

**Revisión de los métodos de inactivación para la extracción segura
de muestras de unidades de alta bioseguridad (alta contención y
contención máxima)**

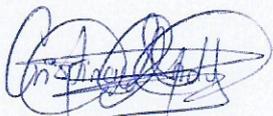
Presentado por: Cristina Rosalba Andy Chimbo

Dirigido y autorizado por: Xavier Abad Morejón de Girón

Margarita Martin Castillo

2019-2020

Revisión de los métodos de inactivación para la extracción segura de muestras de unidades de alta bioseguridad (alta contención y contención máxima)



Cristina Andy Chimbo
Estudiante

Xavier Abad Morejon
de Giró - DNI
35082196C (SIG)

Signat
digitalment per
Xavier Abad
Morejon de Giró
- DNI 35082196C
(SIG)
Data: 2020.09.02
14:42:14 +02'00'

Xavier Abad
Director

**MARGARITA
MARTIN
CASTILLO - DNI
38495764C**

Firmado digitalmente por
MARGARITA MARTIN CASTILLO -
DNI 38495764C
Nombre de reconocimiento (DNI):
c=ES, sn=MARTIN CASTILLO,
givenName=MARGARITA,
serialNumber=IDCES-38495764C,
cn=MARGARITA MARTIN CASTILLO -
DNI 38495764C
Fecha: 2020.09.02 14:08:14 +02'00'

Margarita Martin
Tutor

2019-2020

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Criterios de inclusión y exclusión.	8
4. RESULTADOS	8
4.1 MÉTODOS FÍSICOS	8
Tratamiento por calor o térmico	8
Radiación gamma con Co60	12
Radiación ultravioleta	13
4.2 MÉTODOS QUÍMICOS	15
Tratamiento con Trizol®	15
Tratamientos con tampón de lisis AVL, RLT, Mag-MAX	17
Tratamiento con solvente/detergente (S/D)	19
Tratamiento con Beta-propiolactona (BPL)	20
Tratamiento con Etilenimina binaria (BEI)	21
Tratamiento con fijadores; Formaldehído, Glutaraldehído, Paraformaldehído (PFA), Formalina Tamponada Neutra (NBF), Metanol: Acetona (M/A)	23
4.3 MÉTODOS FISICOQUÍMICOS	24
5. TRATAMIENTOS PARA LA DESINFECCIÓN DE LOS CONTENEDORES DE LAS MUESTRAS INACTIVADAS	25
6. CONSIDERACIONES FINALES	26
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	41

ABREVIATURAS

AMT: 4'-aminomethyl-trioxsalen, 4'-aminometil-trioxsalen
BSC: Biosafety cabinet; Cabina de Seguridad Biológica
BSL: Biosafety level; Nivel de bioseguridad
BEI: Binary ethyleneimine; Etilenimina binaria
BVDV: Bovine viral diarrhea virus; Virus de la diarrea viral bovina
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades.
CHIKV: Chikungunya virus; Virus del Chikunguña
CRSA: Centro de Investigación de Sanidad Animal
EBOV: Ebola virus; Virus del Ébola
CPE: Cytopathic effect; Efecto citopático
CFU: Colony forming unit; Unidad de formación de colonia
EEO: Encefalitis Equina Occidental
EEV: Encefalitis Equina Venezolana
ELD₅₀: Median egg lethal doses; Dosis letal media del huevo
EID₅₀: Median embryo infectious dose; Dosis infecciosa 50% en embrión de huevo
GR: Grupo de Riesgo
HEV: Hepatitis E virus; Virus de la Hepatitis E
HAV/ VHA: Hepatitis A virus; Virus de la Hepatitis A
HPAI: Highly Pathogenic Avian Influenza; Virus influenza aviar altamente patogénico
H5N1: Subtipo de la Influenza Aviar
IA: Influenza Aviar
LASV: Virus de Lassa
LACV: La Crosse encephalitis virus; Virus La Crosse
MARV: Virus de Marburgo
MERS-CoV: Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
Mrads: Megarads (Una unidad de radiación equivalente a un millón de Rads)
MDCK: Madin-Darby Canine Kidney cells; Células del riñón canino de Madin-Darby
NiV: Nipah virus; Virus del Nipah
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Tampón Fosfato Salino
RF: Reduction Factor; Factor de Reducción
RRV: Ross River Virus; Virus del Rio Ross
RVFV: Rift Valley fever virus; Virus de la Fiebre del Valle del Rift
SARS-CoV: Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave
SARS-CoV2: Segundo Coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, año 2019
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate; Dodecilsulfato Sódico
TBEV: Tick-borne encephalitis virus; Virus de la encefalitis transmitido por garrapatas
TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infectious Dose; Dosis Infecciosa del Cultivo de Tejidos 50%.
PFU/ UFP: Plaque forming Units; Unidades Formadoras de Placa;
UV-A: Ultravioleta de longitud de onda larga
UV-B: Ultravioleta de longitud de onda media
UV-C: Ultravioleta de longitud de onda corta
µl: Microlitro
µW: Microvatío
VFHs: Viral Hemorrhagic Fevers; Fiebres hemorrágicas virales
WNV/ VNO: West Nile Virus; Virus de la Fiebre del Nilo Occidental
W: Váticos

RESUMEN

A lo largo de la historia los virus y bacterias han estado relacionadas con un sinnúmero de enfermedades de carácter zoonótico que han desencadenado sucesos epidémicos e incluso de tipo pandémico como el actual SARS-CoV2. Por este motivo, los laboratorios de microbiología y sus investigadores han enfatizado su interés en descubrir las formas más seguras y prácticas de poder manipular estos microorganismos patógenos. El principal proceso para alcanzar este objetivo es la inactivación, proceso que hace que un microorganismo patógeno disminuya o pierda totalmente su capacidad de causar infección o daño, pero que debe permitir la conservación de sus características físicas o químicas según el método aplicado. Dentro de los métodos de inactivación podemos mencionar a los tratamientos físicos, químicos o físico químicos. El presente trabajo se enfocó en la recopilación de estos métodos utilizados en laboratorios de alta y máxima biocontención, con la finalidad de recabar datos, ventajas e inconvenientes de los mismos, su eficiencia y seguridad para inactivar muestras virales o bacterianas y que puedan ser manipuladas en laboratorios de menor biocontención. El resultado de esta búsqueda fue que todos los métodos antes descritos son apropiados para inactivar muestras infecciosas, y que su uso depende de algunos factores como son; propósito final de las muestras inactivadas, tipo y característica de la muestra (suero, sangre entera o tejido), tipo y características físico-químicas de los virus o bacterias a inactivar, accesibilidad del laboratorio por determinados equipos o compuestos químicos y su relación costo-beneficio. Además, de los riesgos que pueden representar para la salud, por el uso continuo de un determinado tratamiento y qué margen de seguridad tiene cada uno de ellos, de acuerdo con su proceso de validación.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación y el diagnóstico de microorganismos altamente patógenos, como ciertas bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*) y virus (Ébola y otros VHF, virus emergentes como coronavirus y virus influenza HPAI) deben realizarse en laboratorios de biocontención para poder salvaguardar todo material infeccioso del exterior (Kraus & Mirazimi, 2014). Esta biocontención está relacionada con factores físicos y constructivos asociados al diseño de un laboratorio, así como a los equipos que en él se instalen (cabinas de seguridad, jaulas de animales, *airlock*, sistemas de filtrado de aire HEPA, etc.) (Abad, 2010). Todo esto es necesario para prevenir posibles infecciones accidentales de los investigadores o del personal de diagnóstico, así como también para evitar la liberación de los agentes infecciosos al medio ambiente circundante (Kraus & Mirazimi, 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los agentes infecciosos se clasifican en 4 grupos de riesgo (GR): GR 1 - riesgo mínimo, GR2 riesgo moderado, GR3 - alto riesgo y GR4 - muy alto riesgo. La clasificación está basada a partir de parámetros específicos de cada microorganismo patógeno, considerando la ruta de transmisión, gravedad de la enfermedad, dosis infecciosa, pero también medidas preventivas disponibles y la transmisibilidad a la comunidad. Estas características pueden estar influenciadas por la densidad e inmunidad de la población, presencia de vectores y normas de higiene ambiental (Kraus & Mirazimi, 2014).

Por lo tanto, para definir el nivel de bioseguridad de los laboratorios (Biosafety Level, BSL, en inglés) son de primordial importancia las características de biocontención y los procedimientos de operación con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo. Se establecen, pues, 4 niveles de laboratorios de acuerdo con el concepto de bioseguridad y biocontención siendo; BSL1; Básico, BSL2; acceso restringido, BSL3; alta biocontención y BSL4, máxima biocontención (OMS, 2005).

Específicamente, las instalaciones BSL3 o de alta biocontención son adecuadas para manipular agentes autóctonos o exóticos de alto potencial de transmisión en aerosol y que puedan causar infecciones graves y/o letales. Así mismo, los centros BSL4 o laboratorios de máxima biocontención son aptos para agentes exóticos que representan un alto riesgo individual de enfermedades mortales por aerosoles infecciosos y para los que no se dispone

de tratamiento pre-exposición (vacuna) ni post-exposición (antivíricos) (Chosewood & Wilson, 2009).

Cada vez son más el número de patógenos zoonóticos víricos con cadena de ARN que son objetivos importantes de investigación debido a su potencial patogénico y a la posibilidad de propagarse en nuevos huéspedes (zoonosis emergentes) o regiones (Alfson & Griffiths, 2018). Numerosas investigaciones en los últimos años en el campo de las enfermedades infecciosas se han enfocado cada vez más en infecciones virales emergentes debido a los últimos acontecimientos sanitarios (virus de la gripe aviar de alta patogenicidad, los coronavirus del SARS, el coronavirus del MERS, emergencia del virus de la peste porcina africana en multitud de países). Y todo esto ha originado un incremento en el número de laboratorios de alta biocontención, o de bioseguridad nivel 3 (BSL3), para manipular de forma segura estos virus (Abad et al., 2012). De igual forma los laboratorios de máxima contención (BSL4) están dedicados a manejar exclusivamente patógenos altamente peligrosos (Ébola, Nipah, Marburgo, Crimea Congo) para la salud humana (CDC et al., 2018).

Los virus de alta patogenicidad de origen humano o animal se deben manipular en laboratorios BSL3 o BSL4. Sus cultivos o las muestras que los contengan deben ser inactivados antes de ser enviados o utilizados en instalaciones BSL2 para estudios de tipo molecular o inmunológicos (Schneider *et al.*, 2015). Para ello, *The Federal Select Agent Program* (www.selectagents.gov) define la inactivación como un procedimiento que hace que una muestra de un agente selecto, sus ácidos nucleicos o sus extractos dejen de ser viables, dejen de suponer un peligro, pero conservando al mismo tiempo las características de interés para su uso futuro. Cabe recalcar que también se reconoce que este procedimiento no es alcanzable con un 100% de seguridad (el riesgo cero no existe) desde el punto de vista práctico. Dentro de los métodos de inactivación utilizados para hacer no viable las muestras podemos distinguir: físicos (calor, radiación gamma, radiación UV), químicos (tampones de lisis de ácidos nucleicos, 10% de formalina amortiguada neutra) o fisicoquímicos (psoralenos) (CDC *et al.*, 2018).

Por tanto, cualquier suspensión de virus infecciosos o potencialmente infecciosos, o muestras que los contengan, que tengan como destino realizar investigaciones posteriores (anatomía patológica, proteómica, biología molecular, técnicas inmunológicas) necesitarán ser inactivadas por cualquiera de los métodos antes descritos. En lo que respecta a las muestras,

el CDC (2017) las clasifica en tres categorías: agentes (cultivos celulares, muestras de tejido, etc.), extractos (ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, etc.) o materiales que contienen agentes selectos que son sometidos a un proceso (por ejemplo, filtración) para eliminar todas las células viables, esporas o partículas de virus.

Dependiendo de la categoría de la muestra a inactivar se podrá optar por el método de inactivación más adecuado acorde a sus características físicas o bioquímicas (sólido, líquido, semilíquido o congelado, tejidos, albúmina, derivados de plasma). Un tratamiento físico-térmico es la pasteurización, de probada eficacia y con registro de seguridad muy consolidado. Su eficiencia se ve modificada por la temperatura, el tiempo y la presencia de estabilizadores en la muestra, los cuales pueden actuar como protectores de las proteínas de interés o de los virus existentes (Abad *et al.*, 2000). También existen otros métodos de inactivación referente a bacterias, dentro de los cuales mencionamos el tratamiento químico con paraformaldehído (PFA) al 4% para la inactivación de *Burkholderia pseudomallei* y *Francisella tularensis*, permitiendo la extracción de muestras de células fijadas desde contención del BSL3, para citometría de flujo (Emery *et al.*, 2014).

Para completar el trabajo de inactivación de una muestra que ha sido inactivada o disminuida su peligrosidad de manera exitosa se requiere una demostración o prueba de validación de estas y su procedimiento antes de que sean enviadas a un laboratorio de menor biocontención (CDC *et al.*, 2018).

