

Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal

J. Rueda, J.A. Amigot Lázaro & J. Ducha

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, C/Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, España

Remitido el 4 de abril de 2001

Aceptado el 7 de noviembre de 2001

Resumen

Los autores evalúan dos compuestos de amonio cuaternario, de primera y segunda generación, mediante tres métodos: concentración mínima bactericida, test de suspensión de la sociedad Alemana de Higiene y Microbiología y test de difusión en placa, frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* de origen ovino y porcino.

Los resultados obtenidos demuestran la mayor eficacia de los compuestos de amonio cuaternario de cadenas dodecil frente al cloruro de benzalconio, y la mayor efectividad de los compuestos de amonio cuaternario frente a bacterias Gram-positivas. No se ha podido detectar ningún tipo de resistencia asociada a las cepas utilizadas en este trabajo. Finalmente, los autores demuestran la validez de las tres técnicas como adecuadas para la valoración de desinfectantes de amonio cuaternario.

Palabras clave

Amonio cuaternario – Animal – Bacteria – Desinfectante – *Enterococcus faecalis* – *Escherichia coli* – Método de pruebas – *Pseudomonas aeruginosa* – *Staphylococcus aureus*.

Introducción

Los compuestos de amonio cuaternario son habitualmente utilizados como desinfectantes en medicina humana, en ganadería y en la industria alimentaria, lo que unido a su baja toxicidad y su excelente eficacia frente a gérmenes Gram-positivos principalmente, hace que la cuota en el mercado de estos agentes sea elevada dentro de los desinfectantes empleados, ya que utilizados en soluciones acuosas o mezclados con detergentes, pueden combinar la limpieza y desinfección en una sola aplicación (13). Su modo de acción consiste en unirse de una forma irreversible a los fosfolípidos y proteínas de la membrana, dañando su permeabilidad (18).

Debido a su amplia difusión como desinfectantes, estos compuestos han experimentado una rápida evolución y desarrollo, encontrándose en la actualidad agentes de amonio cuaternario con cadenas dodecil más modernos y ya comercializados, con una acción antimicrobiana más potente, un mayor espectro de actividad y una más baja toxicidad.

Numerosos estudios indican que la actividad de estos compuestos, así como sus propiedades físico-químicas, vienen determinadas por la longitud de sus cadenas químicas, por lo que se demuestra una mayor eficacia frente a agentes Gram-positivos que frente a Gram-negativos (3, 11, 17, 19, 20, 21). En este sentido, autores como Vievskii (31, 32) ponen de manifiesto que los compuestos de amonio cuaternario dodecil son más eficaces que los de cadenas hexadecil y octadecil. Se hace por tanto imprescindible conocer mejor el comportamiento de estos agentes en cepas de campo no estandarizadas de ovinos y porcinos. En el presente trabajo se compara la actividad antimicrobiana del cloruro de benzalconio con otro compuesto de amonio cuaternario de cadena más larga.

Otro aspecto que se ha de tener en cuenta en la valoración de desinfectantes, es comprobar que a las dosis comerciales recomendadas por el fabricante (dosis variables en función de la riqueza de desinfectante en la dilución comercial), el producto es efectivo, pues se puede sobrepasar un límite, en

ocasiones no muy bien definido, y producir una toxicidad no deseada, cuestión planteada en este trabajo.

Es conveniente destacar también, la posible existencia de bacterias resistentes a estos agentes, como lo demuestran los estudios de Tennent y col. (30), Jones y col. (12), Alexander y col. (1) y Langsrud y Sundheim (14), por lo que en el presente ensayo se estudiará la resistencia de los microorganismos probados frente a estos desinfectantes.

Es importante evaluar distintas técnicas de valoración de desinfectantes para averiguar si son comparables, así cada grupo de autores propugna una técnica u otra, en virtud de sus características técnicas. Así, mientras Reybrouck (23), Bloomfield y col. (5) y Bloomfield y Looney (6) estudian la valoración de desinfectantes apoyándose en las técnicas de suspensión, otros investigadores con anterioridad, y basándose en la facilidad técnica, utilizan sistemas de evaluación de difusión en agar (2, 4, 9, 10), por lo que en el presente trabajo se determina la posible correlación existente entre los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de valoración de desinfectantes utilizadas: concentración mínima bactericida (CMB), test de suspensión de la Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: DGHM) y método de difusión en agar (4, 10, 25).

