



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

VALORACIÓN in vitro DE LA SOLUCIÓN DE SUPEROXIDACIÓN* COMO DESINFECTANTE EN CONTRA DE LOS VIRUS DEL COMPLEJO RESPIRATORIO (PI3, IBR, DVB Y VSRB) Y ROTAVIRUS QUE AFECTAN A LOS BOVINOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CARMINA RUIZ GARDUÑO

ASESORES:

MVZ. ÁNGEL RETANA REYES
MVZ. DAVID PÁEZ ESQUILIANO



MÉXICO, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a todas aquellas personas que confiaron en mi y que saben que este es sólo el principio de todo...

Al MVZ. Ángel Retana Reyes y MVZ. David Páez Esquilano.

A la MVZ. M. en C. Ma. Guadalupe Sánchez González por su colaboración en el análisis estadístico de esta investigación.

A la empresa Esteripharma, S.A. de C.V.

Al laboratorio de Virología de la FMVZ-UNAM.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	37
FIGURAS.....	41

RESUMEN

En la presente investigación se pretende dar a conocer, la capacidad que tiene la **solución de superoxidación*** para inactivar agentes infecciosos virales en un cultivo celular (sistema huésped *in vitro*), en el que se desencadenan una serie de reacciones de oxidación en los virus; mecanismos similares a la eliminación que se presenta en los macrófagos en el proceso de fagocitosis dependiente de oxígeno. Se discute el mecanismo mediante el cual los virus son inactivados después de ser tratados con la **solución de superoxidación*** y el efecto no tóxico del producto químico sobre las células *in vitro*.

Se determinó la capacidad de inactivación de la **solución de superoxidación*** mediante la técnica de diluciones de la **solución de superoxidación***, virus constante o método beta de la prueba de neutralización de la infectividad viral. Las diluciones que se trabajaron fueron: concentrado, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 y 1/200, en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y con un título de 10^4 DICC50%/dosis de virus. No se observó efecto citopatogénico (ECP) en los cultivos tratados e inoculados con las mezclas de la solución concentrada más virus hasta la dilución 1/50 en los virus: IBR, DVB y VSRB. Para PI3 no se observó ECP hasta la dilución 1/20 y a partir de la dilución 1/50 se observó ECP. Mientras que para Rotavirus la presencia del virus se observó a partir de la dilución 1/100. Se determinó la presencia de los virus por medio de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta para IBR y DVB, ELISA indirecta para VSRB, PI3 y Rotavirus. Todas las microplacas fueron fijadas con la tinción cristal violeta para ser observadas.

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica busca sustancias químicas que permitan inactivar los virus responsables de infecciones que afectan gravemente a diferentes especies animales, ya que no todos los desinfectantes de uso rutinario los inactivan. Se busca también que sean seguros, que no contaminen el entorno ecológico ni representen peligro para la salud del hombre y los animales.

La resistencia que presentan algunos virus, se debe a la composición química de la envoltura que contiene al ácido nucleico. Generalmente los virus que presentan una envoltura constituida por mucoproteínas y lipoproteínas, son sensibles a productos químicos como solventes orgánicos; un ejemplo son los virus de la parainfluenza viral bovina tipo 3 (PI3), el virus de la diarrea viral bovina (DVB), el virus de la rinotraqueitis viral bovina (IBR) y el virus sincitial respiratorio bovino (VSRB). Sin embargo, virus que presentan una envoltura de tipo proteica (cápside) como son los rotavirus, adenovirus y parvovirus, son resistentes a los solventes orgánicos lo que hace necesario el uso de sustancias químicas más agresivas, con ello mayor grado tóxico y de contaminación para el hombre, animales y medio ambiente. Es por ello que se busca un desinfectante que logre la destrucción de casi todos los agentes infecciosos entre ellos los virus sin los efectos detrimentales mencionados ¹.

ANTECEDENTES

Muchos de los antisépticos y desinfectantes utilizados hoy en día ya eran conocidos por los griegos y romanos, mientras que otros fueron introducidos durante la Edad Media. Sin embargo, el auge de estos productos se produjo durante el siglo XIX y los primeros años del siglo XX, por el desarrollo de la cirugía, el interés médico y social en reducir el elevado número de infecciones hospitalarias, mejorar la curación de las heridas, el conocimiento científico de los microorganismos y su relación con ciertas enfermedades. No obstante, la revolución terapéutica que acompañó la introducción de los antibióticos en medicina hizo que los antisépticos y desinfectantes fueran olvidados, pero la aparición en las últimas décadas de bacterias resistentes a los antibióticos, la emergencia de patologías fúngicas y víricas nuevas y para las que existían limitaciones terapéuticas hizo imponer y actualizar los métodos preventivos para reducir el riesgo de adquisición de las infecciones. Con ello los antisépticos y desinfectantes volvieron a adquirir importancia, no sólo en medicina, sino también en otros campos como el veterinario, industrial y en la conservación de los alimentos ².