Con todos estos antecedentes, los laboratorios microbiológicos y biomédicos han convertido en código de práctica la seguridad biológica. Este código aborda la manipulación y la contención seguras de los microorganismos infecciosos y los materiales biológicos peligrosos, basándose en dos principios fundamentales: la contención y la evaluación de riesgos, para prevenir las infecciones asociadas al laboratorio (LAI) o la involuntaria liberación del patógeno al medio ambiente (Chosewood & Wilson, 2009).

En base a estos principios y prácticas, una muestra de un laboratorio BSL3 o BSL4 puede pasar a uno de menor nivel de bioseguridad, con estándares óptimos de seguridad. En el laboratorio de destino, estas muestras deben manipularse con la máxima precaución posible dentro del nivel de bioseguridad del laboratorio y estar el personal alerta en caso de reacciones o resultados inesperados. Los incidentes ocurren, a pesar de validaciones y controles. Es así que podemos mencionar algunos ejemplos: el incidente ocurrido en la

Subdivisión de Patógenos Especiales Virales que involucró una liberación involuntaria de ántrax (*B. anthracis*) en el Campus Roybal, Atlanta-Georgia (CDC, 2014). En el mismo año, la inadvertida contaminación cruzada de una muestra de laboratorio con el virus de la gripe H5N1 en los laboratorios de la División de Gripe, así como también la posible exposición al virus Ébola en el mismo campus anteriormente mencionado en el año 2015 (CDC, 2015). Todos estos casos ocurrieron en laboratorios de máxima contención del CDC. El CDC, en un acto de transparencia estimable, actuó de manera ágil ante estos incidentes para evitar consecuencias devastadoras, marcando con ello un precedente para instaurar protocolos aún más estrictos como: instauración de una revalidación cuando se aplican nuevos diseños de investigación para extracción de muestras (ácido fórmico o ácido fórmico/ acetonitrilo), registro preciso de cada una de las actividades que se realizan en el interior del laboratorio, prevenir cualquier transferencia inadvertida, así como estudios en modelos animales más seguros mediante un plan de estudio. Dicho plan contempla que los protocolos sean probados por un supervisor antes de su instauración y la validación del procedimiento en sí. Afortunadamente estos errores humanos no produjeron consecuencias graves, pero quedó comprobado la gran responsabilidad que poseen los laboratorios de máxima contención al manipular patógenos generalmente mortales, que pueden comprometer el bienestar de la sociedad y su entorno (CDC, 2014). Para reducir al mínimo la probabilidad de acontecimientos de esta naturaleza, resulta muy importante instaurar procesos de capacitación constante al capital humano, así como reevaluar continuamente los procedimientos.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica acerca de los métodos de inactivación de virus, pertenecientes al grupo de riesgo de alta y máxima biocontención, que se han utilizado y se han publicado. Esto nos permitirá conocer, revisar y analizar los procedimientos, protocolos y especificaciones establecidos coadyuvando a minimizar posibles riesgos dentro y fuera del laboratorio, sin comprometer el enfoque One Health (la salud humana, animal o ambiental).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica de los diferentes métodos de inactivación para la extracción segura de muestras de laboratorios de alta y máxima biocontención hacia laboratorios de nivel de bioseguridad inferior de acuerdo con su uso final (o su finalidad).

2.2 Objetivos específicos

- Recopilar de manera sistemática la información de los diferentes métodos y/o procedimientos realizados en laboratorios nivel 3 y nivel 4 de bioseguridad según el agente patógeno a inactivar, virus o bacterias, de los grupos de riesgo 3 y 4 de acuerdo con la clasificación establecida por la Organización Mundial de la Salud.
- Analizar los métodos recopilados para obtener información relevante de cada uno de ellos (título inicial y factor de reducción de la muestra inactivada y parámetros críticos).
- Diferenciar los métodos de inactivación más utilizados, o preferentes, de acuerdo con su finalidad.
- Desinfección de las superficies externas de los contenedores de material biológico inactivado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos, boletines, reportes, tesis y libros online comprendida durante el periodo del mes de marzo hasta mayo del presente año. Las principales fuentes de búsqueda en primera instancia fueron Google Scholar, documentos y guías de prácticas microbiológicas, biocontención y bioseguridad, publicados por organismos nacionales (CReSA) e internacionales (OMS y CDC). Posteriormente se indagó revisiones en base de datos de bioseguridad en laboratorios Scopus. El gestor bibliográfico utilizado fue Mendeley. La búsqueda ha sido realizada principalmente en el idioma inglés debido a que es la lengua vehicular en el campo de laboratorios de microbiología y biomédica. Las palabras clave utilizadas para esta búsqueda han sido: Virus inactivation+ laboratory level 3 and laboratory level 4; virus and inactivation and BSL3/ BSL4 samples inactivation+laboratory +level 3 extraction+inactivation+samples+laboratory level 3 ultraviolet inactivation, gamma irradiation, BEI inactivation virus inactivation WNV, EBOV, CHIKV, SARS-CoV2,BPL viral inactivation, pathogen inactivation, Bromoethylamine, BPL viral inactivation, Beta-propiolactone methods, emerging viruses, BPL treatment, safety testing.

3.1 Criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta para la recopilación bibliográfica:

- Artículos relacionados con biocontención y bioseguridad de laboratorios nivel 3 y nivel 4.
- Inactivación de muestras virales o bacterianas que contengan microorganismos patógenos del grupo de riesgo 3 y 4 y cuyo resultado de inactivación sea poder manipular con seguridad en investigaciones posteriores a dicho proceso.
- Artículos cuyo proceso de inactivación hayan pasado por un proceso de validación y de los cuales se puedan obtener datos numéricos sobre dicho proceso
- Publicaciones realizadas en inglés y español, mayoritariamente posteriores al año 2000 hasta la actualidad.
- Artículos científicos de acceso libre, y otros de pago mediante la biblioteca virtual de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Se excluyeron artículos en los que el proceso de inactivación elimina o destruye por completo al agente patógeno, sin opción a realizar estudios posteriores. En definitiva, los procesos que mayoritariamente son utilizados en la desinfección de objetos y superficies de un área definida (laboratorios, granjas, hospitales).

4. RESULTADOS

En total se encontraron 129 artículos, de los cuales se preseleccionaron y citaron 69, pero solo 43 cumplieron con los criterios de inclusión 3 para realizar el trabajo. De la lectura de estos, podemos distinguir diferentes tipos de tratamientos en función del método de inactivación.

4.1 MÉTODOS FÍSICOS

Tratamiento por calor o térmico

El tratamiento térmico es la exposición a altas temperaturas de productos o muestras biológicas con presencia viral o bacteriana. Esta exposición térmica a la que se someten estos

microorganismos puede causar la desnaturalización de las proteínas, el desenrollamiento de las cadenas ADN o ARN y la desestabilización de su estructura superficial (Asenjo, 2018).

A medida que aumenta la temperatura implica dos posibles resultados, una reducción de la infectividad o la eliminación total del agente patógeno, en ambos casos siendo un proceso irreversible (Asenjo, 2018). La inactivación térmica está representada por la pasteurización y el calor en seco. La pasteurización es el método más comúnmente utilizado en la industria alimentaria para inactivar microorganismos y también tiene su aplicación en las normas de la farmacopea. Los grados de temperatura y el tiempo de exposición al calor dependerá del estado físico de la muestra (sangre entera, suero, tejido) y su objetivo de uso posterior (Abad, *et al.*, 2000).

Patógenos habitualmente manejados en nivel 3 de bioseguridad, como los flavivirus, coronavirus, alfavirus y arbovirus, han sido inactivados con satisfacción por tratamiento térmico (Abad *et al.*, 2012; Asenjo 2018; Darnell *et al.*, 2004). También virus del GR4 y que se manipulan en un nivel de bioseguridad 4 como el Ébola, Lassa, Marburgo han sido sometidos con éxito a este método de inactivación para estudios posteriores con fines de diagnóstico serológico o técnicas inmunológicas (Mitchell & McCormick, 1984).

El tratamiento térmico ha sido reconocido desde hace décadas como un método eficaz para inactivar los virus (Mitchell & McCormick, 1984); por ejemplo, los virus de la gripe (Asenjo, 2018). Su inactivación se encuentra en el rango de los 50 a 60°C, determinada por la desnaturalización de las proteínas más termolábiles, esenciales para causar infección (Mitchell & McCormick, 1984). El efecto de la temperatura en la supervivencia de algunos virus (influenza aviar) puede verse influenciada por condiciones ambientales, como la presencia de materia orgánica, pH o salinidad del medio (De Benedictis *et al.*, 2007).

Para determinar el efecto de la inactivación térmica en los componentes del suero humano enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB), y con presencia de patógenos víricos del GR 4 (Lassa, Marburgo y Ébola), se sumergieron muestras que los contenían en baño de agua a 60°C. Se obtuvo una reducción de 5 log₁₀ UFP/ml a los 37 minutos para los virus Lassa y Marburgo y a los 22 minutos para el virus Ébola (por tanto, más sensible). La tasa de inactivación (log₁₀ virus PFU por log de tiempo) para cada uno de los virus fue: Virus de Lassa, -3.19; virus del Ébola, -3.73; y virus de Marburgo, -3.19. Y todo ello, sin alterar los

niveles séricos de glucosa, nitrógeno ureico en sangre y electrolitos de las muestras inactivas (Mitchell & McCormick, 1984).

El tratamiento térmico también se ha utilizado para la inactivación de diferentes cepas del virus de la Influenza tipo A de diferentes especies animales (aves y cerdos). La cepa aviar H1N1 y la cepa porcina H1N1 se inactivaron a 70°C en 15 minutos, con reducciones de 3.3 log₁₀ y de 2.5 log₁₀ respectivamente. A 56°C el tratamiento térmico sólo fue efectivo en la cepa porcina H1N1, mas no en la cepa aviar (Asenjo, 2018). Cepas de virus de influenza aviar de alto título (10⁴ a 10⁵ ELD₅₀/ml) retuvieron su infectividad a 56°C por 30 minutos, pero fueron completamente inactivadas después de 60 minutos de exposición a la misma temperatura (56°C) o después de 10 minutos a 60°C (De Benedictis et al., 2007). Datos semejantes han sido reportados para la cepa HPAI H7N9, con títulos infecciosos iniciales de 10^{7.7} EID₅₀/50µl; ausencia de infectividad residual con tratamientos de 56°C durante 30 minutos, 65°C durante 10 minutos, y tiempos de 1 minuto para temperaturas superiores (70°C, 75°C y 100°C) (Zou *et al.*, 2013). De forma similar, la cepa HPAI H7N1 y el VNO se inactivaron totalmente a 70°C en 5 o 15 minutos, con reducciones de 4.6 log₁₀ TCID₅₀, mismo valor que se alcanza a 100°C durante 8 minutos, a partir de un título inicial de 6.5 log₁₀ TCID₅₀/ml (Abad *et al.*, 2012).

Un estudio de la infectividad del CHIKV, a temperatura de 56°C y utilizando suspensiones víricas de alto título (7.66 log₁₀TCID₅₀/ml) y bajo título (4.52 log₁₀TCID₅₀/ml) y en diferentes periodos de tiempo (40, 80 y 120 minutos) dio como resultado que para cargas altas, los títulos residuales fueron 3.81 log₁₀TCID₅₀/ml (40 min), 1.11 log₁₀TCID₅₀/ml (80 min) y 1 log₁₀TCID₅₀/ml (120 min) y ausencia de infectividad residual a los 160 min; se alcanzan, pues, casi 4 log₁₀ RF ya a los 40 minutos. Por el contrario para cargas inferiores no se detectaron viriones infecciosos después de 40, 80, 120 minutos, lo que implica más de 3.5 log₁₀ (Huang *et al.*, 2015). También han sido evaluados otros alfavirus como Virus de Rio Ross (RRV), virus del bosque Barmah (BFY) y virus o'nyong-nyong (ONNV) denominados virus del Viejo Mundo. Recibieron un tratamiento térmico en un baño de agua a 56°C y diferentes tiempos de contacto (20, 40 y 60 minutos) y títulos iniciales que estuvieron en un rango de 4 a 7 log₁₀TCID₅₀/ml, en función del virus. El virus RRV tuvo un factor de reducción de 3-4 log a los 20 minutos de exposición a 56°C, mientras que a los 40 minutos alcanzó 4-5 log. El BFY, a título alto tuvo factores de reducción de 6.97 log a los 20 minutos y pasó a indetectable a los 40 minutos; a título bajo ya no se detectó a los 20 minutos. El

virus ONNV a los 20 minutos tuvo RF de 3.37 y 5.34 log₁₀ para títulos de partida bajos y altos, respectivamente (Park *et al.*, 2016).