Material y métodos

El material utilizado en este ensayo es el siguiente:

a) Desinfectantes:

– desinfectante A: solución de cloruro de benzalconio al 70% de pureza (para la expresión de las diluciones, se considera una pureza teórica del producto del 100%). Las diluciones se realizan mediante agua destilada estéril en matraces esterilizados igualmente;

– desinfectante B: solución de cloruro de didecil dimetil amonio en proporción del 50%, isopropilo en un 30% y un 20% de agua como componente inerte. Las diluciones correspondientes también se llevan a cabo en agua destilada estéril.

b) Bacterias: los estudios se realizan con cinco cepas de campo tomadas de procesos infecciosos procedentes de distintas explotaciones de ovino y porcino de Aragón. Se utilizan cinco cepas de cada una de las siguientes especies bacterianas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias Gram-negativas y *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, bacterias Gram-positivas.

Los métodos empleados para probar la actividad de estos dos desinfectantes de amonio cuaternario y poder comparar su acción antibacteriana, se describen a continuación:

a) Concentración mínima bactericida llevada a cabo en medio líquido (24, 25). El medio de cultivo utilizado fue caldo

nutritivo (Difco) y la suspensión bacteriana de partida era de una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonias [UFC]/ml a temperatura ambiente (20°C).

b) Test de suspensión DGHM (23, 25) partiendo de una suspensión bacteriana de igual concentración a la del anterior ensayo (1×10^8 UFC/ml). Los tiempos de contacto se fijan en 2,5 min, 5 min, 15 min y 30 min y el contacto entre bacterias y desinfectante se lleva a cabo a temperatura ambiente.

c) Método de difusión en agar, siguiendo las recomendaciones de El-Nakeeb (4, 10). La concentración de la suspensión bacteriana de partida es la misma que en los anteriores ensayos (1×10^8 UFC/ml). El medio utilizado para la difusión en agar es el medio N° 11 para antibiogramas Merck, propuesto por Delmotte y Beumer (9), con un pH final de 8 (4, 10) en un volumen final de 20 ml de agar por placa.

La lectura de los resultados se lleva a cabo considerando halos de diámetro mayor de 9 mm como dilución del desinfectante activa frente a la suspensión bacteriana utilizada, y halos menores de 9 mm como solución no activa (9).

Resultados

En el Cuadro I se muestran las concentraciones obtenidas con ambos desinfectantes (A y B) con el método de CMB, expresadas en partes por millón (ppm) (mg/L), frente a las cuatro especies bacterianas ensayadas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*), indicando las medias y desviaciones de las cinco cepas de cada especie.

Cuadro I
Concentraciones medias (en ppm-mg/L) obtenidas en las distintas especies de bacterias frente a los dos desinfectantes con el método de la concentración mínima bactericida

Especies	[Desinfectante A] ± DS	[Desinfectante B] ± DS
<i>Escherichia coli</i>	3.000 ± 0	240 ± 207,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.900 ± 1.244,9	430 ± 148,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	310 ± 245,9	42 ± 24,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	340 ± 89,4	80 ± 24,5

DS: desviación estándar

Asimismo, en el Cuadro II se expresan los resultados obtenidos con el método DGHM, señalando la concentración efectiva frente a la especie usada en 2,5 mn de tiempo de contacto (tiempo mínimo) y la mínima concentración que resultó ser efectiva al tiempo de contacto indicado (5, 15 o 30 mn).

En el Cuadro III aparecen las medias de las concentraciones obtenidas con el método de difusión en agar de las cuatro

Cuadro II
Concentraciones efectivas (en ppm) obtenidas en las distintas cepas de las cuatro especies de bacterias frente a los dos desinfectantes con el test de suspensión alemán (DGHM)