Aunque los antisépticos y desinfectantes empezaron a ensayarse *in vitro* desde el punto de vista microbiológico, los procedimientos para su evaluación no están bien definidos como las pruebas para la determinación de la actividad antimicrobiana de los antibióticos. Originalmente, los ensayos se dirigieron al estudio de la cinética de la desinfección, determinándose si los microorganismos eran destruidos por una determinada concentración de desinfectante en un

determinado tiempo de contacto. Los primeros estudios de evaluación de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes fueron los realizados por Burcholtz en 1875, para determinar la concentración mínima inhibitoria del fenol; también por Robert Koch, que hizo mediciones del poder inhibitorio del cloruro de mercurio frente a las esporas de *Bacillus anthracis*, y por Geppert en 1889, que utilizó el sulfato de amonio como neutralizante del cloruro de mercurio, con mejores resultados que los obtenidos con anterioridad por Robert Koch ².

Sin embargo, Kronig y Paul publicaron en 1897 un estudio que constituye la base de los actuales ensayos de desinfección, al observar: 1) que no todas las bacterias mueren al mismo tiempo, y que esto depende de la concentración del producto y de la temperatura de ensayo; 2) que los desinfectantes pueden ser comparados sólo cuando se ensayan bajo condiciones controladas; 3) que el número de bacterias debía ser constante; 4) que los resultados de los ensayos eran más exactos cuando se determinaba el número de sobrevivientes en placas de cultivo ².

Así en 1903, Rideal y Walker pusieron en práctica estos principios en su método de coeficiente de fenol para el ensayo de desinfectantes. Estos autores definieron unas condiciones de ensayo, usando bacterias y métodos de cultivo concretos. Posteriormente en 1908, Click y Martin modificaron el método anterior con la introducción de materia orgánica en la solución desinfectante. Entre 1965 y 1969 Kelsey propuso los llamados ensayos de capacidad, en ellos se evalúa la capacidad del desinfectante en permanecer activo tras la incorporación sucesiva de microorganismos ³.

En 1881 Koch, ideó un tipo de método distinto al descrito hasta entonces (ensayos de suspensión), que tenían por finalidad reproducir en el laboratorio las condiciones reales en las que se usaba el producto desinfectante. Para ello, utilizó hilo de seda impregnado con *Bacillus anthracis*. En base a este estudio se propusieron y publicaron estudios en los años 50, los estudios con portagérmenes³.

Posteriormente, se desarrollaron ensayos cuantitativos para comparar la población microbiana inicial sometida a la acción del antiséptico o desinfectante con el número de microorganismos sobrevivientes, tanto para ensayos de suspensión como de portagérmenes. Durante años se crearon grupos de trabajo en distintos países europeos que establecieron sus propios ensayos. Así, en 1960 se publicaron los ensayos del *British Standard* y posteriormente en 1972 los de la *Deutsche Gesellschaft für Hygiene and Mikrobiologie*, los ensayos 5-5-5 del *Dutch Comité on Phytopharmacy* y las normativas del *Association Francaise de Normalisation (AFNOR)*. Estas últimas fueron las primeras normativas que utilizaron métodos de dilución-neutralización y métodos de filtración³.

Actualmente, no existe aún un esquema universalmente aceptado para los ensayos de actividad de los antisépticos y desinfectantes. No sólo cada país tiene sus propios métodos de estudio, o adopta los de otro país, sino que dentro de un mismo país, los métodos de trabajo empleados son diferentes en los distintos campos profesionales de aplicación (alimentación, industria, medicina y veterinaria). Los ensayos universalmente utilizados son los de la *Deutsche Gesellschaft für Hygiene and Mikrobiologie* y los de la *Association Francaise de Normalisation (AFNOR)*³.

En el ámbito europeo, el principal avance en el campo de evaluación de los desinfectantes se produjo a partir de abril de 1990, donde se creó el *Technical Committe 216* para definir las normas europeas para evaluar la eficacia antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes ³.

En 1998 la *United States Enviromental Protection Agency* (EPA) y la *United States Food and Drug Administration* (FDA), regulan los compuestos formulados como antisépticos y otros productos usados para inhibir o destruir los microorganismos de la piel. En 1998, la FDA propuso la clasificación de los desinfectantes de alto nivel utilizados en medicina y fue aprobada hasta el año 2000 ^{4,5, 6}.