El virus de la EEV con título infeccioso superior a 10⁸ UFP/ml se inactivó a 80°C en 60 minutos, resultando muestras finales sin efecto citopático. Por el contrario, el mismo virus expuesto a una temperatura menor (58°C) mostró CPE en todas las muestras tratadas (Patterson *et al.*, 2018).

Otros virus típicamente manipulados en alta contención son virus de la familia *Coronaviridae* como el virus del SARS-CoV, MERS-CoV y el actual SARS-CoV2, que causa la enfermedad denominada CoVID19. Cuando se sometió SARS-CoV, a diferentes tratamientos térmicos (56°C, 65°C y 75°C) durante periodos de tiempo creciente, se comprobó que una exposición a 75°C por 45 minutos era efectiva, mientras que a temperaturas inferiores (56 y 65°C) se necesitaban 90 minutos para alcanzar el mismo efecto (Darnell *et al.*, 2004). El virus MERS-CoV parece algo más sensible; temperaturas de 56°C para 25 minutos de exposición lograron reducciones de 4 log₁₀. Cuando el virus MERS-CoV fue expuesto a temperaturas de 65°C la pérdida de infectividad se alcanzó en tiempos muy cortos (1 minuto) (Leclercq *et al.*, 2014).

Para el nuevo SARS-CoV2, se han realizado diferentes evaluaciones para confirmar su total inactivación y permitir el uso de las muestras inactivadas con fines clínicos e investigativos. Chin y colaboradores, en 2020, han demostrado caídas de 3 log₁₀ TCID₅₀ a temperaturas de 37°C y tiempos de contacto de 1 día; cuando el tratamiento térmico se lleva a 56°C se consigue la misma reducción en 10 minutos; si el tratamiento es efectuado a 70°C no se detecta infectividad residual a los 5 minutos (implicando RF superior a 3 log₁₀) (Chin *et al.*, 2020). Otros autores han realizado tratamientos térmicos más agresivos, exposición de 92°C por 15 minutos, que han permitido alcanzar RF de 6 log₁₀, partiendo de títulos víricos iniciales de 3.3x10⁶ log₁₀TCID₅₀/ml (Pastorino, *et al.*, 2020). Temperaturas un poco inferiores, de 80°C, por 60 minutos, también resultaron en la reducción total de infectividad del mismo virus a concentraciones iniciales de 10⁷ UFP/ml (Patterson *et al.*, 2020).

Además de la manipulación de virus de alta y máxima biocontención, también están presentes bacterias de alta peligrosidad. Dentro de este grupo de riesgo 3 las bacterias no formadoras de esporas (*Francisella tularensis*) fueron evaluadas en su resistencia al tratamiento térmico a 65°C por 180 min. Desde concentraciones de 10⁸ CFU se llegó a la total inactivación a las 3 horas; el RF fue de 8 log₁₀ (Hartman *et al.*, 2012).

Otras evaluaciones en bacterias del género *Mycobacterium* (*M. xenopi*, *M. thermoresistible*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis* y *M. gordonae*) han demostrado que el tratamiento térmico de las micobacterias en bloques de calor seco, baño de agua hirviendo, o un horno de aire seco forzado pueden no inactivar sistemáticamente a las micobacterias a temperaturas inferiores de 100°C ($\leq 95^\circ\text{C}$) y tiempos de 15-30 minutos. Pero a 100°C durante al menos 5 min, siempre que estén los tubos sumergidos por completo en un baño de agua hirviendo, la inactivación es total (Zwadyk *et al.*, 1994). Igualmente, cuando se colocaron muestras equivalentes en un horno de aire forzado a 100°C, y ninguna de las muestras fue positivas para tratamientos térmicos de 5 minutos o superiores. Zwadyk *et al.* (1994) demuestran que la variable volumen de suspensión bacteriana a inactivar y concentración de la misma deben tenerse en cuenta en cualquier tratamiento de inactivación térmica de micobacterias. Sin embargo, otro estudio realizado solo con *M. tuberculosis*, señala que la inmersión completa de un microtubo que contenía una suspensión de la carga de un asa de siembra en 1,5 ml, en un baño de agua a 80°C durante 20 minutos inactivaba la bacteria (Doig *et al.*, 2002).

Radiación gamma con Co60

La irradiación gamma se ha utilizado por muchos años para inactivar microorganismos para una variedad de propósitos, que incluyen productos médicos y biológicos (Thomas *et al.*, 1982). Debido a las condiciones habituales de trabajo complicadas y lentas en un laboratorio de máxima contención, se han investigado varios métodos para inactivar patógenos de alta peligrosidad (Ébola, Marburgo, Lassa) sin alterar su actividad inmunológica (Elliott *et al.*, 1982). Este método también ha demostrado ser un método eficaz para la inactivación de Filovirus y Arenavirus, en muchas aplicaciones de investigación de inmunidad celular y humoral, siendo el tratamiento de elección para estos estudios ya que afecta mínimamente citoquinas y quimioquinas. En todos estos estudios de inactivación se requirió de mantener las muestras en hielo seco para mantenerlas frías durante la irradiación (Mahanty *et al.*, 1999).

Las condiciones de trabajo en un laboratorio de máxima biocontención resultan técnicamente complicadas y costosas con respecto al tiempo empleado. Es por ello que siempre se ha valorado y estudiado la opción de inactivar muestras que contengan patógenos de alta peligrosidad (Ébola, Marburgo, Lassa) siempre que no se alteren la actividad inmunológica o las características estructurales de las muestras, porque ello permite manipularlas en niveles

de bioseguridad inferiores donde el trabajo es mucho más rápido y sensiblemente económico (Elliott *et al.*, 1982).

La inactivación de muestras virales mediante radiación gamma con Co60 de algunos virus patógenos emergentes o reemergentes como SARS-CoV, LASV, RVFV, HEV, NiV y H5N1 y TBEV, se evaluó con una dosis objetivo de $1 \times 10^6 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Los virus de LASV, RVFV, HEV, NiV y H5N1 necesitaron 4 Mrads ($4 \times 10^6 \text{ rad}$) y para el TBEV fueron necesarios 5 Mrads ($5 \times 10^6 \text{ rad}$) de irradiación gamma Co60 para reducir ampliamente su infectividad. Sin embargo como medida de seguridad y precaución se sugiere que los valores anteriormente descritos sean duplicados para una manipulación segura: 2 Mrads ($2 \times 10^6 \text{ rad}$, Coronavirus); 4 Mrads ($4 \times 10^6 \text{ rad}$, Filovirus); 8 Mrads ($8 \times 10^6 \text{ rad}$, Arena virus, Bunyavirus, Ortomixovirus y Paramixovirus) y 10 Mrads ($1 \times 10^7 \text{ rad}$, Flavivirus) (Feldmann *et al.*, 2019).

La infectividad de los virus Lassa, Ébola y Marburgo (Filovirus) se redujo a una tasa de 5.3; 6.8 y $8.4 \times 10^6 \log \text{TCID}_{50}$ por rad, respectivamente a 4°C por 3 horas. La irradiación gamma fue $1.96 \times 10^6/\text{rads/hora}$ (Elliott *et al.*, 1982). Los mismos virus también fueron evaluados a una dosis de $1.27 \times 10^6 \text{ rads}$ de radiación gamma Co60, demostrando que esta dosis también es efectiva para la inactivación de los filovirus (Mitchell & McCormick, 1984). El virus del MERS-CoV expuesto a 1 Mrads ($1 \times 10^6 \text{ rad}$) de radiación gamma Co60 experimentó una reducción de título de 4-5 \log_{10} (Kumar *et al.*, 2015). El efecto de la irradiación gamma sobre el SARS-CoV de $15 \times 10^3 \text{ Rad}$ (15.000 rad) no produjo ninguna disminución de la infecciosidad siendo la dosis más alta evaluada para el SARS-CoV. Sin embargo no llegó a inactivar el virus, corroborando con las evaluaciones del CDC que se requiere una dosis mucho mayor ($2 \times 10^6 \text{ rad}$) para inactivar muestras de suero infectado por el SARS-CoV para posteriores estudios en un BSL2 (Darnell *et al.*, 2004). En un estudio similar con un título inicial de $1 \times 10^6 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ de SARS-CoV, este quedó completamente inactivado a una dosis de 1 Mrads ($1 \times 10^6 \text{ rad}$) de irradiación gamma (Feldmann *et al.*, 2019).

Radiación ultravioleta

La luz ultravioleta es una luz con longitudes de onda más cortas que las que puede observar el ojo humano, es decir invisibles. Se divide en tres subgrupos distintos: UVA, que consiste en luz con una longitud de onda entre 400 y 320 nm; UVB, con una longitud de onda entre 320 y 290 nm; y UVC, con una longitud de onda entre 290 y 200 nm (Cutler & Zimmerman, 2011). Es generalmente utilizada en laboratorios de investigación como germicida/viricida

para la mayoría de los organismos vegetativos y virus. Siendo su mayor utilización como desinfectante en cabinas de bioseguridad (BSC) especialmente la UVC (Meechan & Wilson, 2006). Un tratamiento de rayos UVC para virus del nivel de bioseguridad 4 (Lassa, Ébola, Marburgo) no tuvo el éxito requerido ya que una exposición de 20 minutos de 1.200 a 2.000 W / cm² de luz UVC solo inactivó al virus Lassa, pero no los virus de Marburgo y Ébola, en los que se detectó infectividad residual; los autores no cuantificaron esta infectividad (Elliott *et al.*, 1982).

Similares resultados se obtuvieron con los virus de la gripe tipo A de humanos (H1N1) y animales (H1N1 aviar, H4N6 aviar, H1N1 porcina); exposiciones a longitudes de onda de 250 nm, una potencia de 8 W, y a una altura de 10 cm de la capa líquida en un lapso de 10 minutos, no inactivó el virus totalmente debido a que solo tuvo un factor de reducción de 2.6 log₁₀ (H1N1, H4N6 aviar) y 3.2 log₁₀ (H1N1 porcina), ambos con infectividad residual (Clemente, 2018) .

Para dos virus de IA altamente patógena (subtipo H7N1 y H5N1) expuestos a un flujo continuo de luz UVB, aproximadamente 90 μW / cm², (9.0 x10⁵ W/cm²) y para 14 horas de exposición, los títulos víricos iniciales de H7N1 (5.5 log₁₀ TCID₅₀/ml) cayeron a indetectable, mientras que para H5N1 con título inicial 6.2 TCID₅₀/ml bajó a 1 TCID₅₀/ml. Por tanto, para reducir 1 Log₁₀ de dosis infecciosa para cada subtipo se necesitaron 158 min (H7N1) y 167 min (H5N1) (Sutton *et al.*, 2013). El subtipo H7N9 a títulos víricos iniciales de 10^{7.7} EID₅₀ en una placa Petri tratada con rayos UVC (250-270 nm) y a una distancia de 75 cm para tiempos de contacto de 10, 20, 30 o más minutos, se vio totalmente inactivado a 30 minutos y tiempos de contacto superiores (Zou *et al.*, 2013).

El virus del SARS-CoV expuesto a una fuente de luz UVC (254 nm) de 4016 μW/cm² a 3 cm de distancia de la fuente emisora y por tiempos de contacto de 15 minutos, tuvo un RF de 5 log₁₀ a partir de un título inicial de ≤10⁶ log₁₀TCID₅₀/ml. Por el contrario la exposición a otra UVA (365 nm) a 2133 μW/cm², bajo los mismos parámetros, no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad, independientemente de la duración de la exposición (Darnell *et al.*, 2004).

4.2 MÉTODOS QUÍMICOS

Algunos autores han propuesto una clasificación de la resistencia de los virus hacia los agentes químicos basada en el contenido lipídico y el tamaño de los virus, que se considerarían indicadores útiles en la susceptibilidad de los virus hacia determinados desinfectantes (aldehídos, detergentes, ácidos). De acuerdo a estas propiedades los virus se clasificarían en tres categorías; A (virus que poseen envolturas lipoproteicas y son altamente susceptibles a muchos desinfectantes); B (pequeños virus no envueltos que son resistentes a los desinfectantes lipofílicos) y C (virus no envueltos que son intermedios en su patrón de susceptibilidad a los desinfectantes) (Ison & Beattie, 2002). Los virus de la gripe aviar, por sus características (De Benedictis *et al.*, 2007) pertenecerían a la categoría A, que incluye todos los virus envueltos de tamaño intermedio a grande.

