

# Efecto de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK

CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ  
DORA PATRICIA ROSETE OLVERA  
MA. EUGENIA MANJARREZ ZAVALA ✉

*Departamento de Investigación en Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.  
Trabajo recibido: 21-X-2009; aceptado: 03-V-2010  
Conflictos de interés: La casa fabricante de la solución electrolizada de superoxidación proporcionó el producto para este trabajo.*

## RESUMEN

280

**Antecedentes:** Los virus de influenza causan infecciones respiratorias agudas y afectan a todos los grupos de edad con altos índices de morbilidad y mortalidad. La transmisión es por expulsión de gotitas de saliva, que se pueden depositar en manos y objetos. Para desinfectar áreas y materiales de trabajo se emplean soluciones desinfectantes como detergentes y cloro y, más recientemente, la solución electrolizada superoxidada (SES). Esta última se prepara con agua purificada, solución saturada de cloruro de sodio, y es electrolizada a pH neutro.

**Palabras clave:** Virus de influenza, infección respiratoria aguda, solución electrolizada superoxidada, desinfectantes, efecto citopático.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la SES sobre el virus de influenza A.

**Material y métodos:** Se prepararon nueve diferentes concentraciones de la SES y se mezclaron durante 10 a 15 min con una dosis infecciosa constante del virus, que posteriormente se inoculó en células MDCK. Se evaluó la capacidad citopática del virus y se calculó la dosis mínima de la SES necesaria para inhibirla. Para comprobar el efecto de la SES sobre el virus se hizo detección de antígenos por inmunofluorescencia indirecta y del genoma viral por RT-PCR.

**Resultados:** Todas las concentraciones de SES produjeron disminución de la infectividad del virus de influenza. La concentración más baja (0.47 µg) re-

## ABSTRACT

**Background:** Influenza viruses produce acute respiratory infections and cause high rates of morbidity and mortality in all age-groups. Their transmission is by expelled saliva droplets which can be deposited in hands and objects. For disinfection of surfaces and working materials, disinfectants such as detergents and chloride and, more recently, electrolyzed superoxidized solution (ESS) are used. The latter is prepared with purified water, saturated sodium chloride solution, and electrolyzed with neutral pH.

**Objective:** The aim of the present work was to evaluate the effect of ESS on the influenza A virus.

**Material and methods:** Nine different concentrations of ESS were prepared and then mixed during 10 to 15 min with a constant infectious dose of the virus, which was subsequently inoculated to MDCK cells. The cytopathic capacity of the virus was evaluated, and the minimal inhibitory dose of ESS was calculated. In order to corroborate the effect of ESS, detections of viral antigens by indirect immunofluorescence and of viral genome by RT-PCR were done.

**Results:** All concentrations of ESS diminished infectivity of the influenza virus. The lowest concentration (0.47 µg) reduced the viral cytopathic capacity by 40.8%, whereas the highest concentration (37.5 µg) reduced it up to 96% and precluded detection of viral antigens and genome.

**Conclusion:** ESS diminished the influenza virus infectivity on MDCK cells.

dujo un 40.8% la capacidad citopática viral, mientras que la concentración más alta (37.5  $\mu$ g) la redujo hasta un 96% e impidió la detección de antígenos y genoma virales.