Los métodos de evaluación de la eficacia antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes utilizados en Estados Unidos de Norteamérica y Europa se basan en 4 etapas: La primera consiste en determinar la actividad antimicrobiana básica del producto, mediante ensayos *in vitro*, enfrentando suspensiones de distintos microorganismos al desinfectante. En la segunda etapa, se determina si el desinfectante posee actividad antimicrobiana en las condiciones que se pueden encontrar en la práctica de la desinfección para un determinado uso (concentración y tiempo de contacto compatibles con el material y la práctica clínica). En la tercera etapa se evalúa la actividad del desinfectante mediante un método experimental con el equipo clínico que va a ser utilizado, contaminándolo artificialmente y estudiando la reducción del número de microorganismos por la acción del desinfectante. En la cuarta etapa, el desinfectante se evalúa en la

práctica clínica, mediante estudios de campo en los que se controla el resultado de la desinfección ^{7.8.}

En México la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos Generales de Análisis- Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas, tiene como objetivo establecer el método de prueba para determinar la actividad antimicrobiana de los productos germicidas utilizados en nuestro país. Esta norma tiene como fundamento establecer un sólo método para determinar la actividad antimicrobiana, donde se decreta el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de pruebas específicas ^{9.} Además del uso de esta norma en nuestro país, también se utilizan otras emitidas por la *Association of Official Analytical Chemist (AOAC)* y la *Association Francaise de Normalisation (AFNOR)*, así como las cuatro etapas para la determinación de microorganismos en los antisépticos y desinfectantes mencionadas anteriormente. Las normas de la AFNOR que corroboran en el estudio de la acción de un desinfectante en México, son la NFT 72-150 (Norma Francaise- Détermination de l'activeté bactericide) ^{10,} que establece el método de dilución- neutralización como prueba para determinar el efecto bactericida y la NFT 72-180 (Norma Francaise- Détermination de l'activeté virucide vis-á-vis des virus vertébrés) ^{11,} que establece la actividad viricida de los antisépticos y desinfectantes.

En la prevención y control de las enfermedades infecto-contagiosas, se han logrado grandes avances gracias a las medidas de bioseguridad, higiene, el uso de antimicrobianos y la aplicación de vacunas, sin embargo la desinfección

representa parte importante del programa de bioseguridad. El desinfectante es una herramienta que nos permite destruir virus, bacterias, hongos y esporas que contaminan vehículos, equipo, locales y en general todo aquello que representa una fuente de infección para los animales y el hombre, por lo tanto un desinfectante es una parte importante dentro de un programa de bioseguridad ¹

Los desinfectantes más utilizados son:

Detergentes aniónicos. Los jabones integran el grupo más importante de uso básico para cualquier programa de desinfección. El jabón se disocia formando iones de sodio (Na^+) más iones de ácidos grasos (R-COO^-), este último ion graso cuando entra en contacto con sales clásicas el ion calcio (Ca^+), reacciona con dos iones del ácido graso para formar precipitados que flotan en la superficie del agua. Esta acción solubilizante del jabón ayuda a eliminar bacterias y residuos de la superficie tratada; sin embargo, los jabones no tienen una acción bactericida específica, se requiere de la ayuda de agentes más enérgicos ¹².

Alcoholes. Los alcoholes alifáticos pueden ser buenos desinfectantes. El más utilizado es el etílico diluido al 70%, el propílico, así como el isopropílico, se usan para desinfectar piel, instrumentos y agujas. No tiene acción contra esporas, virus sin envoltura y algunos hongos. Algunos alcoholes como el propilenglicol son utilizados para desinfectar aire, como vehículo para inyectar algunos antibióticos en solución acuosa y como conservadores de ciertos alimentos. Los alcoholes frecuentemente son combinados con otros desinfectantes para formar tinturas, aumentar el poder germicida o como fijadores. El mecanismo de acción de estos productos es la hidrólisis de las fracciones lipóideas que tienen los microorganismos destruyendo la cubierta lipídica de la membrana celular y en concentraciones altas coagula las proteínas, además de una acción deshidratante. Con el aumento de la temperatura se evaporan rápidamente ¹².

Fenoles. Se obtienen de la destilación de carbón de hulla y son diferentes en cuanto a sus propiedades físicas. Estos son desinfectantes que conservan su actividad germicida aún en aguas duras y en presencia de materia orgánica, pero disminuye en adición de

alcohol y grasa, pero aumenta cuando se mezclan con cloruro de sodio y el incremento de temperatura. Su mecanismo de acción sobre los microorganismos es aumentando la permeabilidad celular produciéndose pérdida de moléculas, interfiriendo en el metabolismo de la glucosa y el succinato de sodio, además de ser un poderoso veneno protoplasmático que coagula proteínas y agentes reductores. Tienen actividad contra virus lipofílicos como el de la bronquitis infecciosa, rabia, influenza y micoplasmas ¹².