Existe una variedad de posibles métodos de inactivación, algunos de los cuales son químicos como Formaldehído, TRIzol, Tripure, TriReagente (reactivos para inactivación y extracción de NA) (Hartman *et al.*, 2012), pero también solventes/detergentes como Tween 20, NP-40 (Cutts *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2020), Tween 80 (Dichtelmüller *et al.*, 2009), Tritón X100, (Hartman *et al.*, 2012; Colavita *et al.*, 2017), o compuestos orgánicos como la Bromoetilenimida (BEI) (Aarthi *et al.*, 2004), Beta-propilactona (BPL) (Fellowes, 1965; Wiktor *et al.*, 1972; Nawa *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2015; Herrera-Rodriguez *et al.*, 2019; Jureka *et al.*, 2020). También existen, ya citados anteriormente, reactivos de extracción de ácidos nucleicos que se asume, demasiado a menudo, que son totalmente capaces de hacer que una muestra deje de ser infecciosa. Los productos utilizados más comúnmente son TRIzol® LS, Reagent TRIzol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y AVL Buffer (Qiagen, Valencia, CA) (Blow *et al.*, 2004) pero también otros como ATL, VXL (Pastorino, Touret, Gilles, Lamballerie, Remi, et al., 2020), RLT, Mag-MAX, easy Max (Ngo *et al.*, 2017).

Tratamiento con Trizol®

El TRIzol® o TRIzol® LS es un reactivo típico para el aislamiento y la purificación del ARN o el ADN de las células infectadas por virus o de los sobrenadantes de los cultivos celulares. La combinación de isotiocianato de guanidina y fenol ha demostrado ser eficaz para inactivar los virus envueltos y se ha utilizado durante muchos años para el aislamiento de ADN o ARN virales tanto para el análisis bioquímico (sustancias químicas, sangre) como para el diagnóstico virológico (detección antígenos) (Kumar *et al.*, 2015). Debido a la naturaleza

cáustica del reactivo de extracción muchos suponen que este tratamiento es capaz de hacer que una muestra no sea infecciosa o pierda su peligrosidad. Sin embargo esta inactivación puede ser incompleta durante la extracción del ácido nucleico (Blow *et al.*, 2004).

En este sentido se han realizado varios estudios para corroborar estos supuestos, que ha implicado evaluar el TRIzol frente a diferentes familias de virus. Se han hecho valoraciones con VNO (flavivirus) y virus de IA (cepa H7N1), con títulos víricos iniciales de $7 \log_{10}$ TCID₅₀/ml en una relación de mezcla de reactivo TRIzol® y suspensión viral de 9 a 1 (v:v) durante 10 minutos, obteniéndose factores de reducción del orden de $2.5 \log_{10}$, sin infectividad residual (Abad *et al.*, 2012). Virus de la influenza aviar altamente patógena (HPAIV) con títulos iniciales de 4.7×10^7 UFP/ml, tratado con TRIzol (ratio 1:10) fue completamente inactivado; no se observaron placas virales en las muestras finales, lo que implicaba un RF superior a $4 \log_{10}$ (Hartman *et al.*, 2012). Una suspensión vírica de MERS-CoV de título 3.25×10^9 UFP/ml, mezclada con TRIzol® LS en una proporción de 1:3, siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante, para tiempo de contacto 10 minutos, fue inactivada completamente (Kumar *et al.*, 2015).

Estudios más recientes de este tratamiento con TRIzol, con representantes de varias familias de virus de GR 3 como Alphavirus (CHIKV), Flavivirus (VNO), Bunyavirus (LACV), derivados de aislamientos clínicos, y con títulos virales de 5.4 a $8.5 \log_{10}$ PFU/ml, permitieron, para tiempos de contacto de 10 minutos a temperatura ambiente, obtener RF de $>4 \log_{10}$ para CHIKV, $>4.8 \log_{10}$ para VNO y $>1.7 \log_{10}$ para LACV. El RF, expresado en \log_{10} , se calculó basándose en el supuesto de que 1 partícula infecciosa era suficiente para establecer citopatología (Ngo *et al.*, 2017).

El efecto del Trizol LS sobre la infectividad de un amplio grupo de virus de diferentes familias virales como Alfavirus (CHIKV, EEV), Arenavirus (Guanarito, LASV, LCMV, Lujo, Machupo, Sabia), Bunyavirus (RVF), Coronavirus (MERS-CoV), Filovirus (Ébola Makona, Ébola Reston, Ébola Sudán, Marburg Ci67), Flavivirus (DENV 2) y Paramixovirus (NiV) fueron evaluados a partir de títulos víricos iniciales de $10^{6.1}$ a $10^{8.3}$ TCID₅₀. Para mezcla del reactivo y suspensión viral en ratios de 4:1 y tiempos de contacto de 10 minutos, se observó ausencia de infectividad residual en todos los casos, con unos RF que oscilaron entre los 4.5 y los $6.5 \log_{10}$ TCID₅₀ (Kochel *et al.*, 2017).

La inactivación de Ébola Zaire en suero, y en cultivo celular clarificado, con TRIzol LS en ratio 3:1, agitación manual, y tiempos de contacto de 5 minutos ha permitido constatar reducciones superiores a los 7 log₁₀ UFP; cuando se evaluó la acción del TRIzol sobre fragmentos de tejidos (hepáticos), sometidos a sonicación 30Hz por 2 veces en periodos de 3 minutos, o células infectadas, el RF fue también superior a los 7 log₁₀ (Alfson & Griffiths, 2018).

Tratamientos con tampón de lisis AVL, RLT, Mag-MAX

Los tratamientos de tampón de lisis se utilizan para la extracción eficiente de los ácidos nucleicos virales (AVL, RLT, Mag-MAX) pero a la vez tienen el efecto colateral de favorecer o promover la inactivación vírica, disminuyendo la concentración de virus a dosis no infecciosas. El AVL buffer al igual que el TRIzol es una sal caotrópica que contiene GITC (isotiocianato de guanidina) (Blow *et al.*, 2004). Además, puede contener en su composición otros desnaturizantes de proteínas (etanol, fenol) capaces de inactivar al virus. Sin embargo, esta propiedad puede verse afectada por la carga viral de la muestra (alta o baja) que es objeto de la extracción, la presencia de material interferente, etc. (Ngo *et al.*, 2017).

Uno de los primeros estudios de evaluación del tampón AVL fue el ejecutado por Blow y colaboradores, en 2004. La eficacia del tampón se evaluó frente a un rango importante de virus de diferentes familias (alfavirus, flavivirus, bunyavirus, filovirus); la ratio de mezcla fue 560 µl de AVL y 150 microlitros de la muestra o suspensión vírica, con un tiempo de contacto de 10 minutos a temperatura ambiente. Todos los títulos víricos de partida fueron superiores a 6 log₁₀ UFP/ml con la excepción del dengue del subtipo 4 (DENV4), que fue de 4.9 log₁₀ UFP/ml. No se detectó infectividad residual en las muestras tratadas lo que garantiza en todos los casos RF superiores a 4 log₁₀ UFP con la excepción ya comentada de DENV4 (Blow *et al.*, 2004).

En otros ensayos realizados con VNO y virus HPAI H7N1 con una mezcla de tampón AVL y cepa viral (relación 9:1, v/v), durante 10 minutos, se obtuvo un RF superior a 3 log₁₀ TCID₅₀/ml para VNO, con títulos iniciales de 6.82 log₁₀ TCID₅₀/ml, mientras que para HPAI H7N1 con título viral inicial de 7.04 log₁₀ TCID₅₀/ml se alcanzaron RF superiores a 3.5 log₁₀ TCID₅₀/ml (Abad *et al.*, 2012); sin infectividad residual en ambos casos. Cuando se trataron con AVL (en una proporción de 560 µl AVL y 140 µl de muestra), virus como VNO (flavivirus), CHIKV (alfavirus) y LACV (bunyavirus) se reportó que para los dos primeros

había infectividad residual en la muestra final, si bien se conseguían RF superiores a 5 y 4 Log₁₀ respectivamente; por el contrario LACV se inactivó completamente, si bien partiendo de títulos víricos iniciales más bajos (5,4 log₁₀ UFP /ml), con RF superior a 2 log₁₀ (Ngo *et al.*, 2017).

La cepa vacunal VEEV TC-83 con un título infeccioso de 1.47x10⁹ UFP/ml, no fue inactivada completamente (en todas las réplicas analizadas) por el tampón de lisis AVL, mientras que sí lo fue con Trizol (Patterson *et al.*, 2018). La adición de etanol al procesado con AVL sí permitía alcanzar la inactivación total (Patterson *et al.*, 2018). Suspensiones víricas de MERS-CoV, con títulos iniciales de 3.25x10⁹ UFP/ml fueron tratadas con AVL en proporción 4:1 (400 µl AVL:100 µl sobrenadante) e incubadas a temperatura ambiente, pero con adición de etanol (>95%). No se detectó infectividad residual en las muestras finales, lo que determina RF muy superiores a 4 log₁₀ (Kumar *et al.*, 2015).

Haddock *et al.*, (2016), evaluaron la efectividad del tampón AVL frente a virus Ébola Zaire (EBOV), como modelo representativo de virus envueltos ARN de cadena única y polaridad negativa, y habitualmente manipulados en contención (arenavirus, bunyavirus, filovirus, ortomixovirus y paramixovirus). El tampón AVL se mezcló con el virus en diferentes proporciones (560 µl de tampón AVL y 160 µl de muestra o bien 600 µl de AVL y 100 µl de muestra o suspensión vírica) para tiempos de contacto 10 minutos. Este tratamiento no inactivó completamente el virus del EBOV, pero la adición del etanol absoluto (560 µl) en las mezclas indicadas y 20 minutos adicionales a temperatura ambiente hizo que todas las muestras alcanzaran la inactivación total (Haddock *et al.*, 2016). Estos resultados no difieren de otros reportados por Smither y colaboradores, en 2015. El tratamiento de muestras clínicas de suero (con un título de Ébola de 1x10⁸ TCID₅₀/ml) y sangre (donde el título infeccioso fue de 1x10⁷ TCID₅₀/ml) siguiendo una ratio 4:1 v/v, demostró la ineficacia del tampón AVL para inactivar EBOV (no lo hizo en el 67% de las muestras). Sin embargo, si a este tratamiento se acoplaba un tratamiento posterior con etanol (4:1, v/v, etanol: muestra) o calor (60°C por 15 minutos) sí se alcanzaba la inactivación en el 100% de las muestras ensayadas (Smither *et al.*, 2015).

El SARS-CoV2 también ha sido sometido a inactivación por el tampón AVL (GITC 50-70%) solo o en combinación con etanol al 100%, o Tritón X-100, a una proporción de 1:1 v/v; a diferencia de los tampones de lisis ATL y VXL, que sí inactivaron completamente el virus, el

tampón AVL solo permitió alcanzar inactivaciones parciales, si bien se partía de cargas virales iniciales altas (10^6 TCID₅₀/ml (Pastorino *et al.*, 2020).

El tratamiento con AVL (pero también con AL y MagMAX CORE) de sobrenadantes de cultivo celular, suspensión de tejido epitelial y leche en presencia del virus de la fiebre aftosa (FMDV), que pertenece a la familia *Picornaviridae*, en un ratio de 4:1, y títulos víricos iniciales de $7.4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, permitió demostrar la ausencia de infectividad residual en las muestras finales alcanzándose RF de entre 3.1 y $>5.1 \log_{10}$ (Wood *et al.*, 2020).

Tratamiento con solvente/detergente (S/D)

El tratamiento solvente/detergente es un tratamiento cuyo modo de acción es la alteración de las estructuras lipídicas del virus mediante disolventes como el tri-n-butil-fosfato (TNBP) y detergentes no iónicos como el Tritón X-100 o Tween 20 u 80. Además, es un método eficaz para los virus envueltos (flavivirus, filovirus, arenavirus) mas no así para los virus no envueltos (VHA, parvovirus) teniendo limitada inactivación (Abad *et al.*, 2000). Es un método eficaz, robusto y sencillo para inactivar los virus envueltos en diversos productos biológicos (como derivados del plasma) (Dichtelmüller *et al.*, 2009). Dentro de los virus con envoltura lipídica en los que se ha utilizado este procedimiento está el VNO: suspensiones víricas con título inicial de 2.75×10^4 UFP/ml en solución de PBS y 0.05 % de Tween 20 (un tampón de lavado típico de ensayos ELISA), a temperaturas de 37°C no mostraron infectividad residual (no ECP) a los 30 y 60 minutos de exposición, lo que implicaba un RF del orden de $4 \log_{10}$ (Mayo & Beckwith, 2002).

El Tritón X-100 es un detergente no iónico suave utilizado en aplicaciones bioquímicas para solubilizar proteínas y otras macromoléculas; debido a esto es utilizado para inactivar virus envueltos (EBOV, VNO). EBOV con títulos víricos iniciales de $10^{6.9}$ TCID₅₀/ml expuesto a diferentes concentraciones de Tritón X-100 (0.1 a 0.05%) permitió alcanzar, a 60 minutos de exposición, RF de $4 \log_{10}$, para concentraciones de 0.1%, aunque existe infectividad residual, con títulos finales inferiores a $10^{2.9}$ TCID₅₀/ml. Y para el VNO, con título inicial de $10^{8.82}$ TCID₅₀/ml se alcanzaron RF de $6.2 \log_{10}$ a concentraciones de Tritón X-100 entre 0.5 y 0.05%, y 60 minutos de exposición (Colavita *et al.*, 2017).