**Conclusión:** La SES disminuye la infectividad del virus de influenza sobre células MDCK.

## INTRODUCCIÓN

Los virus de influenza son integrantes de la familia *Orthomyxoviridae*, en la que se incluyen tres géneros: A, B y C. Los virus de influenza A, además de infectar al ser humano también pueden infectar a otros animales.<sup>1-3</sup> Los virus de la familia se caracterizan por contener un genoma de RNA segmentado. La naturaleza biológica de estos virus, en especial los de influenza A, les da la capacidad de presentar una alta tasa de variación, cuyo resultado es la aparición frecuente de nuevas variantes antigénicas que dan lugar a las epidemias y pandemias. Los virus de influenza son agentes causales de infecciones respiratorias agudas y afectan a todos los grupos de edad, siendo más graves en niños y ancianos, y ocasiona altos índices de morbilidad y mortalidad. Cuando hay brotes, epidemias o pandemias en épocas invernales con frecuencia se encuentran circulando en el ambiente de centros hospitalarios, escuelas, guarderías y otros sitios de reunión con ambientes cerrados, y se diseminan fácilmente entre la población.<sup>4,5</sup> La transmisión es por la expulsión de gotitas de saliva que pueden quedar depositadas en manos y objetos. La mayoría de los microorganismos patógenos pueden persistir sobre superficies inanimadas por meses,<sup>6</sup> se han realizado estudios que muestran que hay otros factores que tienden a favorecer la persistencia; p. ej., las bajas temperaturas y la humedad se han asociado a una mayor persistencia de la mayoría de bacterias, hongos y virus.<sup>6</sup> En el caso de los virus respiratorios, éstos pueden persistir por pocos días, p. ej., el virus de influenza por uno a dos días<sup>7,8</sup> y el virus sincitial respiratorio hasta por seis horas;<sup>9</sup> mientras que los virus que causan infecciones gastrointestinales pueden persistir hasta por dos meses.<sup>10,11</sup> Por otro lado, en hospitales, las superficies con frecuencia están contaminadas con patógenos y cuando hay contacto con las manos se favorece su transmisión.<sup>8</sup>

Para desinfectar áreas y materiales de trabajo, en los laboratorios de diagnóstico e investigación, así como en hospitales de salud pública, generalmente se emplean soluciones desinfectantes como detergentes y cloro a diferentes concentraciones.<sup>12-16</sup> Existen en el mercado otros productos desinfectantes que ayudan a eliminar el crecimiento de microorganismos; recientemente se ha empleado con este fin la solución electrolizada superoxidada (SES) con pH neutro.

Este producto se prepara con agua purificada más una solución saturada de cloruro de sodio. El agua purificada se somete a un proceso de electrólisis, en el cual, el agua pasa a través de una serie de membranas que generan y controlan iones de forma estable. Al final de este proceso se obtiene una solución electrolizada, con pH neutro y cantidades controladas de iones en forma estable. En bacterias su mecanismo de acción se atribuye al efecto de oxidación de los grupos sulfhidrilo (-SH) y aminoácidos de la pared bacteriana, con lo que se afecta el proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, produciéndose oxidación de los componentes respiratorios, inhibición en la síntesis de proteínas, alteración en la energía (adenosínfosfato), rompimiento de las cadenas de RNA y represión en la síntesis de moléculas del metabolismo celular. Debido a la concentración controlada y a la estabilidad química de los iones lograda en el proceso de la SES con pH neutro, esta solución no es tóxica para las células del organismo humano. Sin embargo, este mecanismo de acción no ha sido probado con virus que infecten el aparato respiratorio. Los virus respiratorios como el virus de influenza son de fácil transmisión, y recientemente surgió un nuevo virus de influenza A, lo que justifica la necesidad de contar con desinfectantes que puedan ser utilizados en la eliminación de estos virus, ya sea disminuyendo su replicación o su viabilidad. Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la SES sobre la infectividad del virus de influenza A.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Solución electrolizada superoxidada con pH neutro.** El producto fue proporcionado por la casa fabricante Esteripharma México, SA de CV, la forma de cómo se utilizó se describe más adelante. El agua purificada se sometió a un proceso de electrólisis donde pasa a través de una serie de membranas, las cuales generan y controlan iones de forma estable.

**Cultivo celular.** Se crecieron células de riñón de perro (Madin-Darby canine kidney, MDCK) en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con medio esencial mínimo (MEM) (Gibco/BRL, New York, USA) complementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, México, DF) y antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 100 mg/mL y anfotericina B 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Propagación del virus.** Se prepararon cajas de 25 cm<sup>2</sup> con células al 80% de confluencia y se infectaron con el virus de Influenza A, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1, se incubaron durante 2 h a 37°C en cámara húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el inóculo viral y se les agregó medio incompleto (sin suero) y se incubaron en las mismas condiciones hasta la aparición del efecto citopático característico; cuando éste alcanzó entre el 70 al 80%, los virus se cosecharon y se titularon por ensayo en placa.