Compuestos Halógenos: Cloro: Las soluciones de **hipoclorito sódico** son probablemente los compuestos liberadores de halógenos mejor conocidos y figuran entre los desinfectantes más antiguos. Son efectivos frente a todos los tipos de microorganismos pero pierden gran parte de su actividad en presencia de materia orgánica. Las soluciones de hipoclorito sódico han sido formuladas con varios detergentes (por ej., óxidos de aminos, jabones, sulfonatos alcanos o éter fosfatos) que no afectan a la actividad microbicida y mejoran su capacidad penetrante. Las ventajas de las soluciones de hipoclorito sódico sobre otros desinfectantes incluyen su baja toxicidad a concentraciones de uso, la facilidad de manejo y el costo relativamente bajo. Las soluciones concentradas son corrosivas para la piel, metales y otros materiales ¹².

Compuestos Yodados: El yodo, por sí mismo, no es una sustancia muy soluble y resulta, además, demasiado tóxico, corrosivo y colorante para ser utilizado como un microbicida activo, aunque figura entre las sustancias desinfectantes más activas que se conocen ya que su espectro abarca a las bacterias, virus, hongos y esporas ¹².

También se ha observado que reacciona con surfactantes etoxilatados produciendo **yodóforos**, los cuales se estabilizan por lo general con ácidos o tampones ácidos y poseen un espectro de actividad muy amplio, frente a bacterias, esporas, micobacterias, hongos y virus, por lo que han sido ampliamente utilizados, desafortunadamente su costo es muy alto ¹².

Aldehídos: Formaldehído, paraformaldehido, glutaraldehído, glioxialdehído, glicidaldehído y succindialdehído

Todos estos compuestos, presentan un espectro capaz de eliminar a todos los virus, bacterias y hongos; sin embargo es necesario hacer notar que todos son considerados potencialmente carcinogénicos, con efecto residual y muy tóxicos, razón por la cual su uso está prohibido ^{12, 13}.

La industria ofrece una gran gama de desinfectantes que pueden ayudar a la eliminación de virus, pero no todos suelen ser de amplio espectro, de fácil aplicación, inocuos, inodoros o bien, no generar ningún tipo de daño a los animales, al medio ambiente o al ser humano. Las soluciones de superoxidación* son los desinfectantes de vanguardia actualmente, ya que están constituidos por moléculas de oxígeno que van liberando hidrógenos y que tienen como resultado final al agua ¹⁴.

Las Soluciones de Superoxidación*: Son desinfectantes denominados de alto nivel de oxidación (que tiene capacidad de esterilización), elimina el 99.99% de bacterias, esporas, virus y hongos, debido a su fórmula con base en agua y a su pH de 6.5 a 7.5, estos desinfectantes son totalmente inocuos, tanto para los seres humanos como para los animales, son productos amigables con el entorno

ecológico por sus características de ser inodoros, insaboros e incoloros y no emitir vapores ni ser corrosivos, es el desinfectante ideal para ser utilizado en la industria alimenticia y para formar parte de los programas de “**desinfección**” en las explotaciones pecuarias de cualquier tipo. No se requiere utilizar equipo especial para su aplicación, ni retirar al personal, su aplicación no afecta el equipo sin importar las características del material ya sea metálico, plástico u otro ¹⁴. Las **soluciones de superoxidación*** han sido utilizadas en el proceso de lavado de la glándula mamaria para el control de mastitis, así como su uso después de la ordeña por vía intramamaria, reduciendo la carga bacteriana y los costos de producción por el uso de antibióticos que causan resistencia ¹⁵. Estas soluciones también han sido usadas en medicina humana para el lavado de prótesis faciales en pacientes oncológicos de la Clínica de Prótesis Maxilofacial del Instituto Nacional de Cancerología ¹⁶.

Farmacocinética

La **solución de superoxidación*** se desdobra en el medio o en el organismo al que se le administre, por lo que termina siendo únicamente agua. Estas soluciones se han utilizado en el lavado de heridas ¹⁷.