Especies	Cepas	[Desinfectante A] a 2,5 min de contacto	[Desinfectante A] (minutos de contacto)	[Desinfectante B] a 2,5 min de contacto	[Desinfectante B] (minutos de contacto)
<i>Escherichia coli</i>	1	1.450	1.250 (30)	400	300 (15)
	2	2.000	1.000 (15)	300	200 (15)
	3	1.000	750 (5)	350	200 (5)
	4	1.000	750 (5)	150	100 (30)
	5	1.450	1.000 (5)	150	150 (30)
	Media	1.380 ± 413,2		270 ± 115,1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	5.000	1.500 (15)	500	150 (15)
	2	3.000	1.000 (5)	250	150 (30)
	3	2.500	2.000 (5)	250	150 (15)
	4	3.000	1.250 (15)	300	250 (15)
	5	2.000	1.000 (15)	300	200 (15)
	Media	3.100 ± 1.140,2		320 ± 103,7	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	300	100 (5)	40	30 (5)
	2	300	100 (5)	100	100 (2,5)
	3	300	150 (15)	30	20 (30)
	4	300	100 (30)	80	50 (15)
	5	300	300 (2,5)	80	80 (2,5)
	Media	300 ± 0		66 ± 29,7	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	250	150 (30)	30	30 (2,5)
	2	250	150 (15)	30	15 (30)
	3	150	75 (5)	10	10 (2,5)
	4	200	75 (30)	100	15 (30)
	5	200	75 (30)	30	20 (15)
	Media	210 ± 41,8		40 ± 34,6	

DGHM: Deutsche Gessellschaft für Hygiene und Mikrobiologie

Cuadro III
Concentraciones medias (en ppm) obtenidas en las distintas especies de bacterias frente a los dos desinfectantes con el método de la difusión en agar

Especies	[Desinfectante A] ± DS	[Desinfectante B] ± DS
<i>Escherichia coli</i>	850 ± 223,6	216 ± 115,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.630 ± 347,5	320 ± 109,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	150 ± 0	28 ± 10,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	200 ± 61,2	76 ± 72,6

DS: desviación estándar

especies probadas frente a los dos desinfectantes. Y finalmente en el Cuadro IV se indican los coeficientes de correlación entre los datos obtenidos en las distintas técnicas y con los dos desinfectantes probados.

En el Cuadro V se expresan las correlaciones entre las diferentes cepas (cinco) de cada especie bacteriana entre sí.

Con el fin de no eliminar ningún dato y dado que se utiliza un número de cepas bajo, se obtienen en algunos casos desviaciones elevadas en los ensayos. No obstante, indican principalmente los rangos dentro de los que se trabaja, obviando las desviaciones en los casos en que sean elevadas.

Cuadro IV
Coefficientes de correlación entre los resultados (datos y medias de los mismos) obtenidos utilizando las distintas técnicas y con los dos desinfectantes probados

		CMB-DGHM	CMB-Difusión	DGHM-Difusión
Desinfectante A	Datos	0,75	0,96	0,78
	Medias	0,98	0,99	1
Desinfectante B	Datos	0,82	0,72	0,69
	Medias	0,94	0,99	0,96
Totales	Datos	0,82	0,96	0,83
	Medias	0,99	0,99	0,99

CMB: concentración mínima bactericida
 DGHM: prueba de suspensión del Deutsche Gessellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; para éste método las medias obtenidas son al menor tiempo de contacto (2,5 min)
 Difusión: método de difusión en agar

Cuadro V
Correlaciones entre las distintas cepas probadas (cinco) de cada microorganismo entre sí

(La correlación mínima, para ser significativa con un 95% de confianza, es de 0,81 en todos los casos)

Cepas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
I-V	0,98	0,55	0,98	0,90
I-IV	0,98	0,75	0,98	0,82
I-III	0,95	0,68	0,64	0,86
I-II	0,97	0,77	0,97	0,79
II-V	0,98	0,95	0,98	0,76
II-IV	0,94	0,99	1	0,62
II-III	0,91	0,98	0,60	0,88
III-V	0,96	0,98	0,63	0,93
III-IV	0,98	0,99	0,63	0,88
IV-V	0,99	0,96	0,99	0,82

Discusión

Trabajando de forma genérica, con diferentes especies bacterianas, los datos obtenidos por Murray y col. (19) determinan una mayor eficacia de los compuestos de amonio cuaternario frente a agentes Gram-positivos que frente a Gram-negativos. Esto aparece también en nuestros resultados, en los que se observa que son unas diez veces más efectivos, trabajando con cualquiera de los dos compuestos de amonio cuaternario probados en el trabajo. En estos resultados también se evidencia que el compuesto de amonio cuaternario dodecil es más eficaz que el cloruro de benzalconio, como indica Vievskii (31, 32).