**Titulación de los virus por ensayo en placa lítica.** La titulación de los virus se realizó en la misma línea celular, utilizando cajas múltiples de 24 pozos (Nunclon, Rochester, NY, USA). Las células confluentes se tripsinizaron y resuspendieron en 11 mL de MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se agregaron 0.5 mL de esta suspensión por pozo. Una vez confluentes, las monocapas se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) y se realizaron diluciones del virus en medio sin suero de 10<sup>0</sup> hasta 10<sup>-10</sup> y se depositaron 0.1 mL de cada dilución en cada pozo por duplicado. Se incubaron durante 2 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir su adsorción. Después de este tiempo, se eliminó el inóculo y se lavaron las monocapas; se agregó 1.5 mL de medio incompleto con metilcelulosa al 2% estéril por cada pozo e incubó en cámara húmeda con 5%

de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta observar el efecto citopático característico (6-8 días). Después de este tiempo, se determinó el título viral contando directamente el número de placas líticas observadas en la mayor dilución, tomando en cuenta el factor de dilución (UFP/mL = número de placas x 10 x FD [donde FD es el factor de dilución; y 10, es el factor de corrección que corresponde a 0.1 mL de inóculo]).

**Efecto del desinfectante sobre la infección viral.** Se realizaron cultivos celulares en placas de 24 pozos hasta su confluencia. Se emplearon nueve diferentes concentraciones (de 0.47 a 37.5 µg) de la solución electrolizada mezclada con una dosis infecciosa constante del virus (MOI = 1.0) en un volumen final de 1 mL con MEM. Se incubó de 10 a 15 min a temperatura ambiental y, posteriormente, se inocularon en las placas de microtitulación con monocapas confluentes de células durante dos horas. Después, se retiró la mezcla de solución electrolizada y virus, se lavó con PBS estéril (pH 7.45) y a cada pozo se le agregó 1.5 mL de metilcelulosa al 2.0% en MEM para volver a incubarlo a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> hasta que se formaron las placas líticas (máximo 10 días). Se retiró la metilcelulosa, se lavó nuevamente, se agregaron 200 µL de metanol al 75%, se dejaron por 20 min y se retiraron para añadir el cristal violeta al 1% por 15 min y luego se lavó con agua corriente y se examinaron y contaron las placas líticas en el microscopio. Se calculó la dosis mínima de la solución electrolizada sobre la capacidad citopática del virus. Como controles de infección se utilizaron virus sin solución electrolizada y como controles negativos células sin infectar.

**Detección del virus de influenza tratado con SES en células MDCK.** Para comprobar la presencia del virus se buscaron los antígenos del virus por inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos fluorescentes dirigidos contra los antígenos (proteínas) del virus de Influenza A. Empleamos células sin infectar como control negativo.

**Inmunofluorescencia indirecta.** Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos específicos para el virus de Influenza A, empleando reactivos comerciales (Light Diagnostics, Chemicon, California, USA). Las células se fijaron

en portaobjetos, se cubrieron con los anticuerpos monoclonales y se incubaron por 30 a 60 min en cámara húmeda a 37°C, verificando que las preparaciones se mantuvieran siempre húmedas y en oscuridad. Al final de este período, los portaobjetos se lavaron con PBS y se cubrieron con una solución de isopropilidol al 1% (sigma) durante 5 min, después de lo cual se lavaron nuevamente con PBS y se agregó un segundo anticuerpo anti-IgM monoclonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína. En estas condiciones se dejaron incubarse durante 30 min a 37°C en cámara húmeda para, posteriormente, lavarlos varias veces con una solución de PBS con Tween-20 al 0.1%. Finalmente, se retiró el exceso de líquido con un papel secante y los portaobjetos se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

**Detección del material genético del virus por RT-PCR.** Para la extracción de RNA total a partir de cultivos inoculados con la mezcla virus-SES, la monocapa se lavó con solución salina, se agregaron 400  $\mu$ L de trizol (Invitrogen) por cada 10 cm<sup>2</sup>. Las células se desprendieron con un gendarme y se transfirieron a tubos Eppendorf libres de RNAsas, se incubaron 5 min a temperatura ambiental. Se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo (sigma) agitando suavemente durante 15 seg. Los tubos se incubaron durante 3 min a temperatura ambiental y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase superior se transfirió a otro tubo Eppendorf y se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol (sigma), se agitó suavemente e incubó 10 min a temperatura ambiental. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla que se formó se lavó dos veces con 300  $\mu$ L de etanol al 70%. Se dejó secar durante una hora a temperatura ambiental y el botón se disolvió en 40  $\mu$ L de agua con dietilpirocarbonato (DEPC). Finalmente, se cuantificó el RNA total por espectrofotometría a una densidad óptica de 260 nm.