Por otra parte, el SDS, también conocido como laurilsulfato de sodio, es un tensioactivo aniónico con potencia desnaturalizante de proteínas, es un potente inhibidor de la infectividad de varios virus envueltos y no envueltos (Piret *et al.*, 2002). La inactivación del virus Ébola

(EBOV) por 0.1% SDS en suero y sangre entera de primates no humanos infectados fue evaluada por Van Kampen y colaboradores, 2017. La adición de 0.1% de SDS en sangre entera o plasma de los primates infectados tuvo poco impacto en la infectividad de EBOV a temperatura ambiente. Después de 60 minutos el título vírico inicial en sangre y plasma, 3.2×10^4 y 2.4×10^4 TCID₅₀/ml, se redujo aproximadamente un logaritmo, a valores de 3.2×10^3 y 2.8×10^3 TCID₅₀/ml, respectivamente. El límite de detección de la técnica estaba en 5.6×10^1 TCID₅₀/ml, por tanto la infectividad residual fue elevada (Van Kampen *et al.*, 2017).

La persistencia del nuevo virus SARS-CoV2 frente a tratamientos con solventes/detergentes como SDS, Tritón X-100, Tween 20 y NP-40 (detergente no iónico) ha sido también evaluada. A partir de títulos de 10^7 UFP, tratamientos de dichos detergentes a una concentración de 0.5%, y tiempos de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, demostraron que el SDS, Tritón X-100 y NP-40 anularon toda infectividad residual en las muestras finales. Por contra, los ensayos con Tween 20 en las mismas condiciones no permitieron alcanzar la total inactivación (Patterson *et al.*, 2020).

Tratamiento con Beta-propiolactona (BPL)

La Beta-Propiolactona (BPL) es un agente químico que ha sido muy utilizado en la esterilización de materiales biológicos como plasma humano, tejidos para trasplante y en la preparación de vacunas de virus inactivados. La BPL parece ser superior a otros agentes químicos en la preparación de vacunas víricas debido a que inactiva los virus de manera completa e irreversible. Tiene un amplio margen de seguridad por la inactivación completa del virus y mantener un alto grado de antigenicidad (LoGripo, 1957).

La inactivación de una muestra viral por tratamiento con BPL se realiza habitualmente con concentraciones entre el 0.025 y 1% (4–160 mM) (Uittenbogaard *et al.*, 2011) y es un método con el que se han inactivado producciones víricas con finalidades inmunogénicas o vacunales desde hace más de 60 años (LoGripo, 1957).

Tratamientos del virus de la fiebre aftosa (tipo A cepa 119) con BPL (concentración final de 0.05% a temperaturas de 23°C y pH entre 7.5 y 8.0, en agitación continua) determinaron reducciones del título infeccioso mayores de 6 log₁₀ LD₅₀ a las 6 horas de exposición, con una curva claramente *tailing off* para exposiciones más largas; ocasionalmente para tiempos posteriores se seguía detectando una mínima infectividad residual (Fellowes, 1965)

Estudios clásicos ya han demostrado la eficacia de BPL en la inactivación viral. Así, BPL a concentraciones finales de 0.025% y temperaturas de 4°C inactivaron completamente el virus de la rabia (de alto título, 10⁹ PFU/ml) para tiempos de tratamiento de 6 o más horas, con RF superiores a los 6 log₁₀, sin afectar a otras características inmunológicas como la actividad de fijación del complemento (Wiktor *et al.*, 1972).

Sobrenadantes clarificados de VNO fueron sometidos a tratamiento con BPL a concentración final de 0.1% y mantenidos 48 horas en temperaturas de 4°C; no se detectó infectividad residual en las muestras finales, aunque se pasaron varias veces por células BHK-21 y se inocularon ratones intracranalmente (ensayo “in vivo”). Sin embargo, los autores (Chowdhury *et al.*, 2015) no ofrecen ningún RF concreto.

Se evaluó la eficacia de la inactivación de BPL sobre producciones de cepas de influenza H1N1, H3N2, H5N1 y H7N9, purificadas en gradientes de sacarosa a partir de los fluidos alantoideos. Concentraciones de 0.1% de BPL, a 4°C, en continua agitación y temperatura de 4°C overnight (entre 12-18 horas) inactivó fuertemente diferentes cepas de influenza, con reducciones de infectividad superiores a los 5 log₁₀. Para H1, H3 y H7 no se detectó infectividad residual; para H5 y otra cepa H1 si se detectaron aún niveles muy bajos de infectividad (20-50 TCID₅₀/ml) (Herrera-Rodriguez *et al.*, 2019).

Para el virus del SARS-CoV2, a títulos iniciales de 10⁶ PFU y a diferentes concentraciones (0.5, 0.1 y 0.05%) de BPL, y tratamientos por 16 horas a 4°C, más 2 horas adicionales a 37°C para hidrolizar la BPL residual, se alcanzó inactivación total para las tres concentraciones de BPL ensayadas (Jureka *et al.*, 2020).

Tratamientos con 0.2% BPL a 37°C por tiempos de contacto de 10, 30 y 60 minutos sobre cepas representativas de los 4 tipos de dengue (tipo 1, Hawaii; tipo 2, Nueva Guinea C; tipo 3, H87 y tipo 4, H241) demuestran ausencia total de infectividad ya para el primer tiempo ensayado, 10 min, a partir de títulos iniciales de 10⁴-10⁶ FFU dependiendo del tipo viral; los autores obtienen RF superiores a 2 y 4 Log₁₀ respectivamente (Nawa *et al.*, 2003).

Tratamiento con Etilenimina binaria (BEI)

La etilenimina binaria (BEI) es un compuesto de aziridina, producido a partir del bromuro de bromoetilamina (BEA) que se utiliza comúnmente para la inactivación de virus durante la fabricación de vacunas.

El uso de BEI es clásico (Bahnmann, 1976). Este autor reportó inactivaciones lineales con reducciones superiores a 1 log₁₀ infectividad por hora de tratamiento con 1 mM de BEI a 37°C para el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de rinotraqueítis infecciosa bovina (IBRV). De este mismo autor, hay una interesante revisión en el año de 1990, donde se enumera una larga lista de virus que habían sido inactivados con este reactivo: el virus de PPA, FMDV, VSV, virus de la enfermedad de Aujeszky, BVDV, virus de la enfermedad de Newcastle, etc (Bahnmann, 1990). La BEI a concentración final de 0.01M, aplicada sobre suspensiones de 10⁹ PFU/ml de virus de la rabia propagado en células BHK fue capaz de inactivar completamente al virus en periodos de 2 o 3 horas a temperaturas de 37°C (Larghi & Nebel, 1980). Kotb *et al.*, (2015) también detectaron efectividad total de tratamientos con BEI para el mismo virus, en periodo de horas. RF superiores a 6 log₁₀ TCID₅₀/ml en sólo 6 horas para concentraciones de 30 mM; para 10 mM de BEI, el mismo efecto se alcanzaba a las 18 horas (Kotb *et al.*, 2015).

Un ejemplo claro de virus de máxima contención es el virus de la fiebre aftosa (FMDV). BEI inactiva FMDV de forma rápida y siguiendo una cinética lineal de primer orden (Aarthi *et al.*, 2004). El tratamiento de suspensiones víricas de diferentes cepas de FMDV con 1mM de BEI a 37°C por periodos de 24 horas determinaron inactivación total ya a las 7-8 horas de tratamiento en función de la cepa, partiendo de 6.55 y 7.55 log₁₀ TCID₅₀/ml, lo que implica RF entre 4 y 5 log₁₀ (Larghi & Nebel, 1980). Resultados similares fueron obtenidos por Aarthi y colaboradores, en 2004; concentraciones de 0.4 mM eran insuficientes para alcanzar inactivación total a las 10 horas; por el contrario, a 0.8 mM ya había ausencia de infectividad sobre las 8 horas de tratamiento y para 1.2 mM de BEI la inactivación se alcanzaba a las 5 horas. En cualquier caso, para la concentración más elevada ensayada, 2 mM, inactivación total a las 3-4 horas y RF por encima de los 4 log₁₀ UFP (Aarthi *et al.*, 2004).

Sarachai *et al.*, (2010), encuentran que BEI es también altamente efectivo contra influenza aviar H5N1. Tratamientos de 1mM permiten alcanzar inactivación total del virus en liquido alantoideo en 24 horas, mientras que para concentraciones de 10 mM esta inactivación total se alcanza a las 6 horas, sin efectos adversos en las características antigénicas (Sarachai *et al.*, 2010).

Suspensiones de virus Nipah (con título 2×10⁵ TCID₅₀/ml) fueron tratadas con BEI a concentraciones finales de 3 mM en la suspensión viral; la mezcla resultante fue incubada a temperatura ambiente durante 24 horas. La inactivación vírica fue total; ni ejecutando tres

pasajes en cultivo celular a partir de la muestra inactivada final se recuperó virus infeccioso (Berhane *et al.*, 2006).

Tratamiento con fijadores; Formaldehído, Glutaraldehído, Paraformaldehído (PFA), Formalina Tamponada Neutra (NBF), Metanol: Acetona (M/A)

Otros productos químicos que también han sido utilizados en la inactivación vírica son los aldehídos. Estos compuestos orgánicos ha sido generalmente empleados para la fijación de células, pero ayudan en la inactivación de los virus presentes en tejidos infectados, para posteriores estudios de citometría de flujo (Emery *et al.*, 2014) o para en ensayos de placa, y estudios histológicos (Kumar *et al.*, 2015).

Se evaluó la inactivación del virus del SARS-CoV por dos agentes fijadores, formaldehído y glutaraldehído en diluciones (1:1000 y 1:4000) a diferentes temperaturas (4, 25 o 37°C) y para tiempos de contacto 1, 2 y 3 días. A 4°C y dilución 1/4000, ambos fijadores fueron incapaces de inactivar completamente el virus. A 25 y 37°C, el formaldehído inactivó intensamente pero aún se detectó infectividad residual a día 3. Por el contrario, el glutaraldehído inactivó completamente SARS-CoV a 25°C en 48 horas, mientras que a 37°C solo necesitó 1 día (Darnell *et al.*, 2004).

El PFA se ha empleado en la inactivación de dos bacterias pertenecientes GR3 (*Burkholderia pseudomallei* y *Francisella tularensis tularensis*), a una concentración de 4% de PFA (250 µl Cytotix fixation buffer, no diluido) incubados a 37°C por 5 minutos de exposición. Dió como resultado un factor de reducción de 6 log₁₀ de un título de 5 x10⁶ CFU/ml (Emery *et al.*, 2014). Para bacterias del género *Brucella* (*B. bovis*, *B. abortus*, *B. melitensis*) se ha utilizado la formalina neutra tamponada (NBF) (concentración al 10%) para la fijación e inactivación de muestras de tejido infeccioso a una proporción de 1:10 (v/v) tejido: formalina, en diferentes periodos de tiempo (2, 4 y 24 horas). En cambio, para la inactivación de muestras líquidas se ha utilizado el metanol o metanol/acetona (M/A) al 30, 40, 50, 60 y 70%, incubadas a 37°C durante 7 días, dando como resultado que la NBF al 10 % inactiva las muestras en 4 horas de exposición con un RF de 6.5 log₁₀CFU/g a partir de una carga de 7.73 log₁₀CFU/g; con el M/A se inactivan en 3 días con un RF de ≥6 log₁₀ a partir de un título inicial > 8 x10¹⁰ CFU/ml (Olsen *et al.*, 2017).

El tratamiento de cultivos celulares infectados con MERS-CoV con 4% de PFA, 10% NBF o 1:1 M/A, a temperatura ambiente y para diferentes tiempos de contacto (10, 20, 30, 60

minutos), han permitido confirmar que exposiciones de 30 minutos con 4% PFA o 10% de NBF inactivaron por completo los virus presentes en monocapas celulares, mientras que para alcanzar la misma reducción con la mezcla M/A se necesitaron 60 minutos (Kumar *et al.*, 2015).

Para un virus muy relacionado, como es SARS-CoV2, monocapas infectadas incubadas a temperatura ambiente con concentraciones entre 0.5% y 2% de formaldehído por 60 minutos perdieron toda infectividad vírica, implicando un RF de $>7 \log_{10}$ (Jureka *et al.*, 2020). La NBF (con una concentración de formaldehído del 4%) cumpliría con creces como agente inactivador para tiempos de exposición equivalentes (Jureka *et al.*, 2020).