Algunos autores citan como factores importantes en la actividad antimicrobiana de los compuestos de amonio cuaternario la longitud de la cadena de los radicales que sustituyen las valencias del nitrógeno en los amonios cuaternarios. Makino y col. (17) y Vievskii (31, 32) encuentran que las cadenas dodecil muestran un mejor efecto microbicida que las hexadecil y octadecil. En otro trabajo, y coincidiendo con los anteriores, Antoniadou-Vyza y col. (3) señalan la diferente actividad de estos compuestos dependiendo de la longitud de las cadenas de los radicales que se unen al nitrógeno.

Otro ejemplo lo hallamos en los resultados de Papafrangas y col. (21), quienes encuentran concentraciones efectivas entre 2.000 y 10.000 ppm para agentes Gram-positivos (*S. aureus*) y 10.000 ppm para agentes Gram-negativos (*P. aeruginosa*). En nuestro trabajo, la mayor concentración efectiva frente a un agente Gram-positivo es de 340 ppm (para *E. faecalis* con el compuesto de amonio cuaternario de primera generación por el método CMB), y frente a un agente Gram-negativo es de 4.900 ppm (para *P. aeruginosa* en las mismas condiciones). Esto hace que nuestros resultados sean de menor rango que los

obtenidos por Papafrangas, si bien él trabaja con un desinfectante común y no con un producto puro diluido en agua destilada estéril. Lo mismo ocurre con los resultados de Rebagliati y col. (22), 50.000 ppm de concentración para inhibir el crecimiento de una muestra de bacterias y 100.000 ppm para conseguir una desinfección total, bastante superiores a los obtenidos por nosotros (4.900 ppm para *P. aeruginosa* y 3.000 ppm para *E. coli*), haciendo hincapié en que este autor trabaja con varias especies bacterianas y con un desinfectante comercial.

Trabajando con el desinfectante A, resultados comparables en rango a los del presente estudio obtuvieron con anterioridad Santini (26), con concentraciones entre 1.250 ppm y 2.500 ppm trabajando con 24 cepas diferentes, y Muszynski y Dlugaszewska (20) con unas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 400 ppm para *S. aureus* y 880 ppm para *P. aeruginosa*, aunque estos últimos autores citan resultados un tanto elevados para la prueba de CMB de *S. aureus* (1.900 ppm) y para *P. aeruginosa* (10.500 ppm), obtenidos quizás al no trabajar con un producto puro. Tampoco citan dichos autores qué tipo de compuesto de amonio cuaternario utilizaron para su estudio. Del mismo modo, de menor rango son nuestros resultados comparados con los aportados por Tanner (29), cuestión achacable a que este autor utiliza un agua con una dureza total de 100 mg/L, lo que hace que el desinfectante sea mucho menos activo frente a los agentes bacterianos.

Los resultados obtenidos con el compuesto de amonio cuaternario de segunda generación en los trabajos con estafilococos son de 42 ppm en la prueba de CMB y de 28 ppm en la prueba de difusión en agar, comparables a los obtenidos por Takasaki y col. (27, 28) con una concentración de 32 ppm con el método de CMI estudiando el compuesto didecil dimetil amonio con la especie bacteriana *S. aureus*.

Con el desinfectante A, obtenemos los resultados de 1.630 ppm para *P. aeruginosa* en la prueba de difusión en agar y 1.380 ppm para *E. coli* en la prueba de suspensión. Estos datos son de similar magnitud a los obtenidos por Breen y col. (7), que citan una concentración efectiva de 1.000 ppm ensayando con *Salmonella* y con el compuesto de cloruro de cetilpirimidina. Las concentraciones obtenidas por Majtan y Majtanova (16), frente a *Salmonella typhimurium*, fueron menores, oscilando entre 400 ppm para el desinfectante más activo y 125.000 ppm para el menos activo.

En resumen, las concentraciones del compuesto de amonio cuaternario de segunda generación, utilizadas en este estudio, fueron diez veces inferiores a las concentraciones del compuesto de amonio cuaternario de primera generación para obtener el mismo efecto bactericida y en general, las concentraciones de uso, recomendadas comercialmente (1.000 ppm), resultaron eficaces con la sola excepción de *P. aeruginosa*.