Para la detección del genoma del virus de influenza A se realizó una RT-PCR en dos pasos. Primeramente se obtuvo el cDNA, se agregaron 6  $\mu$ L de agua DEPC, 1  $\mu$ L oligonucleótidos, 3  $\mu$ L cDNA (488  $\mu$ g/mL) y se incubaron por 10 min a 70°C, después 1 min a 4°C y enseguida se agregaron 2.5  $\mu$ L amortiguador 10x, (2.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>) 50 mM, 1  $\mu$ L dNTPs 10 mM y 2  $\mu$ L DTTs 0.1 M. La

mezcla se calentó a 42°C durante 5 min, posteriormente se adicionó 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa M-MLV. La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 50 min a 42°C, 15 min a 95°C y 3 min a 4°C. Una vez obtenido el cDNA, se corrió la PCR.

Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos del gen de la hemaglutinina reportados por Zhang *et al.*<sup>17</sup> que amplifican un fragmento de 1015 pb. Los oligonucleótidos utilizados fueron: sentido 5'- CAG-ATG-CAG-ACA-CAA-TAT-GT -3', antisentido 5' -AAA-CCG-GCA-ATG-GCT-CCA-AA -3'. La mezcla de reacción consistió en 50  $\mu$ L de volumen total (5  $\mu$ L de cDNA, 2  $\mu$ L amortiguador 10X, 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L de dNTPs, 1  $\mu$ L de oligo sentido, 1  $\mu$ L de oligo antisentido, 37.5  $\mu$ L de agua inyectable, 0.5  $\mu$ L de taq polimerasa [core kit PCR, marca Quiagen]). Como control positivo muestras de células infectadas con el virus de influenza A [ATCC A/PR/8/45 (H1N1)]. Como control de amplificación se utilizó el gen de la proteína gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenada (GAPDH), para obtener los fragmentos de 360 pb. La amplificación se realizó con una predesnaturalización a 94°C durante 5 min, desnaturalización a 94°C durante 1 min y una alineación de 52°C durante 1 min, una extensión de 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C durante 10 min. El número de ciclos fue de 35. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystem. El producto de amplificación se visualizó mediante un gel en agarosa al 2% (sigma) con bromuro de etidio (sigma), con marcador de peso molecular  $\phi$ X174 (sigma).

Todos los experimentos fueron repetidos tres veces.

## RESULTADOS

**Efecto de la SES sobre la infección del virus de influenza en MDCK.** El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la SES sobre la infectividad del virus de influenza A. Para la medición del efecto citopático se tomaron en cuenta las placas (racimos) formadas después de infectar las células con virus de influenza a una MOI = 1.0 y diferentes concentraciones de SES. Se sabe que el efecto citopático característico producido por el virus de

influenza es el redondeamiento celular seguido de la formación de cúmulos de células en forma de "racimos". En la Tabla I (A-E) se muestran los resultados obtenidos; la concentración más alta de SES (37.5  $\mu\text{g}$ ) inhibió claramente la replicación del virus de influenza (MOI = 1), ya que en promedio de tres experimentos solamente se observaron 10.33 placas, mientras que el número de placas formadas en las células infectadas con el virus de influenza en ausencia de la SES fue de 333. Estos resultados nos indican que la SES inhibió en 96.91% la replicación del virus (Tabla IG) comparada con las células infectadas con el virus sin tratar, que se consideró como el 100% de efecto citopático (Tabla IF). De igual manera, se observó que el empleo de concentraciones menores de SES reduce claramente la replicación del virus de influenza, aun a bajas concentraciones (0.47  $\mu\text{g}$ ), puesto que a esta última concentración se observó una disminución del efecto citopático (placas) viral del 40.81%.

