

8. LAEGREID, A., OTNAESS, A.B.K. y FUGLESANG, J. (1986). Human and bovine milk: Comparison of ganglioside composition and enterotoxin inhibitory activity. *Pediatr. Res.* 20, 416-421.
9. LUQUET, F.M. (1991). *Leche y productos lácteos: Vol.1 De la mama a la leche-ría*. Ed. Acribia, Zaragoza, 1-92.
10. MORRISEY, P.A. (1973). The N-acetylneuraminic acid content of the milk of various species. *J. Dairy Res.* 40, 421-425.
11. MOURICOUT, M., PETIT, J.M., CARIAS, J.R. y JULIEN, R. (1990). Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: Treatment of experimental colibacillosis. *Infect. Immun.* 58, 98-106.
12. NEWBURG, D.S., PICKERING, L.K., McCLUER, R.H. y CLEARY, T.G. (1990). Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable endotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 162, 1075-1080.
13. NEWBURG, D.S. y NEUBAUER, S.H. (1995). Carbohydrates in milks: Analysis, quantities and significance. En JENSEN, R. G.: *Handbook of milk composition*, Academic Press, San Diego, 4, 273-349.
14. PUENTE, R., GARCIA-PARDO, L.A. y HUESO, P. (1992). Gangliosides in bovine milk. Changes in content and distribution of individual ganglioside levels during lactation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 283-288.
15. PUENTE, R. y HUESO, P. (1993). Lactational changes in the N-glycolylneuraminic acid content of bovine milk gangliosides. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 374, 475-478.
16. ROBITAILLE, G., NG-KWAI-HANG, K. F. y MONARDES, H. G. (1991). Variation in the N-acetylneuraminic acid content of bovine κ -casein. *J. Dairy Res.* 58, 107-114.
17. SVENNERHOLM, L. (1957). Quantitative estimation of sialic acids. III. A colorimetric resorcinol hydrochloric method. *Biochim. Biophys. Acta* 24, 604-611.
18. TAKAMIZAWA, K., IWAMORI, M., MUTAI, M. y NAGAI, Y. (1986 a). Gangliosides of bovine buttermilk. Isolation and characterization of a novel monosialoganglioside with a new branching structure. *J. Biol. Chem.* 261, 5625-5630.
19. TAKAMIZAWA, K., IWAMORI, M., MUTAI, M. y NAGAI, Y. (1986 b). Selective changes in gangliosides of human milk during lactation: A molecular indicator for the period of lactation. *Biochim. Biophys. Acta* 879, 73-77.
20. TENNEBERG, S., WILLEMSSEN, P.T.J., DE GRAAF, F.K., STENHAGEN, G., PIMLOTT, W., JOVALL, P.A., ANGSTROM, J. y KARLSSON, K.A. (1994). Characterization of gangliosides of epithelial cell of calf small intestine, with special reference to receptor-active sequences for enteropathogenic *Escherichia coli* K99. *J. Biochem.* 116, 560-574.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DESINFECTANTE IN-VITRO DE LA N-DUOPROPENIDA SOBRE *Actinobacillus pleuropneumoniae*

(STUDY ABOUT THE IN-VITRO DISINFECTANT ACTIVITY OF N-DUOPROPENIDE ON *Actinobacillus pleuropneumoniae*)

César B. Gutiérrez Martín*

Delfina Alvarez Nistal*

Víctor A. de la Puente Redondo*

Elías F. Rodríguez Ferri*

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, desinfección, N-duopropenida
Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, disinfection, N-duopropenide

SUMMARY

The efficacy of N-duopropenide, a new generation disinfectant composed of a mixture of quaternary ammonium iodides, against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 was studied. The organisms were suspended in both saline and bovine serum and tested *in vitro* in suspension and carrier tests. A total of six concentrations (0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% and 5%) and six contact times for each (15", 30", 1', 3', 5' and 10') were studied. The disinfectant was more effective in the suspension test than in the carrier test, and when organisms were suspended in saline than in organic matter. Even in the most disadvantage conditions (carrier test with bovine serum) such a short contact time as 15 seconds was already highly effective for inactivating *A. pleuropneumoniae*.

RESUMEN

Se estudió la eficacia del desinfectante N-duopropenida, un producto de nueva generación formulado a base de yoduros de amonio cuaternario, sobre el serotipo 1 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando dos técnicas *in vitro*, el método de la

* Unidad de Microbiología e Inmunología. Dpto. de Patología Animal (Sanidad Animal). Universidad de León.