Los datos del trabajo de Alexander y col. (1) muestran unos resultados de 260 ppm para *E. coli* no resistente a antibióticos y de 400 ppm para *E. coli* resistente a gentamicina, con la cetrimida como agente desinfectante. Los resultados de nuestro ensayo, con concentraciones de 240 ppm con el método de CMB, 270 ppm en la prueba de suspensión y 216 ppm en la prueba de difusión en agar para el agente *E. coli*, trabajando con un compuesto de amonio cuaternario de segunda generación se pueden asemejar a los aportados por estos autores sobre cepas no resistentes.

En el tema de las resistencias, en este estudio, aún sin detectar ningún agente resistente, encontramos una cepa de *P. aeruginosa* que necesitó una concentración mayor a la recomendada para ser neutralizada con el método de CMB. En este mismo sentido, Jones y col. (12) nos indican la existencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los compuestos de amonio cuaternario. Cupkova y col. (8) también citan la existencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a tres sales de amonio cuaternario de nueva síntesis.

Langsrud y Sundheim (14) encuentran cepas de *Pseudomonas* spp. capaces de crecer en medios con 200.000 ppm de cloruro de benzalconio. En nuestro trabajo los resultados para *P. aeruginosa* frente al mismo compuesto fueron de 4.900 ppm para CMB, 3.100 ppm en la prueba de suspensión y 1.680 ppm en la prueba de difusión en agar, lo que significa que es posible que existan cepas de este género bacteriano capaces de crecer en medios con esas concentraciones de desinfectante tan elevadas.

Por otro lado, Tennent y col. (30) y Leelaporn y col. (15) encontraron cepas de *S. aureus* y *Staphylococcus* spp. respectivamente resistentes a los compuestos de amonio cuaternario, resultados que en nuestro estudio no se han podido confirmar.

Así pues, se establece la mayor efectividad de los compuestos de amonio cuaternario, tanto de primera como de segunda generación, frente a bacterias Gram-positivas. Del mismo modo, no se ha podido detectar ningún tipo de resistencia asociada a las cepas de nuestro trabajo.

En todos los casos, observamos que los coeficientes de correlación entre los diferentes métodos utilizados son próximos a 1 (Cuadro IV), por lo que los datos guardan una estrecha relación entre sí. Esto nos indica que son válidos cualquiera de los métodos empleados para la prueba de valoración de los desinfectantes. Si además, diferenciamos los desinfectantes y hallamos la correlación de los métodos, considerando compuestos de amonio cuaternario de primera generación y compuestos de amonio cuaternario de segunda generación, vemos que en todos los casos la correlación es significativa, y en el caso de las medias de los datos también. Todo ello nos demuestra que la utilización de un método u otro no influye en el resultado final del ensayo, por lo tanto su elección es indistinta.

Finalmente, los coeficientes de correlación entre las diferentes cepas de cada microorganismo utilizado (cinco cepas por especie bacteriana) oscilaron entre 0,55 y 1 (Cuadro V), siendo en el 100% de las cepas de *E. coli* significativas dichas correlaciones, en *P. aeruginosa* fueron el 60% significativas, en *S. aureus* el 60% también y en *E. faecalis* el 70%. Se aprecia que el hecho de trabajar con diferentes cepas de una misma especie bacteriana, no interviene en el resultado final del ensayo, ya que el comportamiento de las diferentes cepas es similar en el desarrollo de las pruebas.

Para resumir, la prueba de sensibilidad por difusión en agar por el método del disco-placa mostró una buena sensibilidad para su uso rutinario, con los dos tipos de compuestos de amonio cuaternario ensayados, y finalmente, en virtud de los resultados obtenidos y la correlación de los distintos datos aportados por las técnicas de CMB, suspensión y difusión en agar, se demuestra la validez de las tres técnicas como adecuadas para la valoración de desinfectantes de amonio cuaternario.

■

Evaluating the effect of quaternary ammonium disinfectants on bacterial strains of animal origin

J. Rueda, J.A. Amigot Lázaro & J. Ducha

Summary

The authors evaluate two quaternary ammonium compounds, first and second generation, using three methods: minimum bactericide concentration, the suspension test of the German Society for Hygiene and Microbiology and the agar gel diffusion test. The compounds were tested against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* from sheep and pigs.