4.3 MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS

Hay métodos que combinan una molécula (químico) y una radiación (físico) para generar una acción inactivadora que no tendría cada método por separado. Schneider y colaboradores (2015) han estimado el efecto del Psoraleno más UV-A en la inactivación de familias virales altamente patógenos (Flavivirus, Bunyavirus, Arenavirus, Coronavirus y Filovirus) a diferentes dosis de radiación, cargas virales y tiempos de exposición. Títulos de 10^6 TCID₅₀/ml de DENV quedaron inactivados completamente a una exposición de 8000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de UV-A (y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ATM) en 40 minutos. La combinación funciona para muchos otros virus como CCHFV, LASV, MERS-CoV, con títulos víricos iniciales entre 10^5 y 10^7 TCID₅₀/ml con exposiciones variables, 4000, 30000 y 6000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Con un nivel de energía de radiación UV-A de 1000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ATM se ha alcanzado la inactivación total, a partir de títulos iniciales de 10^7 a 10^8 TCID₅₀/ml, de EEV, RVFV y EBOV, para tiempos de exposición de 20, 90 y 120 minutos respectivamente (Schneider *et al.*, 2015).

También se ha experimentado la inactivación viral con tratamiento térmico (56°C) y detergentes (Tween 20 con PBS) sobre sobrenadantes y sueros que contenían cepas de alta y moderada patogenicidad del virus de la peste porcina clásica (PPC). Sobrenadantes (1.78×10^6 y 3.16×10^6 TCID₅₀/50ul) tuvo un factor de reducción de 6 \log_{10} cuando se sometieron a 0.05 % de Tween+ \leq 0.25 % de PBS, a 56°C por 30 minutos. Mientras que el suero (10^2 a 10^4 TCID₅₀/50 μl) concentración final de 3% (Tween 20 + Tween+ \leq 0.25 % de PBS) a la misma temperatura y tiempo tuvo una reducción aproximada de 2-5 \log_{10} . En ambos casos los títulos de ambas cepas redujeron su infecciosidad en su totalidad (Meyer *et al.*, 2019). Así mismo, el virus del EBOV (variante Makona) en muestras de suero humano con una carga viral de 7.19

$\log_{10}TCID_{50}/ml$, se sometió a un tratamiento de inactivación con 0.5% de Tween a 56°C en un tiempo de 60 minutos que dio como resultado un factor de reducción de 7 \log_{10} , es decir inactivó completamente la muestra viral (Cutts *et al.*, 2016). En resumen, los experimentos de inactivación con muestras virales que son manipuladas en un laboratorio de alta y máxima biocontención, se pueden observar en la Figura 1 y 2.

5. TRATAMIENTOS PARA LA DESINFECCIÓN DE LOS CONTENEDORES DE LAS MUESTRAS INACTIVADAS.

Una muestra biológica puede llegar al exterior de una zona del BSL3 o BSL4 principalmente de dos formas: sin inactivación, cuando esta vaya a ser transferida a otra instalación equivalente a una de BSL-3 o BSL-4; o inactivada es decir que la muestra biológica no sea infecciosa y pueda ser utilizada en una instalación de menor biocontención (Abad, 2012).

Para muestras que han sido inactivadas por tratamiento térmico o por tratamiento químico (TRIzol LS, TriReagente), el contenido líquido ya se considera inactivado y queda descontaminar el exterior del recipiente; rociado con desinfectante (hipoclorito de sodio al 5.25%, solución de etanol al 70%) y luego la muestra puede ser retirada de la instalación BSL3. Las suspensiones de células fijadas con formaldehído al 4%, después de la fijación, también necesitan desinfección o descontaminación superficial del tubo, la placa o multiplaca en las que están contenidas, antes de ser retiradas de las instalaciones (Hartman *et al.*, 2012). Las placas de cultivo celular inactivadas durante al menos 24 h en formalina al 10% pueden ser retiradas después de ser empaquetadas en bolsas selladas con formalina fresca para bañar las placas, que deben ser claramente etiquetadas (Shurtleff *et al.*, 2012).

Para contenedores secundarios

Los sistemas SAS (*Sterilized Air System*, por ejemplo, de MATACHANA) son sistemas de paso diseñados especialmente para procesar mediante desinfectante químico, (H_2O_2 u otros) o radiación U.V. los contenedores o recipientes del material que se desea transferir de una zona de alta contención a otra no contenida o viceversa. Tiene sistemas de aeronebulización y micropulverización de desinfectante químico, resultante de la unión de dos fluidos, uno líquido (el desinfectante) y otro gaseoso (aire), con el objetivo de obtener partículas con tamaños de gotas de micras que permite que estas permanezcan en suspensión y de una

manera uniforme por todo el volumen de la cámara. Estas gotas al final decaen, pero cuando lo hacen entran en contacto con todas las superficies (contenedores) presentes en el interior de la cámara, desinfectándolos y asegurando el tratamiento integral de todas las superficies expuestas al producto aeronebulizado (www.matachana.com).

6. CONSIDERACIONES FINALES

En la inactivación de muestras infecciosas que se han obtenido dentro de los laboratorios de alta y máxima biocontención los tratamientos que se utilizan son métodos físicos, químicos y fisicoquímicos que, de acuerdo con el propósito final de las muestras inactivadas, podrán ser destinadas para ensayos en biología molecular, inmunología, ensayos de neutralización o bioquímica.

Dentro de los métodos físicos, el tratamiento térmico ha sido de los más utilizados, debido a que es un método accesible, barato y fácil de usar. Sin embargo, se deben tener muy en cuenta varios factores como tamaño de los patógenos, termoestabilidad, carga viral o bacteriana, tipo de muestras (tejido, suero o sangre entera), y las más importantes: dosis de temperatura y tiempos de exposición, que repercutirán en la inactivación. La mayoría de los virus y bacterias han sido susceptibles a este tratamiento disminuyendo su infectividad al someterse a temperaturas altas (56°C hasta 92°C) e inclusive la ebullición (100°C), con las cuales quedan totalmente inactivadas. Por el contrario, temperaturas y tiempos de exposición inferiores (<15 min/56°C) pueden no tener los mismos resultados. Algunos virus, inclusive de la misma familia y características estructurales similares pueden tener temperaturas, tiempos de exposición y factores de reducción totalmente diferentes (Asenjo, 2018; Zwadyk *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2016). Para ciertas bacterias que no son esporuladas y que están dentro el GR3, el método de inactivación térmico también ha sido utilizado con éxito para posteriores estudios.

Otro método físico que ha podido garantizar las propiedades antigénicas de los virus inactivados es la radiación gamma con Co60, (Elliott *et al.*, 1982; Mahanty *et al.*, 1999) tratamiento que algunos autores han evaluado en virus altamente patógenos emergentes y otros reemergentes para los cuales se requiere una inactivación segura y fiable para su manipulación posterior. Este método además de tener un margen de seguridad alto es apto

para ensayos inmunoenzimáticos que involucran a las citoquinas y quimioquinas esenciales para poder determinar la actividad inmunológica humoral y celular. Además, puede adaptarse a cualquier tipo de muestra (líquido o tejido) y título viral independientemente del virus. El inconveniente con este método es el alto costo que representa mantener un equipo de esta magnitud, haciéndolo muchas veces inaccesible para la mayoría de los laboratorios. De hecho, esta recopilación me ha permitido observar que sólo unos pocos han tenido acceso y han podido realizar experimentos de este tipo con resultados positivos. Algunos autores recomiendan que el uso de este tratamiento debería hacerse al doble de la dosis recomendada por motivos de seguridad, sobre todo en patógenos de alta peligrosidad, y así garantizar su total inactivación.

Con respecto a la inactivación con rayos UV (A-B-C) las muestras de patógenos virales a los que se ha expuesto han presentado una elevada pérdida de infecciosidad e incluso completa inactivación, pero en otros casos no. Sin embargo, es un método eficaz si la muestra a inactivar cumple ciertas características como ser líquida, limpia (sin turbidez), fuente de luz directa (relación placa-ángulo de la lámpara de luz) y que el área donde se proceda a la inactivación debe estar libre de otros microorganismos para que no se den fenómenos de contaminación cruzada. Su principal ventaja es que las muestras inactivadas con luz UV pueden ser utilizadas en estudios inmunológicos, siendo útil para posteriores experimentos que involucran la preparación de vacunas. Actualmente hay varios equipos que proporcionan este medio de luz, con costos accesibles. Pero un uso continuo y por largos periodos de tiempo podría comprometer la salud del personal investigador debido a que el efecto de la luz UV puede llegar a ser cancerígeno e incluso el reflejo de esta luz podría inducir una queratoconjuntivitis. Otro aspecto también a tomar en cuenta es que si la muestra no es bien inactivada por los UV pueden dejar residuos infecciosos y provocar algún incidente (LAI) si se traslada la muestra a una instalación de menor biocontención, sobre todo cuando se involucran virus potencialmente peligrosos. A pesar de su pro y contra podría ser un buen aliado en la inactivación de los virus, ya que no daña a las características estructurales estos. Por ejemplo, sería muy útil en laboratorios BSL3 que no tengan la capacidad de optar por un equipo de radiación gamma (por ser muy costoso) y que pueden así realizar inactivaciones de patógenos peligrosos.

Dentro de los métodos químicos de inactivación hay una gran gama de tratamientos por los cuales se puede inactivar los virus altamente patógenos, siendo alguno de ellos clásico, como

BPL, BEI y fijadores diversos (formaldehído, Paraformaldehído, glutaraldehído), otros que han surgido por necesidad médica y de salud pública (solventes/detergentes), y otros más actuales, involucrados en la extracción de ácidos nucleicos (TRIzol, AVL, RVL buffers).

El tratamiento con TRIzol, ha sido el que ha tenido mayor eficacia en la inactivación viral, ya que a pesar de que es un método para extracción de ácidos nucleicos, debido a su composición en isotiocianato de guanidina más fenol lo hace también efectivo para inactivación viral. Todos los estudios realizados con este químico para diferentes tipos de virus han sido efectivos y por ende es de uso rutinario en muchos laboratorios. Algunos TRIzol varían en concentración como TRIzol LS (fórmula ligeramente más concentrada, una ligera diferencia en el índice de refracción) siendo utilizado para muestras líquidas y preparaciones de virus a grandes volúmenes), y TRIzol Regent (utilizado para suspensiones celulares o tejidos) que de acuerdo con la muestra que se desee inactivar se elijará el adecuado. También hay otros tratamientos similares al TRIzol, cuya principal función es la extracción de ácidos nucleicos virales como AVL, RTL, Mag MAX, easy Max, VXL. Algunos de estos químicos han demostrado que pueden disminuir la infecciosidad en las muestras virales, pero otros no porque se ha podido detectar infectividad residual en las muestras ensayadas, haciendo que estas sigan siendo peligrosas para su manipulación. Es eso que algunos autores recomiendan utilizar un método complementario térmico o químico (Tween 20 + PBS) en la utilización de estos compuestos para así tener un mayor margen de seguridad. Inclusive existen kits con estos compuestos químicos que requieren dentro de sus protocolos un paso térmico (70°C durante 5 minutos en el kit de virus ARN de Nucleospin® o 10-15 minutos en el kit de sangre de Nucleospin®, ambos de Macherey- Nagel). El inconveniente por así llamarlo sería cuando se realiza ensayos de cultivo celular debido a que requiere una fase de lavado para retirar el exceso de los residuos químicos ya que puede causar toxicidad en la célula que se desea analizar.

Los solventes/detergentes son otro tipo de tratamiento químico compuesto por un solvente (TNBP) y detergentes no iónicos (Tritón X-100, Tween 80, SDS) que han demostrado su eficacia de inactivación en la industria de los hemoderivados. Además de ser un método robusto en la inactivación de muestras virales, otra de sus ventajas es poder realizar diagnóstico diferencial y hematológico debido a que mantiene la estructura intacta del virus y de otros patógenos que pueden estar presentes simultáneamente en las muestras virales, por ejemplo, la combinación Ébola-Paludismo. Sin embargo, su eficacia podría verse

comprometida cuando se aplica dosis muy por debajo de lo recomendado al analizar muestras de sangre infecciosa ya que podría no inactivarla por completo.

Otros tratamientos químicos utilizados desde hace años en la inactivación viral son la beta-propilactona (BPL) y la etilenimina binaria (BEI) que se han perfilado como la mejor opción en la preparación de vacunas a partir de muestras inactivadas debido a sus altos márgenes de seguridad, inactivando incluso mediante ensayos experimentales al actual SARS-CoV2, virus que provoca la enfermedad de la CoVID-19 (Jureka *et al.*, 2020). Sin embargo, su uso es también cuestionado desde hace tiempo por tener efectos cancerígenos. Similar característica es compartida por ciertos aldehídos como la formalina que, aunque décadas atrás también era utilizada para el mismo fin (vacunas) se ha dejado de usar por ser muy corrosiva y provocar efectos negativos en la salud. Su uso actualmente es más de conservación de muestras con contenido viral para fines anatomopatológicos, dentro de lo cual también está el paraformaldehído, glutaraldehído y metanol:acetona. Estos químicos han demostrado ser muy efectivos y aptos para una completa inactivación de muestras virales o bacterianas independientemente de su título o tipo de muestra. Algunos como el glutaraldehído también se utilizan como desinfectante de instrumentos médicos. Lo importante aquí es tratar las muestras con dosis, tiempo y temperatura adecuadas. La efectividad del método de inactivación con los reactivos antes mencionados puede ser aumentada incrementando el tiempo de contacto si el porcentaje de concentración y la temperatura fueran inferiores a los datos experimentales o la relación fijador-muestra.