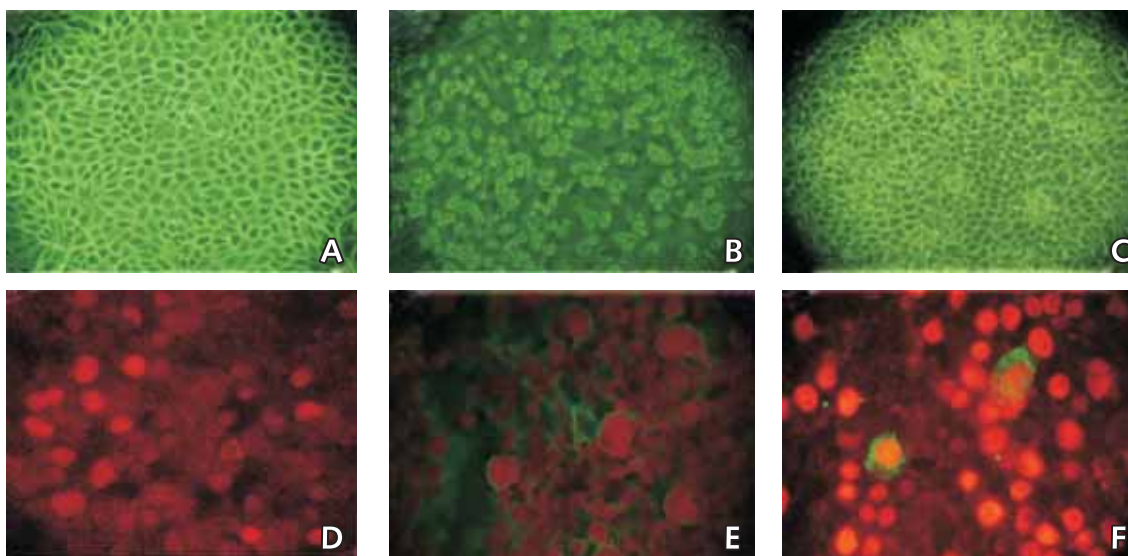
**Detección de antígenos y genoma del virus.** Para comprobar el efecto de la SES se buscaron los antígenos virales por ensayos de IFI utilizando una concentración de 37.5  $\mu\text{g}$ . La Figura 1A presenta la morfología de células MDCK no infectadas en las que no se observa

efecto citopático. También se muestran las células infectadas con el virus de influenza a diferentes tiempos. A las 72 h, se observa el efecto citopático característico producido por el virus de influenza, es decir, redondeamiento y formación de racimos celulares (Figura 1B, 1C). De igual forma, se muestra la detección del antígeno de influenza por ensayos de IFI (color verde) en las células MDCK infectadas con el virus de influenza (Figura 1E; mientras que, la señal de fluorescencia en las células infectadas con el virus de influenza preincubado con la SES es poco evidente (Figura 1F). La Figura 1D muestra los resultados de la IFI en células no infectadas, por lo que no se observa inmunofluorescencia. También se comprobó la presencia del virus buscando su material genético en las células tratadas con la mezcla de virus-SES por RT-PCR, utilizando una concentración de 37.5  $\mu\text{g}$ . Los resultados obtenidos en estos ensayos permitieron confirmar lo que la técnica de IFI ya había mostrado, es decir, que la SES inhibe al virus de influenza A en células MDCK. En la Figura 2, se presentan los resultados de la RT-PCR, se muestra el gel en el que se observa la amplificación del gen de la hemaglutinina del virus.

**Tabla I.** Efecto de la solución electrolizada superoxidada con pH neutro sobre la infección de células MDCK por el virus de Influenza A.