The results show that quaternary ammonia compounds with dodecyl chains have greater efficacy than benzalconium chloride, and that quaternary ammonium compounds are more effective against Gram- positive bacteria. No resistance linked to the strains used in the tests was detected. Finally, the authors demonstrate that all three techniques are valid for the evaluation of quaternary ammonium disinfectants.

Keywords

Animal – Bacteria – Disinfectant – *Escherichia coli* – *Enterococcus faecalis* – *Pseudomonas aeruginosa* – Quaternary ammonium – *Staphylococcus aureus* – Test method.



Évaluation de l'efficacité de désinfectants à base d'ammonium quaternaire contre des souches bactériennes d'origine animale

J. Rueda, J.A. Amigot Lázaro & J. Ducha

Résumé

Les auteurs ont comparé l'efficacité de deux composés d'ammonium quaternaire, respectivement de première et de seconde génération, à l'aide de trois méthodes : la concentration minimale bactéricide, l'essai en suspension de la Société allemande d'hygiène et de microbiologie et la diffusion en gélose. L'efficacité des composés a été éprouvée à l'encontre de souches de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* issues d'ovins et de porcins.

Les résultats ont mis en évidence la supériorité des composés d'ammonium quaternaire à chaînes dodécyl par rapport au chlorure de benzalconium et ont montré que les composés d'ammonium quaternaire étaient plus efficaces contre les bactéries à Gram positif. Aucune souche résistante n'a été dépistée lors des épreuves. Enfin, les auteurs confirment la validité des trois techniques à des fins d'évaluation des désinfectants à base d'ammonium quaternaire.

Mots-clés

Ammonium quaternaire – Animal – Bactéries – Désinfectant – *Enterococcus faecalis* – *Escherichia coli* – Méthode d'essai – *Pseudomonas aeruginosa* – *Staphylococcus aureus*.