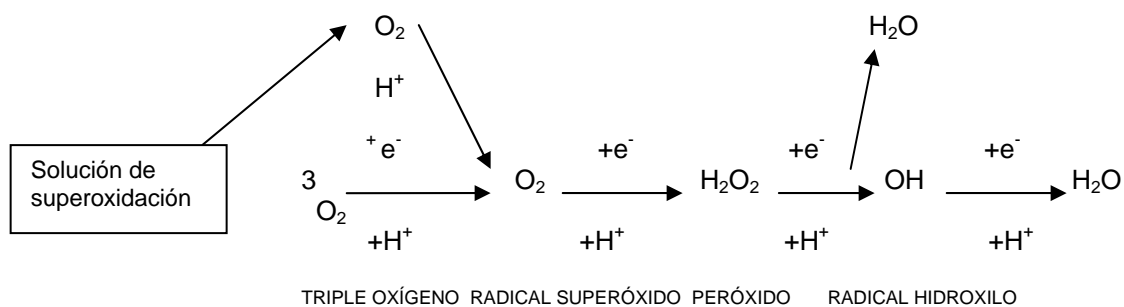


Figura 1 (Landa- Solis C., *et al.*)

Transformación secuencial de la solución de superoxidación* en agua por reducción progresiva ¹⁷.

Farmacodinamia, efecto viricida de las sustancias de superoxidación*

El mecanismo de acción de las **soluciones de superoxidación*** se basa en la oxidación de las glicoproteínas, péptidos y los lípidos que integran las envolturas de virus (cápside o peplos) ¹⁷.

La oxidación se define como la pérdida de electrones y la reducción como la ganancia de electrones ¹⁸.

En las reacciones de oxido- reducción de los sistemas biológicos (células), se produce energía. Uno de los principales agentes reductores es el hidrógeno ¹⁸.

En una hidrogenación catalítica el enlace H-H se rompe en forma homolítica, lo cual significa que la reducción se efectúa por adición de dos átomos de hidrógeno a la molécula orgánica ¹⁸.

El oxígeno en la industria funge como precursor de algunos compuestos orgánicos y como desinfectante ¹⁹.

Ozonización

Es un método de desinfección que consiste en agregar cantidades suficientes de ozono en agua para asegurar la inactivación o destrucción de los microorganismos. El mecanismo de desinfección de la ozonización se basa en el alto poder del ozono como oxidante protoplasmático convirtiéndose en un eficiente destructor de virus, bacterias, esporas y hongos ¹⁹.

Ozonólisis

Cuando un alqueno (doble enlace carbono-carbono), se trata con ozono a bajas temperaturas, el enlace doble entre los carbonos se rompe y estos carbonos quedan unidos con enlaces dobles a oxígeno. A esta reacción de oxidación se le llama ozonólisis ¹⁸.

Si el ozono se rompe en presencia de un agente oxidante como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los productos serán cetonas o ácidos carboxílicos ¹⁸.

El ozono mata a la bacteria por medio de la ruptura de la membrana celular. Este proceso, conocido como *destrucción de células por lisina*, produce la dispersión del citoplasma celular en el agua: los lípidos insaturados son los componentes mayoritarios de la membrana citoplasmática que posee las bacterias, el ozono ataca los dobles enlaces lo que da lugar a la formación de un ozónido. Esta acción comienza la destrucción de la capacidad de la célula de funcionar y hasta puede ser suficiente para causar la muerte de células más débiles. Este ozónido tiene un alto potencial de oxidación, es inestable, y ejerce su propia acción de desinfección atacando enzimas, grupos sulfridrilo o aldehídos, liberando compuestos peroxiles, que son también desinfectantes, todo esto conduce a la dispersión del citoplasma

y por consiguiente a la muerte del microorganismo. La acción viricida del ozono oxida la cubierta lipídica destruyéndola, así se modifica su estructura impidiendo la unión a su receptor. ²⁰.

El mecanismo de ozonólisis, es un mecanismo propio de las células accesorias más importantes en la respuesta inmune innata, función de las células fagocíticas de los linajes monocítico y mielocítico, particularmente los macrófagos y neutrófilos. La fagocitosis es la ingestión de partículas por células, e implica la unión de la partícula a la superficie del fagocito seguido de su internalización y destrucción ²¹.

Durante la fagocitosis hay un aumento en el consumo de glucosa y oxígeno lo cual es referido como el estallido respiratorio. La consecuencia del estallido respiratorio es la producción de un número de compuestos que contienen oxígeno y que pueden matar a las bacterias fagocitadas. Esto es referido como muerte celular dependiente de oxígeno. Además, las bacterias pueden ser destruidas por sustancias pre-formadas liberadas de los gránulos o lisosomas al fusionarse con el fagosoma. Esto se refiere como muerte intracelular independiente de oxígeno ^{21,22}.