Por último, el más relevante en esta categoría de métodos fisicoquímicos, es la combinación de psoraleno y rayos UV-A que han demostrado ser un método de inactivación práctico y seguro para virus de varias familias altamente patogénicas. Lo interesante de ese método es que tiene múltiples beneficios como manipulación segura del antígeno viral, extracción del ácido nucleico, posibilidad de secuenciación de ARN y su utilización en el desarrollo de vacunas. El inconveniente de este método radica en que cada virus se inactiva a diferentes dosis de UV y AMT (4 'aminometil-trioxsalen), dependiendo del tipo de virus, concentración del virus en la muestra a inactivar e intensidad de los rayos UVA.

En general podemos concluir que todos los tratamientos de inactivación recopilados en este documento son efectivos en la reducción de infecciosidad de virus o bacterias, y que su uso va a depender de ciertos parámetros que cada laboratorio de biocontención requiera:

- Tipo y característica de la muestra (suero, sangre entera o tejido)
- Uso final de las muestras inactivadas
- Características físicas y químicas de los virus o bacterias que se van a inactivar
- Margen de seguridad del tratamiento, de acuerdo con la validación del procedimiento
- Accesibilidad, relación costo-beneficio
- Que riesgos representa para la salud usar un determinado tratamiento

Tabla 1. Principales características de los tratamientos de inactivación físicos y químicos

Atributos	Tratamientos de Inactivación						
	Térmico	Gamma	UV	Tampón de lisis	S/D	BPL-BEI	FA, NBF, PFA, M/A
Costo	++	++++	++	+	+	++++	+
Fácil Manipulación	++++	++	+++	++++	++++	+++	+++
Duración/Tiempo	++	++	++	+++	++	++	+++
Robustez	++++	++++	+++	+++	+++	++++	++++
Riesgo para la salud	+	++++	+++	++	++	+++	+++
Adaptabilidad	++	++++	+++	++++	++	++	++++

UV: Ultravioleta; S/D: solvente/detergente; BPL: Beta-propiolactona; BEI: Etilenimina binaria; FA: Formaldehído; NBF: Formalina Neutra Tamponada; PFA: Paraformaldehído; M/A: Metanol/Acetona
 Valoración: +++++ (muy alto) ++++ (alto) ++ (medio) + (bajo)

Tabla 2. Propósito del tratamiento de inactivación físico, químico o fisicoquímico

Uso potencial de las muestras tratadas	Tratamientos de Inactivación							
	Físico			Químico				Fisicoquímico
	Térmico	Gamma	UV	T. Lisis	S/D	BPL- BEI	FA, NBF, PFA	Psoralen+UV
PCR	✓			✓	✓			
Análisis de Proteínas	✓	✓	✓					
Ensayos inmunoenzimáticos		✓	✓			✓		
Uso en el desarrollo de vacunas		✓	✓			✓		✓
Extracción de ácido nucleico	✓			✓	✓			✓
Fijación de las suspensiones celulares							✓	
Citometría de flujo							✓	
Técnicas histológicas							✓	

UV: Ultravioleta; S/D: solvente/detergente; BPL: Beta-propiolactona; BEI: Etilenimina binaria; FA: Formaldehído; NBF: Formalina Neutra Tamponada; PFA: Paraformaldehído; M/A: Metanol/Acetona

Teniendo siempre en cuenta que cualquier método que se escoja, o se necesite realizar en el laboratorio, tendrá que ser validado internamente por el equipo investigador de acuerdo con las muestras de partida, el patógeno involucrado y los objetivos finales. Permitiendo, así, al laboratorio de alta o máxima contención poder trasladar muestras aptas y seguras para su posterior manipulación a uno de menor nivel de bioseguridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarthi, D., Ananda Rao, K., Robinson, R., & Srinivasan, V. A. (2004). Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals*, 32(3), 153–156. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.09.001>.
2. Abad, X., Pintó, R., & Bosch, A. (2000). Virus inactivation processes: the way to ensure virus-safe products. (pp. 643–655). *Recent research developments in microbiology*. Vol. 4 (2000) ; Part II
3. Abad, X. (2012). Transfer of Biological Samples from a Biosafety Level 3 Facility. *Biosafety*, 01(06), 1–3. <https://doi.org/10.4172/2167-0331.1000e125>
4. Abad, X., Solanes, D., Domingo, M. (2010). Reflections on biosafety: do we really know what biosafety, biocontainment and biosecurity mean? https://www.researchgate.net/publication/236944754_Reflections_on_biosafety_do_we_really_know_what_biosafety_biocontainment_and_biosecurity_mean
5. Abad, X., Majó, N., Rosell, R., & Busquets, N. (2012). Assay of Several Inactivation Steps on West Nile Virus and H7N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Suspensions. *Biosafety*, 01(06). <https://doi.org/10.4172/2167-0331.1000103>
6. Alfson, K. J., & Griffiths, A. (2018). Development and testing of a method for validating chemical inactivation of ebola virus. *Viruses*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/v10030126>
7. Asenjo, G. (2018). Thermal inactivation of avian and swine H1N1 Influenza viruses (TFM). Universidad Autónoma de Barcelona. https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2017/hdl_2072_359355/TFM_gasenjoandrews.pdf
8. Bahnemann, H. G. (1976). Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(2), 209–210.
9. Bahnemann, H. G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine*, 8(4), 299–303. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(90\)90083-X](https://doi.org/10.1016/0264-410X(90)90083-X)

10. Berhane, Y., Berry, J. D., Ranadheera, C., Marszal, P., Nicolas, B., Yuan, X., Czub, M., & Weingartl, H. (2006). Production and characterization of monoclonal antibodies against binary ethylenimine inactivated Nipah virus. *Journal of Virological Methods*, 132(1–2), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.09.005>
11. Blow, J. A., Dohm, D. J., Negley, D. L., & Mores, C. N. (2004). Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. *Journal of Virological Methods*, 119(2), 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.03.015>
12. CDC. (2014). *Report on the Inadvertent Cross-Contamination and Shipment of a Laboratory Specimen with Influenza Virus H5N1*. <http://www.cdc.gov/about/pdf/lab-safety/investigationcdch5n1contaminationeventaugust15.pdf>
13. CDC. (2015). Report on the Potential Exposure to Ebola Virus Centers for Disease Control and Prevention. In *Report on the Potential Exposure to Ebola Virus*. http://www.cdc.gov/about/pdf/lab-safety/Final_Anthrax_Report.pdf
14. CDC. (2014). Report on the Potential Exposure to Anthrax Centers for Disease Control and Prevention. In *Report on the Potential Exposure to Anthrax*. http://www.cdc.gov/about/pdf/lab-safety/Final_Anthrax_Report.pdf
15. Centers for Disease Control and Prevention, United States Department of Agriculture (CDC), & Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). (2018). *Guidance on the Inactivation or Removal of Select Agents and Toxins for Future Use* (Issue Septiembre). <https://www.selectagents.gov/irg-intro.html>
16. Chin, A. W. H., Chu, J. T. S., Perera, M. R. A., Hui, K. P. Y., Yen, H.-L., Chan, M. C. W., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe*, 1(1), 4. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30003-3)
17. Chosewood, L. C., & Wilson, D. E. (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. In *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (5th Edition, Issue December). <https://doi.org/citeulike-article-id:3658941>

18. Chowdhury, P., Topno, R., Khan, S. A., & Mahanta, J. (2015). Comparison of β - Propiolactone and Formalin Inactivation on Antigenicity and Immune Response of West Nile Virus. *Advances in Virology*, 5. <https://doi.org/10.1155/2015/616898>
19. Clemente, G. A. (2018). Ultraviolet inactivation of Influenza A viruses from different species (TFM). Universidad Autónoma de Barcelona. https://www.recercat.cat/bitstream/handle/2072/359354/TFM_galessioclemente.pdf?sequence=1
20. Colavita, F., Quartu, S., Lalle, E., Bordi, L., Lapa, D., Meschi, S., Vulcano, A., Toffoletti, A., Bordi, E., Paglia, M. G., Di Caro, A., Ippolito, G., Capobianchi, M. R., & Castilletti, C. (2017). Evaluation of the inactivation effect of Triton X-100 on Ebola virus infectivity. *Journal of Clinical Virology*, 86, 27–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.11.009>
21. Cutler, T. D., & Zimmerman, J. J. (2011). Ultraviolet irradiation and the mechanisms underlying its inactivation of infectious agents. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 12(1), 15–23. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000016>
22. Cutts, T., Grolla, A., Jones, S., Cook, B. W. M., Qiu, X., & Theriault, S. S. (2016). Inactivation of Zaire ebolavirus Variant Makona in Human Serum Samples Analyzed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Infectious Diseases*, 214 (Suppl 3), S218–S221. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw289>
23. Darnell, M. E. R., Subbarao, K., Feinstone, S. M., & Taylor, D. R. (2004). Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *Journal of Virological Methods*, 121(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.006>
24. De Benedictis, P., Beato, M. S., & Capua, I. (2007). Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: A review. *Zoonoses and Public Health*, 54(2), 51–68. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01029.x>
25. Dichtelmüller, H. O., Biesert, L., Fabbrizzi, F., Gajardo, R., Gröner, A., Von Hoegen, I., Jorquera, J. I., Kempf, C., Kreil, T. R., Pifat, D., Osheroff, W., & Poelsler, G. (2009). Robustness of solvent/detergent treatment of plasma derivatives: A data

collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. *Transfusion*, 49(9), 1931–1943. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02222.x>

26. Doig, C., Seagar, A. L., Watt, B., & Forbes, K. J. (2002). The efficacy of the heat killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Pathology* 55(10), 778–779. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.55.10.778>
27. Elliott, L. H., McCormick, J. B., & Johnson, K. M. (1982). Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(4), 704–708. <https://doi.org/10.1128/jcm.16.4.704-708.1982>
28. Emery, F. D., Stabenow, J. M., & Miller, M. A. (2014). Efficient inactivation of *Burkholderia pseudomallei* or *Francisella tularensis* in infected cells for safe removal from biosafety level 3 containment laboratories. *Pathogens and Disease*, 71(2), 274–279. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12138>
29. Feldmann, F., Shupert, W. L., Haddock, E., Twardoski, B., & Feldmann, H. (2019). Gamma irradiation as an effective method for inactivation of emerging viral pathogens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(5), 1275–1277. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0937>
30. Fellowes, O. N. (1965). Comparison of the inactivation and antigenicity of foot-and-mouth-disease virus by acetyleneimine and by combined effect of ultraviolet light and beta-propiolactone. *Journal of Immunology*, 95(6), 1100–1106.
31. Haddock, E., Feldmann, F., & Feldmann, H. (2016). Effective chemical inactivation of Ebola virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1292–1294. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160233>
32. Hartman, A. L., Cole, K. S., & Homer, L. C. (2012). Verification of Inactivation Methods for Removal of Biological Materials from a Biosafety Level 3 Select Agent Facility. *Applied Biosafety*, 17(2), 70–75. <https://doi.org/10.1177/153567601201700204>
33. Herrera-Rodriguez, J., Signorazzi, A., Holtrop, M., de Vries-Idema, J., & Huckriede, A. (2019). Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on

- influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine*, 37(12), 1630–1637. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.086>
34. Huang, Y. J. S., Hsu, W. W., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2015). Temperature Tolerance and Inactivation of Chikungunya Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(11), 674–677. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1795>
35. Ison, S., & Beattie, M. (2002). Book review: Disinfection, sterilization and preservation (5th ed) by Publisers: Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001, Editors: Seymour S. Block. *Healthcare Infection*, 7. <https://doi.org/10.1071/HI02074>
36. Jureka, A. S., Silvas, J. A., & Basler, C. F. (2020). Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/v12060622>
37. Kochel, T. J., Kocher, G. A., Ksiazek, T. G., & Burans, J. P. (2017). Evaluation of TRIzol LS inactivation of viruses. *Applied Biosafety*, 22(2), 52–55. <https://doi.org/10.1177/1535676017713739>
38. Kotb, A. M., Saleh, A. A., Helal, M. A. M., Shahein, N. E., & Khodeir, M. H. (2014). In vitro effect of different inactivators on rabies virus. *Egypt Journal Agriculture Research*, 93(1), 211–220.
39. Kraus, A. A., & Mirazimi, A. (2014). Laboratory biosafety in containment laboratories. In *Working in Biosafety Level 3 and 4 Laboratories: A Practical Introduction* (pp. 5–12). <https://doi.org/10.1002/9783527675357.ch1>
40. Kumar, M., Mazur, S., Ork, B. L., Postnikova, E., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., Johnson, R., & Holbrook, M. R. (2015). Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 223, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.002>
41. Larghi, O. P., & Nebel, A. E. (1980). Rabies virus inactivation by binary ethylenimine: New method for inactivated vaccine production. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(2), 120–122. <https://doi.org/10.1128/jcm.11.2.120-122.1980>