Bibliografía

- Alexander D.M., Jeawon R.H. & Persad S. (1991). – Disinfectant resistance in antibiotic-resistant organisms. *S. Afr. J. Sci.*, **87** (11-12), 614-617.
- Alvárez-Alcántara A., Pérez López J.A., Cueto Espinar A. & Gálvez Vargas R. (1984). – Posibilidades de utilización de métodos de difusión en agar aplicados a desinfectantes. *Laboratorio*, **78** (464), 171-182.
- Antoniadou-Vyza E., Tsitsa P., Hytioglou E. & Tsantili-Kakoulidou A. (1996). – New adamantan-2-ol and adamantan-1-methanol derivatives as potent antibacterials. Synthesis, antibacterial activity and lipophilicity studies. *Eur. J. med. Chem.*, **31** (2), 105-110.
- Bernard J., Sebastien F. & Desvignes A. (1977). – Méthode de diffusion appliquée aux antiseptiques : possibilités et limites de la technique. *Ann. pharmaceut. fr.*, **35** (11-12), 475-488.
- Bloomfield S.F., Arthur M., Looney E., Begun K. & Patel H. (1991). – Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Lett. appl. Microbiol.*, **13** (5), 233-237.
- Bloomfield S.F. & Looney E. (1992). – Evaluation of repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. *J. appl. Bacteriol.*, **73** (1), 87-93.
- Breen P.J., Compadre C.M., Fifer E.K., Salari H., Serbus D.C. & Lattin D.L. (1995). – Quaternary ammonium compounds inhibit and reduce the attachment of viable *Salmonella typhimurium* to poultry tissues. *J. Food. Sci.*, **60** (6), 1191-1196.
- Cupkova V., Espersen F. & Hoiby N. (1990). – Antibacterial activity of new synthesized amino-oxides and quaternary ammonium salts. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.*, **190** (4), 404-411.
- Delmotte A. & Beumer J. (1976). – Étude sur la sensibilité du *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique) aux antiseptiques et antibiotiques. IX. Influence du milieu de culture sur l'antiseptogramme. *Thérapie*, **34**, 257-165.
- El-Nakeeb M. (1976). – Development of an agar-diffusion method for the assay of quaternary ammonium germicides. *Arzneimittelforschung*, **26** (1), 14-20.
- Gilbert P. & Al-Taae A. (1985). – Antimicrobial activity of some alkyltrimethylammonium bromides. *Lett. appl. Microbiol.*, **1** (6), 101-104.
- Jones M.V., Herd T.M. & Christie H.J. (1989). – Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios*, **58** (243), 49-61.
- Kahrs R.F. (1995). – Principios generales de la desinfección. In *Desinfectantes: acciones y aplicaciones*. Segunda parte (H.A. McDaniel, edit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14** (2), 143-163.
- Langsrud S. & Sundheim G. (1997). – Factors contributing to the survival of poultry-associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J. appl. Microbiol.*, **82** (6), 705-712.
- Leelaporn A., Firth N., Paulsen I.J. & Skurray R.A. (1996). – IS257-mediated cointegration in the evolution of a family of staphylococcal trimethoprim resistance plasmids. *J. Bacteriol.*, **178** (20), 6070-6073.
- Majtan V. & Majtanova L. (1997). – Antibacterial efficacy of new commercially manufactured disinfectant substances against *Salmonella typhimurium*. *J. basic Microbiol.*, **37** (1), 41-44.
- Makino M., Ohta S. & Zenda H. (1994). – Study on new anti-rust disinfectant. III. Effect of alkyl chain length of *N*-alkyl-*N*-(2-hydroxy-3-phenoxy) propyl-*N*, *N*-dimethylammonium butyl phosphate on the antibacterial activity. *Yakugasu Zasshi*, **114** (2), 73-79.
- Maris P. (1995). – Modes of action of disinfectants. In *Desinfectantes: acciones y aplicaciones*. Primera parte (H.A. McDaniel, edit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14** (1), 47-55.
- Murray P.R., Niles A.C. & Heeren R.L. (1988). – Microbial inhibition on hospital garments treated with Dow Corning 5700 antimicrobial agent. *J. clin. Microbiol.*, **26** (9), 1884-1886.
- Muszynski Z. & Dlugaszewska J. (1994). – Septo-Clean. New disinfectant and antiseptic agent. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, **46** (1-2), 91-94.
- Papafrangas E.A., Demertzi E., Vatopoulos A. & Zouveleki I. (1995). – Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity of three common disinfectants. *Deltion ellen. Mikrobiol. Etairias*, **40** (4), 332-335.
- Rebagliati B., Bucalo A. & Rizzetto R. (1995). – Evaluation of the efficacy of a hospital disinfectant containing benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate. *Igiene mod.*, **104** (5), 821-832.
- Reybrouck G. (1975). – A theoretical approach of disinfectant testing. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig. B]*, **160**, 342-367.
- Reybrouck G. (1984). – Mesure de l'activité germicide des désinfectants et antiseptiques par les tests de suspension quantitatifs. *J. Pharm. Belg.*, **39** (6), 390-400.
- Reybrouck G. (1991). – Evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants. In *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation* (A.D. Russell, W.B. Hugo & G.A.J. Ayliffe, edit.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 826 págs.
- Santini G. (1989). – Efficacy of benzalkonium chloride in hospital environments: method of evaluation. *Igiene mod.*, **91** (1), 108-120.
- Takasaki A., Hashida T., Kato K.I. & Hishihara S. (1994). – Neutralizing effect of polysorbate on bactericidal action of a quaternary ammonium disinfectant, didecyltrimethylammonium chloride, against *Staphylococcus aureus*. *Jap. J. Toxicol. environ. Hlth*, **40** (4), 344-350.
- Takasaki A., Hashida T., Fujiwara S., Kato K.I. & Hishihara S. (1994). – Bactericidal action of a quaternary ammonium disinfectant, didecyltrimethylammonium chloride, against *Staphylococcus aureus*. *Jap. J. Toxicol. environ. Hlth*, **40** (4), 351-356.

29. Tanner R.S. (1989). – Comparative testing and evaluation of hard-surface disinfectants. *J. ind. Microbiol.*, **4** (2), 145-154.
 30. Tennent J.M., Lyon B.R., Gillespie M.T., May J.W. & Skurray R.A. (1985). – Cloning and expression of *S. aureus* plasmid mediated quaternary ammonium resistance in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**, 79-83.
 31. Vievskii A.N. (1994). – Effect of quaternary ammonium derivatives on respiration and nitrate reduction of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiol. Zh. (Kiev)*, **56** (2), 7-11.
 32. Vievskii A.N. (1994). – Synergic effect of quaternary ammonium derivatives on respiration and nitrate reduction inhibitors in respect to *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiol. Zh. (Kiev)*, **56** (2), 16-20.
- 