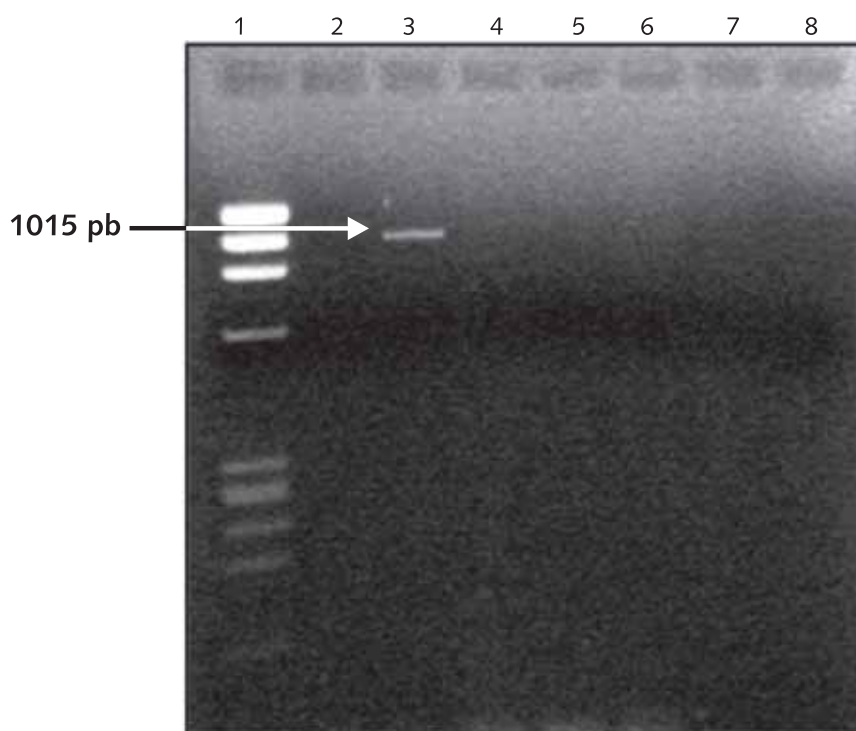
A	B Exp. 1 # placas	C Exp. 2 # placas	D Exp. 3 # placas	E Total	F % de la inf.	G % de red. de # placas
Control	0	0	0	0	0	0
Sol. elect.	0	0	0	0	0	0
Influ A (MOI=1)	300	355	345	333.33	100	0
500 $\mu\text{L}$ (37.5 $\mu\text{g}$ )	10	7	14	10.33	3.09	96.91
400 $\mu\text{L}$ (30.0 $\mu\text{g}$ )	19	25	17	20.33	6.09	93.91
300 $\mu\text{L}$ (22.5 $\mu\text{g}$ )	28	31	26	28.33	8.49	91.51
200 $\mu\text{L}$ (15.0 $\mu\text{g}$ )	50	45	38	44.33	13.29	86.71
100 $\mu\text{L}$ (7.5 $\mu\text{g}$ )	52	65	59	58.66	17.59	82.41
50 $\mu\text{L}$ (3.75 $\mu\text{g}$ )	109	95	103	102.33	30.69	69.31
25 $\mu\text{L}$ (1.875 $\mu\text{g}$ )	126	134	120	126.6	37.89	62.11
15 $\mu\text{L}$ (0.9375 $\mu\text{g}$ )	198	189	201	196	58.80	41.2
10 $\mu\text{L}$ (0.4687 $\mu\text{g}$ )	205	199	188	197.3	59.19	40.81

**% de la inf.:** Indica el número porcentual de células infectadas; **% de red. de # placas:** Es el % de reducción del número de placas e indica el porcentaje de inhibición de la replicación viral comparada con la replicación registrada en las células infectadas con el virus de influenza (MOI = 1) sin tratar con la SES, el cual fue considerado como el 100% de la infección.



**Figura 1.** Efecto de la SES en la infección del virus de influenza A. **A)** células MDCK sin infectar; **B y C)** detección del efecto citopático producido por la infección del virus de influenza en células MDCK; **D)** inmunofluorescencia de células sin infectar; **E)** detección de antígenos del virus de influenza en células infectadas con el virus de influenza sin tratar con SES; **F)** inmunofluorescencia de células infectadas con el virus de influenza preincubado con la SES durante 15 min.

285



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo (células sin infectar); carril 3, células infectadas con el virus de influenza A; carriles 4 al 8, células incubadas con la mezcla virus-SES.