Durante la fagocitosis la glucosa es metabolizada por la vía pentosa monofosfato formándose el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). El citocromo B que forma parte de los gránulos específicos se combina con la NADPH oxidasa de la membrana y la activa. La NADPH oxidasa utiliza al oxígeno para oxidar al NADPH. El resultado es la producción del anión superóxido. Parte del anión superóxido es convertido a H_2O_2 y oxígeno por la superóxido dismutasa (convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno) y la catalasa, que degrada el

peróxido de hidrógeno. Estas enzimas controlan la acción de estos productos de forma que actúen primariamente sobre los agentes patógenos en los fagolisosomas. Adicionalmente, el anión superóxido puede reaccionar con H_2O_2 resultando en la formación de radicales hidroxilo y más oxígeno. El resultado de todas estas reacciones es la producción de los compuestos tóxicos como el anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 , el oxígeno (O_2) y los radicales hidroxidrilo (OH^\bullet). La producción de estos metabolitos es inducida por la unión de anticuerpos agregados a los receptores Fc γ . Los productos microbicidas de los fagocitos activados también pueden dañar a las células huésped²².

A medida que los gránulos azurófilos se fusionan con el fagosoma, la mieloperoxidasa es liberada al fagosoma. La mieloperoxidasa utiliza H_2O_2 y iones haluro (generalmente Cl^-) para producir hipoclorito, sustancia sumamente tóxica. Parte del hipoclorito se degrada espontáneamente para dar el singlete de oxígeno. El resultado de estas reacciones es la producción del hipoclorito (OCl^-) y del singlete de oxígeno (O_2)^{22,23}.

Reacción	Enzima
$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow OCl^- + H_2O$	Mieloperoxidasa
$OCl^- + H_2O \rightarrow {}^1O_2 + Cl^- + H_2O$	
$2O_2 + 2H^+ \rightarrow O_2^- + H_2O_2$	Superóxido dismutasa
$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	Catalasa

Figura 2 (University of South Carolina. 2006.)

Clase de mecanismo	Productos específicos
Acidificación	pH = 3,5 – 4,0, bacteriostático o bactericida
Productos tóxicos derivados de oxígeno	Superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical de oxígeno 1O_2 , radical hidróxilo OH, hipohalito OCl
Óxidos de nitrógeno tóxicos	Óxido nítrico NO
Péptidos antimicrobianos	Defensinas y proteínas catiónicas
Enzimas	Lisozima: disuelve la pared celular de algunas bacterias gram positivas. Hidrolasas ácidas: digieren bacterias.
Competidores	Lactoferrina (une hierro) y proteína de unión a la vitamina B ₁₂ .

Figura 3 (University of South Carolina. 2006.)

El uso de la sustancia de **superoxidacidación*** como desinfectante, pretende que la fórmula del mismo actúe inactivando los virus que en este caso se mencionan a continuación.

El **virus de la diarrea viral bovina (DVB)** se clasifica en el género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*⁴⁴. Es un virus envuelto y con ello resulta sensible a desinfectantes relativamente suaves, luz ultravioleta, detergentes y solventes orgánicos. El genoma viral consiste en una cadena de ácido ribonucleico (ARN). Este ácido nucleico codifica para 11 proteínas, 4 de ellas son componentes estructurales del virión (3 glucoproteínas de la envoltura y 1 nucleoproteína). En el virus de la DVB se distinguen dos genotipos. El genotipo 1 es el más abundante; solamente en 6 al 11% de los aislamientos (Norteamérica hasta 36%) corresponden al genotipo 2. A este último con frecuencia se le encontró relacionado con diarreas graves o trastornos hemostáticos (síndrome hemorrágico). Toda cepa viral puede presentarse en dos biotipos, que se

*SoluVet Esteripharma S. A. de C. V.

distinguen por su comportamiento en cultivos celulares. El biotipo más frecuente es no citopatógeno (ncp), es decir que una infección a células cultivadas bovinas no provoca la destrucción de las mismas, el menos frecuente es el biotipo citopatógeno (cp) infecta a las células e induce la muerte de ellas mediante el mecanismo de apoptosis ^{24,25}.

Los efectos citopáticos en los cultivos celulares no se correlacionan con la virulencia *in vivo*. La infección de los animales gestantes con el biotipo NCP puede resultar en la muerte del embrión, la reabsorción y mortinatos e inducen daño teratogénico no fatal o puede llevar al nacimiento de becerros persistentemente infectados ²⁶. El biotipo CP, puede presentarse en los animales persistentemente infectados por un reacomodo genómico del virus NCP, en una inserción de secuencias celulares o reacomodos en el genoma viral que va a expresarse con los signos clínicos pertenecientes a la enfermedad de las mucosas ²⁷.

La diarrea viral bovina (DVB) es una de las enfermedades con más pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial ²⁸.