An. Fac. Vet. León. 1994-96, 39, 29-37

suspensión y el del disco portador. El experimento se desarrolló por duplicado, suspendiendo las bacterias en solución salina o en materia orgánica (suero bovino). Se probaron seis concentraciones (0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5% y 5%) y para cada una, seis tiempos de aplicación diferentes (15", 30", 1', 3', 5' y 10'). El desinfectante resultó más eficaz en el método de la suspensión que en el del disco portador y, dentro de cada uno de éstos, más en ausencia de materia orgánica que cuando se suspendían las bacterias en suero bovino. Aún en la situación más desfavorable (técnica del disco portador con materia orgánica), un tratamiento de tan solo quince segundos ya resultó completamente eficaz en la destrucción de *A. pleuropneumoniae*.

INTRODUCCIÓN

La N-duopropenida es un producto desinfectante de nueva generación, constituido por yoduros de amonio cuaternario, de estructura compleja y peso molecular elevado, que se comporta como un agente tensioactivo catiónico con dobles enlaces conjugados¹. Se trata de una sustancia soluble en agua, inodora, de escasa toxicidad en niveles de uso, cuya actividad desinfectante ha sido estudiada hasta la fecha en aguas de consumo avícola¹, en la superficie de huevos para incubar¹³, en endoscopios², en sistemas de climatización³ y en residuos líquidos y semilíquidos porcinos¹². Como otras propiedades, podemos mencionar su fácil difusión en pulverización, su sencillo manejo y su compatibilidad con todo tipo de plásticos y aleaciones metálicas¹³, lo que, junto con las características enumeradas más arriba, le convierten en un producto idóneo para su utilización en explotaciones ganaderas, máxime si tenemos en cuenta que su eficacia bactericida ha sido ya demostrada frente a importantes grupos bacterianos^{7,12,13,14}.

Por su parte, *Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente etiológico de una de las enfermedades respiratorias de mayor importancia actual, la pleuroneumonía porcina. Pese a existir mucha información reciente sobre esta bacteria, lo cierto es que la enfermedad se encuentra difundida por todos los países industrializados, debido a los modernos métodos de producción intensiva y a los florecientes intercambios comerciales. Uno de los aspectos menos estudiados en relación con el agente de la pleuroneumonía es su supervivencia en el medio ambiente, cuestión que adquiere, sin embargo, una gran importancia al condicionar su posible transmisión indirecta en la explotaciones intensivas, a través de utensilios, alimentos, agua de bebida, vestimenta de los operarios, etc., ya que está suficientemente demostrada su liberación al medio circundante, en forma de aerosoles, sobre todo durante la forma aguda de la enfermedad⁹.

Una de las formas posibles y sencillas de disminuir la incidencia de esta enfermedad en la cabaña porcina consistiría, pues, en una correcta desinfección de los lugares donde haya sido detectado un brote, antes de introducir nuevos contingentes susceptibles de contraer la infección. En este sentido, una sustancia inocua y fácil de dispensar resultaría la ideal a la hora de combatir una bacteria tan patógena como ésta. Es por todo ello por lo que nos decidimos, como continuación de una línea de investigación en la que ya se ha verificado la eficacia de una serie de sustancias

desinfectantes⁸, a ampliar el estudio de este nuevo producto a la bacteria comentada, mediante la realización de un estudio *in vitro*, siguiendo dos metodologías diferentes, en la esperanza de que resulte eficaz en el control de la pleuroneumonía porcina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacteria: Empleamos la cepa ATCC 4074, de referencia para el serotipo I de *A. pleuropneumoniae*. Una vez descongelada, se sembraba sobre ágar PPLO (Biolife) enriquecido con un 10% de extracto de levadura (Biolife), un 0.1% de glucosa (Panreac) y un 0.0025% de dinucleótido de nicotinamina y adenina -NAD- (Sigma). Tras un periodo de incubación de seis horas a 37°C en atmósfera aerobia, el crecimiento resultante era despegado con un asa de vidrio y suspendido en solución salina fisiológica con un 0.05% de Tween-80 (Sigma) (SSFTw) o alternativamente en suero bovino comercial (Sigma), hasta alcanzar una concentración bacteriana del orden de 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

Desinfectante: Como hemos mencionado, se utilizó el desinfectante N-duopropenida, que fue suministrado en su forma comercializada (TOTAL: se trata de un producto que contiene aproximadamente un 11% de yoduros de amonio cuaternario) por la empresa fabricante. A partir de esta presentación se efectuaron diluciones seriadas en agua corriente, hasta obtener las siguientes soluciones de trabajo: 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.1% y 0.05%.