## DISCUSIÓN

La distribución de los virus de influenza es mundial y su diseminación en las comunidades es por vía respiratoria, ya sea en aerosoles o contacto con manos contaminadas. Esta última forma también es importante en la contaminación de objetos y materiales, en los cuales el virus puede permanecer de 24 a 48 h.<sup>7,8</sup>

Los virus son microorganismos muy peculiares, estructuralmente diferentes a la de otros microorganismos, y son pocas las sustancias para la eliminación de éstos. Por ello es necesario contar con sustancias que permitan eliminarlos y que, además, no sean tóxicos para el ser humano ni para el medio ambiente. Algunos desinfectantes como el cloro,<sup>18-26</sup> el glutaraldehído<sup>27-29</sup> y el formaldehído<sup>30-32</sup> son efectivos para eliminar diferentes patógenos, incluyendo a los virus. En el mercado se están usando nuevos productos para desinfectar,<sup>33</sup> entre ellos la SES. Debido a la preparación y concentración controlada de la SES, y a la estabilidad química de los iones lograda en su proceso de elaboración y con pH neutro, no es tóxico para las células humanas. En el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana, México, Nachón-García *et al* realizaron un estudio en el que la SES resultó inocua al ser administrada en la cavidad peritoneal de ratas Wistar.<sup>34</sup> Por otro lado, las infecciones adquiridas en la comunidad y llevadas al hospital por pacientes pueden convertirse en infecciones hospitalarias, que afectarán a otros pacientes y al personal, muchas de ellas son prevenibles. Es posible que los virus causen más infecciones hospitalarias de lo que antes se creía, principalmente los virus de transmisión respiratoria y de manera importante, los virus de influenza. Significando con ello, que la prevención de este tipo de infecciones es de alta prioridad. La eliminación o reducción de las fuentes de dichas infecciones es posible al desinfectar instrumentos, ropa y otros objetos potencialmente contaminados, además, del lavado de manos, por lo que contar con productos capaces de evitar la propagación de virus sería un recurso valioso. Los resultados del trabajo que realizamos con el virus de influenza muestran que, tanto el efecto citopático como la detección de los antígenos y genoma del virus de influenza disminu-

yeron en las células que fueron infectadas con el virus previamente preincubado con 10  $\mu$ L (0.47  $\mu$ g) de SES durante 15 min (Figura 1C y 1F), y que el efecto es aún más notable con concentraciones mayores de la SES y que este efecto no va dirigido a las células.

## REFERENCIAS

1. Lamb AR, Krug MR. Orthomyxoviridae: *The viruses and their replication*. In: Fields NB, Knipe DM, Howley PM, *et al*, editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996.p.1353-1395.
2. Weber CJ. *Update on preparing for the next influenza pandemic*. Dermatol Nurs 2006;18:362-366.
3. Manjarrez ME, Arenas LG. *Virus influenza: Enigma del pasado y del presente*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1999;12:290-299.
4. Thompson WW, Comanor L, Shay DK. *Epidemiology of seasonal influenza: use of surveillance data and statistical models to estimate the burden of disease*. J Infect Dis 2006;194 Suppl 2:82-89.
5. Rosete DP, Archundia SFJ, Cabello GC, Manjarrez ZME. *Patogenia de las infecciones respiratorias por virus*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2002;15:239-254.
6. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*. BMC Infect Dis 2006;6:130.
7. Bures S, Fishbain JT, Uyehara CF, Parker JM, Berg BW. *Computer keyboards and faucet handles as reservoirs of nosocomial pathogens in the intensive care unit*. Am J Infect Control 2000;28:465-471.
8. Bean B, Moore BM, Sterner B, Peterson LR, Gerding DN, Balfour HH Jr. *Survival of influenza viruses on environmental surfaces*. J Infect Dis 1982;146:47-51.
9. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. *Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus*. J Infect Dis 1980;141:98-102.
10. Hara J, Okamoto S, Minekawa Y, Yamazaki K, Kase T. *Survival and disinfection of adenovirus type 19 and enterovirus 70 in ophthalmic practice*. Jpn J Ophthalmol 1990;34:421-427.
11. Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pintó RM, Bosch A. *Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses*. Appl Environ Microbiol 2001;67:3904-3907.
12. McDonnell G, Russell AD. *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*. Clin Microbiol Rev 1999;12:147-179.
13. Gasparini R, Pozzi T, Magnelli R, *et al*. *Evaluation of in vitro efficacy of the disinfectant Virkon*. Eur J Epidemiol 1995;11:193-197.
14. Maillard JY, Russell AD. *Viricidal activity and mechanisms of action of biocides*. Sci Prog 1997;80(Pt 4):287-315.
15. Angelillo IF, Bianco A, Nobile CG, Pavia M. *Evaluation of the efficacy of glutaraldehyde and peroxygen for disinfection of dental instruments*. Lett Appl Microbiol 1998;27:292-296.