Dentro de un rebaño puede variar notablemente la tasa de infección, dependiendo de las posibilidades de contacto, momento de la infección y la presencia de animales con infección persistente. Si esto ocurre la seroprevalencia es superior al 90%. Los animales con infección persistente son los principales diseminadores del virus de la DVB ²⁹.

Se estima que el costo relacionado con las pérdidas por el virus de DVB en la industria ganadera es de \$7 mil millones de dólares anuales sólo en Estados Unidos de Norteamérica (E.U.A.) ³⁰. Las pérdidas calculadas debido a la infección por el virus de DVB varían ante la característica del rancho, el estado inmune del

hato, la prevalencia de los animales persistentemente infectados (PI), la patogenicidad del virus infectante, su biotipo y su genotipo. Con una incidencia anual de infecciones agudas estimada en un 34%, las pérdidas anuales totales se calcularon en \$20 millones de dólares por cada millón de animales paridos sólo en E.U.A. El Dr. Bill Kvasnicka, Veterinario de la Universidad de Nevada en Reno asegura que un 70 a 90% de las infecciones de DVB ocurren sin la aparición de signos clínicos ^{31, 32}.

El virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), es un *herpesvirus bovino tipo I*, de la familia *Herpesviridae* ⁴⁴ y subfamilia *alphaherpesvirinae* ⁴⁴. Es un virus ADN lineal de cadena doble con 18 proteínas estructurales y existen cepas con diferentes grados de virulencia. Los subtipos como el BHV-1 pueden infectar a cabras, ovinos, venados, cerdos y rumiantes silvestres como el búfalo que actúa como reservorio. El virus permanece activo durante 10 días aproximadamente y se inactiva a 56°C. El virus de IBR es sensible al éter, al alcohol, acetona y es estable a un pH igual o superior a la neutralidad. La rinotraqueitis infecciosa bovina es una infección de las vías respiratorias superiores y de la tráquea, la cual puede adoptar diferentes formas, que incluyen la respiratoria, conjuntival, vulvovaginitis pustulosa infecciosa que afecta al tracto reproductor, los abortos endémicos y la forma virémica de los neonatos que se caracteriza por encefalitis y necrosis focal en placas de la lengua. La forma respiratoria es la más frecuente pudiendo presentarse sola o en asociación con la forma conjuntival. La forma respiratoria de IBR está asociada con una morbilidad elevada pero con una mortalidad baja en los animales sensibles. Los animales afectados manifiestan signos durante un periodo de 7 a 14 días aproximadamente y después de ese

tiempo se pueden recuperarse, a no ser que exista una infección secundaria de tipo bacteriano. Durante la infección aguda o en las 4 a 8 semanas siguientes puede haber abortos. Aunque puede existir mortalidad de los fetos en cualquier fase de la gestación. El diagnóstico se realiza cuando existen los signos característicos y lesiones en la mucosa nasal durante el examen físico y la confirmación de laboratorio se realiza mediante técnicas de anticuerpos fluorescentes ^{25, 33}.

El virus sincitial respiratorio bovino (VSRB), un virus envuelto con una cubierta de lipoproteínas, tipo ARN, clasificado dentro de la familia *Paramixoviridae* ⁴⁴, subfamilia *Paramixovirinae* ⁴⁴ y genero *pneumovirus*, son pleomórfos y presentan proyecciones en su superficie, producen lesiones muy características en donde las células se juntan formando masas multinucleadas de protoplasma llamadas sincitios. El VSRB es una enfermedad viral, que afecta particularmente a los becerros pero también a las vacas adultas, se caracteriza por un cuadro respiratorio agudo con elevada mortalidad y morbilidad. La vía de transmisión del virus es nasal y oral. Los signos de la enfermedad aguda varían desde inaparentes a fulminantes. En la mayoría de los brotes, la infección aguda con VSRB causa una mortalidad elevada en el grupo afectado en un plazo de varios días a una semana. En becerros recién nacidos, provoca una neumonía aguda severa y mortal cuando los becerros no están vacunados, los signos clínicos son muy aparentes, se complica con otras infecciones virales como DVB o IBR, así como con infecciones bacterianas secundarias, además con neumonías intersticiales que provocan edema y lo desencadenan factores de estrés como el

parto, destete, climas extremos como el frío, el transporte, entre otros. El diagnóstico es a base de Inmunofluorescencia directa o indirecta, virusoneutralización, inhibición de la hemoaglutinación, fijación de complemento, difusión en gel agar y ELISA^{25, 33}.

El virus de la parainfluenza tipo 3 (PI3), pertenece al género *Paramixovirus*⁴⁴ de la familia *Paramixoviridae*⁴⁴, es un ARN virus, es habitante normal del aparato respiratorio de los bovinos. Es un virus hemoaglutinante y produce efecto citopático intranuclear o intracitoplasmático en cultivo celular. Se destruye en pH ácido menor de 3 y desinfectantes comunes como el fenol, isopropanol, éter y cloroformo^{25, 33}.