Método de la suspensión: Fue el primero de los métodos empleados para comprobar la eficacia del desinfectante sobre *A. pleuropneumoniae*. Se realizó sobre placas de cultivos celulares de 24 pocillos (Costar), donde se mezclaban 900 µl de las diferentes diluciones de desinfectante con 100 µl de la suspensión bacteriana. Se probaron seis tiempos de contacto (15", 30", 1', 3', 5' y 10'), después de los cuales se recogían 100 µl de la mezcla, que eran transferidos a un tubo con 9.900 µl de SSFTw, para anular la actividad del desinfectante. Después de esta primera dilución 10⁻², se practicaban diluciones decimales seriadas hasta 10⁻⁷. De forma paralela al experimento con el desinfectante, se realizaba un control, consistente en la mezcla del mismo volumen y concentración de suspensión bacteriana con 900 µl de agua estéril durante un tiempo de contacto igual al empleado en el caso del desinfectante. Las diluciones posteriores se llevaron a cabo de la misma forma que cuando se trabajaba con la N-duopropenida. Por último, de cada dilución se tomaban 100 µl, que eran sembrados por duplicado sobre ágar PPLO enriquecido. Tras dieciocho horas de incubación a 37°C y condiciones aerobias, se efectuaban las lecturas de las posibles colonias existentes, comenzando por las placas del experimento control.

Método del disco portador: Para este segundo método de evaluación de la actividad desinfectante de la N-duopropenida, se recurrió a discos de acero inoxidable de un diámetro aproximado de 1 cm y 0.75 mm de espesor, colocándose uno en cada pocillo de una placa de cultivos celulares de 12 pocillos (Costar). Sobre cada uno de ellos se dispensaban 20 µl de la suspensión bacteriana y se sometían a un flujo vertical de aire estéril en una cabina de seguridad biológica de tipo II (Telstar), hasta que se secase la gota depositada. Una vez transcurrido el tiempo necesario para el seca-

do (aproximadamente una hora, aunque se tardaba más cuando las bacterias se encontraban suspendidas en suero bovino), el área del disco contaminada se recubría con 20 µl de cada una de las seis concentraciones de desinfectante estudiadas, durante cada uno de los seis tiempos de contacto seleccionados. A continuación, al tiempo que se inactivaba la acción del desinfectante mediante dilución, se despegaban las bacterias del disco portador bombeando 980 µl de SSFTw varias veces contra el disco metálico. Una vez despegadas las bacterias, se comenzaba una nueva serie de cinco diluciones decimales en SSFTw, que posteriormente eran sembradas del mismo modo que en el párrafo anterior. Al igual que en el método precedente, también se emplearon series de experimentos control, en los que el desinfectante era sustituido por agua estéril.

Análisis de los resultados: A la hora de realizar la lectura de los resultados del crecimiento en las placas, se comenzaba efectuando el recuento de las placas control, cuyo número de UFC debería aproximarse a las 10^9 de que se partía. Seguidamente, eran observadas las placas del experimento con desinfectante, recogiendo en todos los casos el número de colonias detectado. Dividiendo el número de colonias recogidas sin tratamiento con desinfectante por el obtenido cuando se manejaban las distintas concentraciones de N-duopropenida, se hallaba la reducción del crecimiento bacteriano producida por cada concentración investigada. Todos los experimentos fueron realizados al menos dos veces, empleando suspensiones bacterias recién preparadas. Los resultados finales que figuran en las tablas son el promedio de los obtenidos para cada concentración y tiempo de contacto, tras aplicar logaritmos decimales.

RESULTADOS

Antes de plantear los resultados del método de la suspensión, se ha de señalar que en todos los experimentos las reacciones control incluidas permitieron recuperar el inóculo inicial, es decir, aproximadamente 10^9 UFC/ml. Puesto que es muy escasa la información que existe sobre la actividad *in vitro* de los desinfectantes sobre esta bacteria, consideramos, al igual que en una investigación previa⁸, como valor mínimo aceptable una reducción logarítmica de 3, equivalente a un 99.9% de actividad en la desinfección.