16. Tyler R, Ayliffe GA. *A surface test for virucidal activity of disinfectants: preliminary study with herpes virus*. J Hosp Infect 1987;9:22-29.
17. Zhang WD, Evans DH. *Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction*. J Virol Methods 1991;33:165-189.
18. Bloomfield SF. *Chlorine and iodine formulations*. In: Ascenzi JM, editor. *Handbook of disinfectants and antiseptics*. New York: Marcel Dekker; 1996.p.133-158.
19. Cookson BD, Farrelly H, Stapleton P, Garvery RP, Price MR. *Transferable resistance to triclosan in MRSA*. Lancet 1991;337:1548-1549.
20. Bloomfield SF, Smith-Burchnell CA, Dalglish AG. *Evaluation of hypochlorite-releasing disinfectants against the human immunodeficiency virus (HIV)*. J Hosp Infect 1990;15:273-278.
21. Dychdala GR. *Chlorine and chlorine compounds*. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization and preservation*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991.p.131-151.
22. Best M, Springthorpe VS, Sattar SA. *Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of microorganisms*. Am J Infect Control 1994;22:152-162.
23. Chawner JA, Gilbert P. *A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine*. J Appl Bacteriol 1989;66:243-252.
24. Dennis WH, Olivieri VP, Kruse CW. *Mechanism of disinfection: incorporation of CI-36 into f<sub>2</sub> virus*. Water Res 1979;13:363-369.
25. Mbithi JN, Springthorpe VS, Sattar SA. *Chemical disinfection of hepatitis A virus on environmental surfaces*. Appl Environ Microbiol 1990;56:3601-3604.
26. Rice EW, Adcock NJ, Sivaganesan M, Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE. *Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1)*. Emerg Infect Dis 2007;13:1568-1570.
27. Russell AD, Munton TJ. *Bactericidal and bacteriostatic activity of glutaraldehyde and its interaction with lysine and proteins*. Microbios 1974;11:147-152.
28. Russell AD, Russell NJ. *Biocides: activity, action and resistance*. In: Hunter PA, Darby GK, Russell NJ, editors. *Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends*. England: Cambridge University Press; 1995;53:327-365.
29. Russell AD, Vernon GN. *Inhibition by glutaraldehyde of lysostaphin-induced lysis of Staphylococcus aureus*. Microbios 1975;13:147-149.
30. Adler-Storthz K, Schulster LM, Dreesman GR, Hollinger FB, Melnick JL. *Effect of alkaline glutaraldehyde on hepatitis B virus antigens*. Eur J Clin Microbiol 1983;2:316-320.
31. Power EGM. *Aldehydes as biocides*. Prog Med Chem 1995;34:149-201.
32. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. *The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups*. J Am Chem Soc 1948;70:2673-2684.
33. Rutala WA, Weber DJ. *New disinfection and sterilization methods*. Emerg Infect Dis 2001;7:348-353.
34. Nachón-García FJ, Díaz-Téllez J, Nachón-García MG. *Tolerancia peritoneal a la solución de alta selectividad iónica con pH neutro en ratas macho Wistar*. Revista Médica de la Universidad Veracruzana 2005;5(2). Fecha de acceso: 5 de abril, 2010. Accesible en: URL [http://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol5\\_num2/articulos/tolerancia.htm](http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol5_num2/articulos/tolerancia.htm)

## ✉ Correspondencia:

Dra. María Eugenia Manjarrez Zavala,  
 Jefe del Departamento de  
 Investigación en Virología. Instituto  
 Nacional de Enfermedades  
 Respiratorias Ismael Cosío Villegas.  
 Calzada de Tlalpan 4502, colonia  
 Sección XVI. México, D.F., 14080  
 Teléfono 54 87 17 00  
 extensión 5123  
 Correo electrónico:  
 e\_manjarrez@yahoo.com