42. Leclercq, I., Batéjat, C., Burguière, A. M., & Manuguerra, J. C. (2014). Heat inactivation of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 8(5), 585–586. <https://doi.org/10.1111/irv.12261>
43. LoGrippo, G. A. (1957). Beta-propiolactone for the sterilization of biological materials. *Henry Ford Hospital Medical Bulletin*, 5(2), 94–99.
44. Mahanty, S., Kalwar, R., & Rollin, P. E. (1999). Cytokine measurement in biological samples after physicochemical treatment for inactivation of biosafety level 4 viral agents. *Journal of Medical Virology*, 59(3), 341–345. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199911\)59:3<341::AID-JMV14>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199911)59:3<341::AID-JMV14>3.0.CO;2-C)
45. Mayo, D. R., & Beckwith, W. H. (2002). Inactivation of West Nile virus during serologic testing and transport. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 3044–3046. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3044-3046.2002>
46. Meechan, P. J., & Wilson, C. (2006). Use of Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets: A Contrarian View. *Applied Biosafety*, 11(4), 222–227. <https://doi.org/10.1177/153567600601100412>
47. Meyer, D., Petrov, A., & Becher, P. (2019). Inactivation of classical swine fever virus in porcine serum samples intended for antibody detection. *Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040286>
48. Mitchell, S. W., & McCormick, J. B. (1984). Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(3), 486–489. <https://doi.org/10.1128/jcm.20.3.486-489.1984>
49. Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K. I., Kurane, I., & Akatsuka, T. (2003). Development of IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue using beta-propiolactone-inactivated dengue viral antigens. In *Dengue Bulletin* (Vol. 27).
50. Ngo, K. A., Jones, S. A., Church, T. M., Fuschino, M. E., St. George, K., Lamson, D. M., Maffei, J., Kramer, L. D., & Ciota, A. T. (2017). Unreliable inactivation of

viruses by commonly used lysis buffers. *Journal of ABSA International*, 22(2), 56–59. <https://doi.org/10.1177/1535676017703383>

51. Olsen, S. C., Boggiatto, P., & Vrentas, C. (2017). Inactivation of Virulent Brucella Species in Culture and Animal Samples. *Applied Biosafety*, 22(4), 145–151. <https://doi.org/10.1177/1535676017734202>
52. OMS. (2005). Tercera edición. In *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*. (Tercera Ed, Vol. 3, pp. 9–29).
53. Park, S. L., Huang, Y. J. S., Hsu, W. W., Hettenbach, S. M., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2016). Virus specific thermostability and heat inactivation profiles of alphaviruses. *Journa of Virological Methods*, 234, 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.04.004>
54. Pastorino, B., Touret, F., Gilles, M., Lamballerie, D. X., & Charrel, R. N. (2020). Evaluation of heating and chemical protocols for inactivating SARS-CoV-2. *BioRxiv*, 2020.04.11.036855. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036855>
55. Patterson, E. I., Prince, T., Anderson, E. R., Casas-Sanchez, A., Smith, S. L., Cansado-Utri -lla, C., Turtle, L., & Hughes, G. L. (2020). Methods of inactivation of SARS-CoV-2 for downstream biological assays. *BioRxiv*, 2020.05.21.108035. <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.108035>
56. Patterson, E. I., Warmbroda, K. L., Bouyera, D. H., & Forrester, N. L. (2018). Evaluation of the inactivation of Venezuelan equine encephalitis virus by several common methods. *J Virol Methods*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
57. Piret, J., Desormeaux, A., & Bergeron, M. G. (2002). Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. *Bentham Science Publishers. Current Drug Targets*, 3(1). <https://doi.org/10.2174/1389450023348037>

58. Sarachai, C., Sasipreeyajan, J., & Chansiripornchai, N. (2010). Avian influenza virus (H5N1) inactivation by binary ethylenimine. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 40(1), 41-46.
59. Schneider, K., Wronka-Edwards, L., Leggett-Embrey, M., Walker, E., Sun, P., Ondov, B., Wyman, T. H., Rosovitz, M. J., Bohn, S. S., Burans, J., & Kochel, T. (2015). Psoralen inactivation of viruses: A process for the safe manipulation of viral antigen and nucleic acid. *Viruses*, 7(11), 5875–5888. <https://doi.org/10.3390/v7112912>
60. Shurtleff, A. C., Garza, N., Lackemeyer, M., Carrion, R., Griffiths, A., Patterson, J., Edwin, S. S., & Bavari, S. (2012). The impact of regulations, safety considerations and physical limitations on research progress at maximum biocontainment. *Viruses*, 4(12), 3932–3951. <https://doi.org/10.3390/v4123932>
61. Smither, S. J., Weller, S. A., Phelps, A., Eastaugh, L., Ngugi, S., O'Brien, L. M., Steward, J., Lonsdale, S. G., & Lever, M. S. (2015). Buffer AVL alone does not inactivate ebola virus in a representative clinical sample type. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10), 3148–3154. <https://doi.org/10.1128/JCM.01449-15>
62. Sutton, D., Aldous, E. W., Warren, C. J., Fuller, C. M., Alexander, D. J., & Brown, I. H. (2013). Inactivation of the infectivity of two highly pathogenic avian influenza viruses and a virulent Newcastle disease virus by ultraviolet radiation. *Avian Pathology*, 42(6), 566–568. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.853867>
63. Thomas, F. C., Ouwerkerk, T., & McKercher, P. (1982). Inactivation by gamma irradiation of animal viruses in simulated laboratory effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(5), 1051–1056. <https://doi.org/10.1128/aem.43.5.1051-1056.1982>
64. Uittenbogaard, J. P., Zomer, B., Hoogerhout, P., & Metz, B. (2011). Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: Implications for the inactivation of viruses. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36198–36214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>

65. Van Kampen, J. J. A., Tintu, A., Russcher, H., Fraaij, P. L. A., Reusken, C. B. E. M., Rijken, M., Van Hellemond, J. J., Van Genderen, P. J. J., Koelewijn, R., De Jong, M. D., Haddock, E., Fischer, R. J., Munster, V. J., & Koopmans, M. P. G. (2017). Ebola Virus Inactivation by Detergents Is Annulled in Serum. *Journal of Infectious Diseases*, 216(7), 859–866. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix401>
66. Wiktor, T. J., Aaslestad, H. G., & Kaplan, M. M. (1972). Immunogenicity of rabies virus inactivated by -propiolactone, acetyleneimine, and ionizing irradiation. *Applied Microbiology*, 23(5), 914–918. <https://doi.org/10.1128/aem.23.5.914-918.1972>
67. Wood, B. A., Mioulet, V., Henry, E., Gray, A., Azhar, M., Thapa, B., Diederich, S., Hoffmann, B., Beer, M., King, D. P., & Eschbaumer, M. (2020). Inactivation of foot-and-mouth disease virus A/IRN/8/2015 with commercially available lysis buffers. *Journal of Virological Methods*, 278, 5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113835>
68. Zou, S., Guo, J., Gao, R., Dong, L., Zhou, J., Zhang, Y., Dong, J., Bo, H., Qin, K., & Shu, Y. (2013). Inactivation of the novel avian influenza A (H7N9) virus under physical conditions or chemical agents treatment. *Virology Journal*, 10, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-289>
69. Zwadyk, P., Down, J. A., Myers, N., & Dey, M. S. (1994). Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(9), 2140–2146. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.9.2140-2146.1994>

ANEXOS

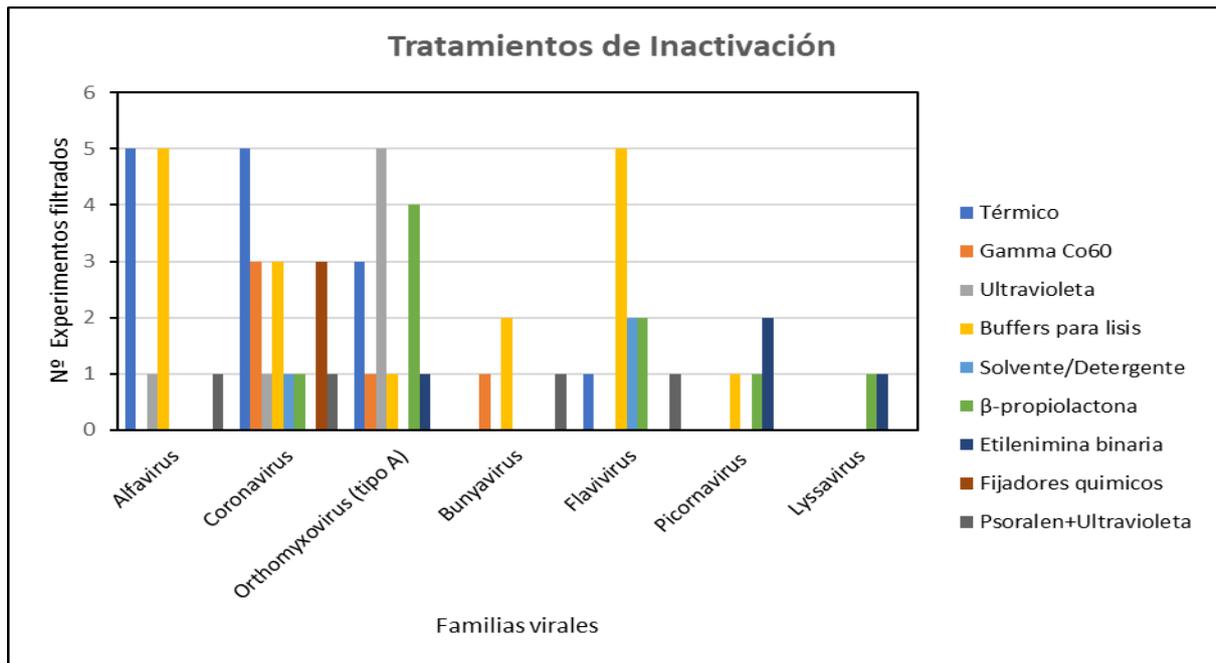


Figura 1. Tratamientos de inactivación utilizados de acuerdo a los virus que se manipulan en un laboratorio de biocontención 3.

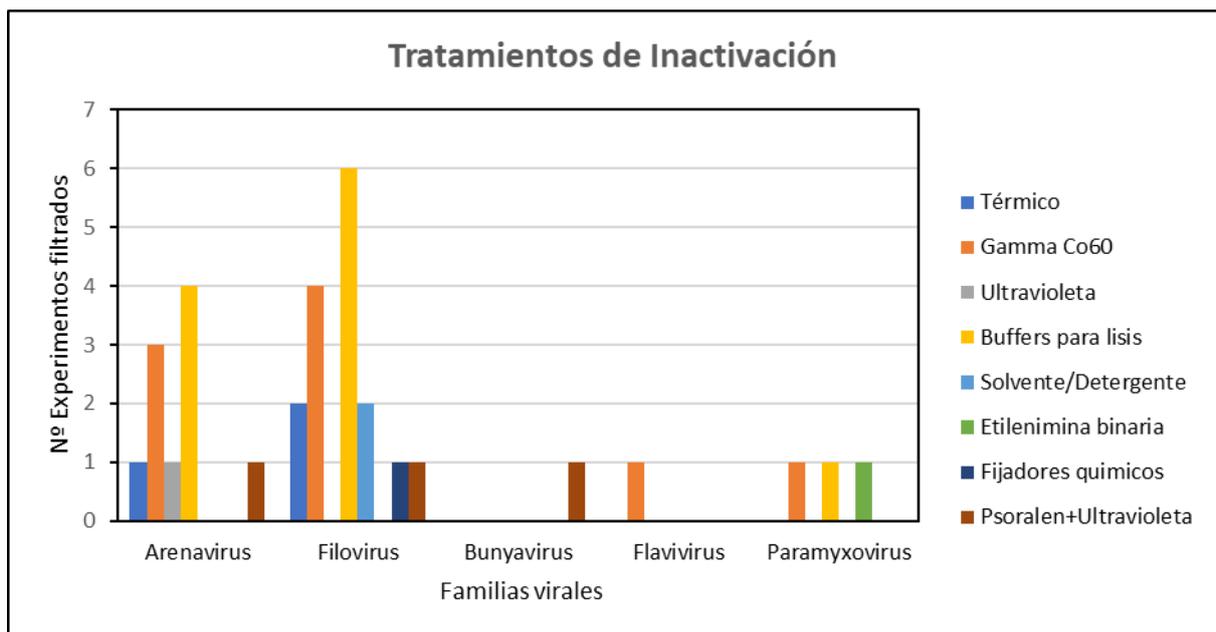


Figura 2. Tratamientos de inactivación utilizados de acuerdo con los virus que se manipulan en un laboratorio de biocontención 4.