La tabla 1 refleja las reducciones logarítmicas observadas en el crecimiento de la cepa ATCC 4074 de *A. pleuropneumoniae*, una vez aplicadas diferentes concentraciones y tiempos de exposición de N-duopropenida, mediante el método de la suspensión. En ausencia de materia orgánica, como cabía esperar, las reducciones logarítmicas aumentaron a medida de que era mayor la concentración de desinfectante valorada o el tiempo de aplicación. En este sentido, la concentración del 0.05% resultó eficaz a partir del minuto de exposición, manteniendo a partir de este momento el valor >5, es decir, la máxima reducción detectada posible. Todas las demás concentraciones fueron eficaces con independencia del tiempo de contacto, con una salvedad: mientras que con el 0.1%, el 0.5% y el 1% sólo se registraron los valores máximos a partir de los 30", con las dos concentraciones mayores este resultado ya se repitió a lo largo de todas las determinaciones.

Tabla 1. Reducciones logarítmicas observadas en el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotipo 1, cepa ATCC 4074), tras aplicar diferentes concentraciones y tiempos de exposición de N-duopropenida mediante el método de la suspensión, en presencia y ausencia de materia orgánica.

Tiempo de exposición	Materia orgánica	Concentración de N-duopropenida					
		5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%
15"	Ausente	>5	>5	>4<5	>4<5	>3<4	>2<3
	Suero bovino	>5	>5	>4<5	>4<5	<1	<1
30"	Ausente	>5	>5	>5	>5	>5	>2<3
	Suero bovino	>5	>5	>5	>5	<1	<1
1'	Ausente	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	Suero bovino	>5	>5	>5	>5	<1	<1
3'	Ausente	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	Suero bovino	>5	>5	>5	>5	>2<3	<1
5'	Ausente	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	Suero bovino	>5	>5	>5	>5	>3<4	<1
10'	Ausente	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	Suero bovino	>5	>5	>5	>5	>5	<1

En presencia de materia orgánica, los resultados obtenidos fueron idénticos para las cuatro concentraciones mayores, mientras que en las dos menores el desinfectante se mostró menos eficaz. Así el 0.05% de N-duopropenida no fue capaz de producir reducciones apreciables en el número de colonias respecto del control, ni siquiera durante el tiempo mayor de exposición (10'), siendo en todos los casos el valor obtenido <1. Contrariamente, trabajando con un 0.1% de producto observamos eficacia desinfectante a partir de los 5' de exposición, si bien los resultados mejoraron ostensiblemente a los 10'.

Tabla 2. Reducciones logarítmicas observadas en el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotipo 1, cepa ATCC 4074), tras aplicar diferentes concentraciones y tiempos de exposición de N-duopropenida mediante el método del disco portador, en presencia y ausencia de materia orgánica.

Tiempo de exposición	Materia orgánica	Concentración de N-duopropenida					
		5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%
15"	Ausente	>5	>5	<1	<1	<1	<1
	Suero bovino	>5	>5	<1	<1	<1	<1
30"	Ausente	>5	>5	<1	<1	<1	<1
	Suero bovino	>5	>5	<1	<1	<1	<1
1'	Ausente	>5	>5	<1	<1	<1	<1
	Suero bovino	>5	>5	<1	<1	<1	<1
3'	Ausente	>5	>5	<5	<5	<1	<1
	Suero bovino	>5	>5	>1<2	<1	<1	<1
5'	Ausente	>5	>5	<5	<5	<1	<1
	Suero bovino	>5	>5	>1<2	<1	<1	<1
10'	Ausente	>5	>5	<5	<5	<1	<1
	Suero bovino	>5	>5	>1<2	<1	<1	<1

Respecto al método del disco portador, debemos señalar que el proceso de secado nunca redujo sensiblemente el número de UFC del inóculo de partida, como tampoco el método de elución de las bacterias del disco. El conjunto de resultados obtenidos queda detallado en la tabla 2. Para las dos concentraciones mayores, con independencia del tiempo de aplicación y de la presencia o no de materia orgánica, las reducciones alcanzaron el máximo posible (>5), al igual que ocurrió con el método de la suspensión. Por el contrario, en las cuatro concentraciones restantes los resultados fueron peores, hasta tal punto de que en las concentraciones del 0.05% y 0.1%,

de forma global, y del 0.5% y 1%, únicamente cuando las bacterias se suspendían en suero bovino, se registraron resultados similares a los de las placas control (esto es, reducciones de <1 en la mayor parte de los casos y, como mucho, de >1 y <2) y sólo a partir de los 3' de contacto con el 0.5% (o también con el doble de producto) se obtuvieron actividades eficaces, que curiosamente fueron las máximas, sin pasar por reducciones logarítmicas intermedias.

