replicación con respecto al grupo control, sugiere la presencia de un efecto protector, ante la infección provocada, lo cual apoya la actividad antiviral obtenida.

En futuros estudios, se recomienda la evaluación *in vivo*, verificando la vía de administración.

References

1. FAO, OIE, OMS (2011) Communiqué No 11/317. UN Bulletin: Headquarters of the high level technical meeting on zoonotic diseases. Mexico, Cuba, Dominican Republic: United Nations Information Center.
2. Sahoo KC, Tamhankar AJ, Johansson E, Lundborg CS (2010) Antibiotic use, resistance development and environmental factors: a qualitative study among healthcare professionals in Orissa, India. BMC Public Health 10: 629.
3. Andrews B (2013) Antimicrobial use in animal husbandry and its relationship to resistant bacteria in human health. In: OIE International standards on antimicrobial resistance. Paris.
4. Scott RD (2009) The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention. Atlanta, GA: division of healthcare quality promotion national center for preparedness, detection, and control of infectious diseases coordinating center for infectious diseases centers for disease control and prevention.
5. International Committee of the OIE (2003) Resolutions. Guidelines for the control of antimicrobial resistance. Paris.
6. Benedict KM, Morley PS, Van Metre DC (2008) Characteristics of biosecurity and infection control programs at veterinary teaching hospitals. J Am Vet Med Assoc 233: 767-773.
7. Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R, van der Reijden T, van den Broek P, et al. (2011) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. Emerg Infect Dis 17: 1751-1755.
8. Castro NA (2008) Retrospective epidemiological study of feline viral leukemia-LVF-of the cases referred to the veterinary clinical laboratory Zoolab in the city of Santiago de Cali between February of 2006 and June of 2008.
9. González CM, Villegas CL (2013) Prevalence of gastrointestinal parasites of canines and felines of the city of Cali sent to the veterinary clinical laboratory Zoolab.
10. Schudel AA (2002) Infectious diseases of animals. Science journal today online. 11: 143-156.
11. Beyli ME, Brunori J, Campagna D, Cottura G, Crespo D, et al. (2012) Buenas prácticas pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 19-33.
12. Haenni M, Ponsin C, Metayer V, Medaille C, Madec JY (2012) Veterinary hospital-acquired infections in pets with a ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone. J Antimicrob Chemother 67: 770-771.

ISSN: 2325-4645

13. APHA, AWWA, WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21stedn), American Public Health Association, Washington, USA.
14. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2003) Brock: biología de los microorganismos. Pearson prentice hall editores. Madrid.
15. Sundstrom C, Nilsson K (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int J Cancer 17: 565-577.
16. Wyde PR, Ambrose MW, Meyerson LR, Gilbert BE (1993) The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymer against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. Antiviral Res 20: 145-154.
17. Swierkosz E, Biron K (1995) Antiviral susceptibility testing. En: David A. Lennette, Edwin H, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infections (7thedn). Am Public Heal Ass pp. 139-154.
18. Takeuchi H, Baba M, Shigeta S (1991) An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. J Virol Methods 33: 61-71.
19. Boyce JM, Havill NL, Dumigan DG, Golebiewski M, Balogun O, et al. (2009) Monitoring the effectiveness of hospital cleaning practices by use of an adenosine triphosphate bioluminescence assay. Infect Control Hosp Epidemiol 30: 678-684.
20. Dvvilla-Ramriez FA, Díaz-Villamil NT, Fajardo-Granados D, Jiménez-Cruz C (2014) Quality of cleaning on surgery room by adenosin triphosphate luminometry. Rev Gerenc Polít Salud 13: 266-273.
21. Mc Farland J (1907) The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA XLIX: 1176-1178.
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2011) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. pp. 1-68.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los centros, clínicas veterinarias e Instituciones de Educación Superior por brindar los espacios, el tiempo y confianza para la divulgación de los resultados, sin atentar a los términos de confidencialidad pactados.