DISCUSIÓN

En este estudio se investiga la acción de diferentes concentraciones y tiempos de aplicación del desinfectante N-duopropenida sobre *A. pleuropneumoniae*. Se eligió el serotipo 1 de entre los doce descritos hasta el momento porque una gran parte de los procesos agudos y sobreagudos de pleuroneumonía que sufre la cabaña porcina mundial tienen su origen en este serotipo^{10,11}. Para efectuar el experimento recurrimos a dos métodos reproducibles, cuantitativos y precisos, habitualmente utilizados para este tipo de estudios con otros productos y otros grupos bacterianos^{4,5,6}. Los desinfectantes en general (y los resultados obtenidos en nuestro caso no son una excepción) se muestran más eficaces con el método de la suspensión; a pesar de ello, recurrimos a emplear como alternativa el método del disco portador porque refleja con mayor fidelidad las condiciones reales en las que tendrá que funcionar el desinfectante valorado. Por la misma razón, combinamos en el estudio dos posibilidades, presencia y ausencia de materia orgánica, siendo la primera la que más se adecua a lo que resulta habitual en las explotaciones porcinas, donde es frecuente la existencia de gran cantidad de residuos orgánicos de todo tipo. Aunque la materia orgánica ideal hubiera sido la secreción nasal porcina, sustancia a través de la cual los cerdos enfermos eliminan gran cantidad de bacterias y donde éstas pueden mantenerse acantonadas, a la espera de un nuevo individuo susceptible al que infectar⁹; sin embargo, la dificultad que representa obtener grandes cantidades de esta sustancia en condiciones estériles, nos obligó a sustituirla por una alternativa accesible y aceptable para este tipo de investigaciones, el suero bovino, tal y como ha sido propuesto con anterioridad⁶.

Si de todos los resultados obtenidos en este estudio, nos basamos en las condiciones más desfavorables (método del disco portador con presencia de materia orgánica), podemos afirmar que la N-duopropenida necesita aplicarse como mínimo diluida al 2.5% (equivalente a un 0.27% de principio activo), para destruir eficazmente al agente de la pleuroneumonía porcina. Esta concentración se sitúa dentro de los límites de manejo habituales de un producto de estas características, por lo que, como ya comentamos en la introducción, no supone ningún problema desde el punto de vista tóxico, con la ventaja añadida de que su actividad es casi inmediata, dejándose notar con tan solo quince segundos de aplicación. A este respecto, y por continuar incidiendo en la idea de la inocuidad de la N-duopropenida, podemos destacar un estudio previo¹³ en el que, aún tratándose de una especie y unas condiciones completamente distintas, no se observaron influencias perniciosas sobre la viabilidad de los embriones de pollitos, tras pulverizar concentraciones superiores a las nuestras durante periodos de exposición también mayores.

Este producto parece además presentar ventajas claras respecto a las formulaciones comerciales ensayadas en otras publicaciones⁸. Aunque no podemos comparar la duración de la exposición, puesto que sólo fueron probados tiempos de un minuto, sí podemos indicar que el único producto comercial eficaz en presencia de materia orgánica con el método del disco portador, también integrado por compuestos de amonio cuaternario, tenía que ser utilizado al 20% según instrucciones del fabricante⁸, es decir, ocho veces más concentrado que la N-duopropenida en este estudio, por lo que se requeriría un consumo mucho mayor, con el previsible incremento de coste añadido. Otra desventaja de la formulación comercial del otro estudio (que es a la vez ventaja con la N-duopropenida) vendría representada por el mayor riesgo de toxicidad, aún citándonos a las instrucciones del fabricante, no ya sólo por su mayor concentración de su uso, sino por su propia formulación, constituida además por glutaraldehído y formaldehído⁸. En cuanto a las materias primas verificadas en la misma investigación⁸, tan sólo la cloramina-T, un producto que libera cloro lentamente, produjo niveles de eficacia similares a los demostrados en este estudio. Una vez más, el tiempo de contacto valorado fue mayor, de un minuto, si bien, a cambio, la cloramina-T ya resultó activa a una concentración seis veces menor (del 0,4%)⁸ que la de la fórmula comercial de la N-duopropenida, aunque no así si se compara con la concentración de producto activo.

En consonancia con nuestros resultados, en otras investigaciones recientes ya se había demostrado la gran eficacia bactericida de esta sustancia desinfectante, sobre un espectro más amplio de bacterias Gram positivas y negativas presentes en otros ambientes. Así, tratamientos de 18 ppm del mismo producto comercial permitieron anular completamente la flora microbiana habitual en aguas de abastecimiento avícola (*Escherichia coli* y otros coliformes fecales, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, estreptococos del tipo D y clostridios sulfito-reductores, entre otros)¹⁴ y otro tanto se puede afirmar de su eficacia sobre mesófilos aerobios totales, enterobacterias y hongos, tras su aplicación sobre cáscaras de huevos para incubar¹³, con concentraciones y tiempos de contacto más equiparables con los de este estudio. Por último, se ha ratificado su gran actividad bactericida sobre grupos bacterianos similares a los del primer ensayo avícola, contenidos en esta ocasión en residuos porcinos, con concentraciones semejantes a las aquí presentadas pero con un tiempo de desinfección sustancialmente más alto (una hora)¹², explicable por la mayor concentración de microorganismos y materia orgánica del material valorado.

Cabe concluir, pues, que, al igual que sobre otras bacterias pertenecientes a grupos próximos, la N-duopropenida posee una gran actividad desinfectante *in vitro* sobre el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, incluso en tiempos de aplicación muy pequeños, por lo que consideramos que podría representar una buena opción de uso en las explotaciones porcinas para una eliminación eficaz de esta bacteria y, consecuentemente, para el control de la pleuroneumonía porcina, aunque manteniendo el producto tiempos superiores a los aquí estudiados, al tratarse de grandes superficies, donde la cantidad de producto pulverizado que alcanza cada punto resulta mucho menor que las que hemos ensayado *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANÓNIMO (1991). Información técnica sobre la N-duopropenida. Laboratorios B.G.L. Madrid.
2. ANÓNIMO (1996). Información científica: N-duopropenida: nuevo principio activo. Laboratorios Bio-Genetic. Madrid.
3. ANÓNIMO (1996). Desinfección de sistemas de climatización (N-duopropenida, nuevo principio activo). Laboratorios Bio-Genetic. Madrid.
4. BEST, M., SATTAR, S.A. and SPRINGTHORPE, V. (1988). Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2856-2858.
5. BEST, M., KENNEDY, M.E. and COATES, F. (1990). Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 377-380.
6. BEST, M., SATTAR, S.A. and SPRINGTHORPE, V.S. (1990). Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2234-2239.
7. EZPELETA, C., SOTA, M., IBARRA, K y CISTERNA, R. (1995). Estudio multicéntrico de la actividad antibacteriana de un nuevo desinfectante. *Rev. Esp. Quimioterap.* 8, 118-124.
8. GUTIÉRREZ, C.B., RODRÍGUEZ BARBOSA, J.I., SUÁREZ, J., GONZÁLEZ, O. R., TASCÓN RI. and RODRÍGUEZ FERRI, E.F. (1995). Efficacy of a variety of disinfectants against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1025-1029.
9. GUTIÉRREZ MARTÍN, C. B., SUÁREZ ESTRADA, J., GONZÁLEZ LLAMAZARES, O.R y RODRÍGUEZ FERRI, E.F. (1997). Epidemiología y formas clínicas. En: RODRÍGUEZ FERRI, E.F. ed., *Porci: Actinobacillus pleuropneumoniae y pleuropneumonía porcina*, Luzán-5, Madrid, 47-59.
10. MARTINEAU, G.P., HIGGINS, R and LARIVIERE, S. (1985). Elimination and control measures for swine pleuropneumonia in Québec. En: Schultz, R.A. ed., *Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae*. Biotech Corp. SDS, Avoca, Iowa, 39-42.
11. NIELSEN, R (1985). *Haemophilus pleuropneumoniae*: Diagnosis, immunity and control. En: Schultz, RA. ed., *Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae*. Biotech. Corp. SDS, Avoca, Iowa, 18-22.
12. de la PUENTE REDONDO, V.A. (1997). *Desinfección de residuos porcinos. Estudio de la actividad de la N-duopropenida*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. León.
13. RODRÍGUEZ FERRI, E.F., PANIAGUA DEL AGUA, M., VALERIO BENITO, J. L., de la PUENTE REDONDO, V.A. y GUTIÉRREZ MARTÍN C.B. (1997). Desinfección de huevos para incubar. Actividad de un nuevo desinfectante a base de yoduros de amonio cuaternario. *Med. Vet.*, 14:211-226.
14. VALERIO, J.L., LARIOS, J.L., VIDAL, J., GUTIÉRREZ, C.B. y RODRÍGUEZ FERRI, E.F. (1997). Estudio de la actividad potabilizadora de la N-duopropenida en aguas de abastecimiento avícola. *Med. Vet.*, 14:23-40.