El virus de la Parainfluenza 3 (PI3) es conocido en México desde 1971, mediante pruebas diversas llevadas a cabo en diferentes estados de la República Mexicana, éstas evidencian que el virus está ampliamente difundido en todo el país³⁴.

El virus de PI3 se transmite por contacto directo de animales enfermos a sanos, por secreciones nasales, oculares, orales o bien por alimentos, agua u objetos contaminados con el virus³⁴.

El periodo de incubación varía dependiendo del sistema de explotación. En confinamiento el periodo de incubación se presenta de 3 a 10 días para infectar a toda la población del corral o corrales contiguos, por el contrario en sistemas extensivos puede demorar de semanas a meses para que todo al hato se vea afectado³⁵.

El virus respiratorio puede causar neumonía intersticial afectando los lóbulos craneales de pulmón, con manifestaciones que van desde subclínica, clínica leve grave o mortal ³⁶.

En algunos países se ha demostrado la prevalencia del virus en hasta un 90% de bovinos clínicamente sanos, demostrándose que el virus por sí solo, sin complicaciones bacterianas es capaz de producir la enfermedad sobre todo en becerros en los cuales provoca fiebre, lagrimeo, secreción nasal serosa, depresión, disnea y tos ³⁶.

Para obtener un diagnóstico diferencial de esta enfermedad no se deben tomar en cuenta sólo los signos clínicos, ya que la confirmación definitiva es por comprobación serológica, entendiéndose por esto la detección de anticuerpos por el virus. La prueba serológica estándar es la neutralización viral, pero también hay otras pruebas como inmunofluorescencia indirecta, hemoaglutinación indirecta y la de ELISA que se usan para detección de anticuerpos ³⁶.

El **Rotavirus bovino** pertenece a la *familia Reoviridae* ⁴⁴, mide aproximadamente 75 nanómetros de diámetro, carece de envoltura lipídica y está compuesto de una triple cápside proteica de simetría icosaédrica. El genoma viral está compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena, cada uno codifican una proteína viral, de las cuales, seis son estructurales y cinco no estructurales. Los rotavirus son altamente resistentes a la inactivación físico-química, permanecen estables dentro de un rango de pH de 3 a 9, no se disuelven en solventes lipídicos (fluorocarbonos, éter o cloroformo) y se mantienen latentes durante meses en ambientes húmedos, temperaturas entre los 4 y 20°C y en presencia de iones

Ca²⁺ que estabilizan la cápside externa. El virus sólo puede ser inactivado con compuestos fenólicos, sales de amonio cuaternario, formalina al 0,5% y betapropiolactona (BEI) al 10%. El etanol 95% es el desinfectante más efectivo. Existen dos serotipos el A que infecta generalmente a los terneros y el B que infecta con menor frecuencia a los neonatos. Los neonatos menores de 14 días son los que están más expuestos a la infección con rotavirus entéricos y la mayoría de las infecciones ocurren durante la primera semana de vida. El predominio de la infección en los terneros neonatos nacidos en granjas de ganado vacuno lechero que albergan el virus, es elevado, por lo tanto la morbilidad es elevada (del 50 al 100%) y la mortalidad varía según el nivel de inmunidad frente al virus, el serotipo y la carga de virus del inóculo, la severidad de la infección gastrointestinal, el estrés y el hacinamiento. Los terneros infectados en circunstancias de campo, pueden padecer la enfermedad inaparente, benigna, moderada o mortal. La infección con rotavirus se limita al intestino delgado y se caracteriza por la destrucción de los enterocitos de las vellosidades y la sustitución de estas células cilíndricas por células maduras procedentes de las criptas intestinales. Por consiguiente, la diarrea por rotavirus se caracteriza por una mala digestión y mala absorción de nutrientes. El diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas^{24, 33}.

JUSTIFICACIÓN

La industria Químico-Farmacéutica frecuentemente busca e investiga productos químicos para ofrecerlos como desinfectantes y antisépticos, sin embargo el producto químico debe reunir características ideales para ser elegido como herramienta en los programas de limpieza y desinfección. Es importante contar con desinfectantes que reúnan características determinantes como la de ser de amplio espectro, de fácil aplicación, inocuos para el hombre, los animales y el medio ambiente. En la actualidad la industria Químico-Farmacéutica ofrece productos como las **soluciones de superoxidación de tercera generación** que han demostrado ser efectivos para destruir bacterias, esporas y hongos presentes en instalaciones, equipo, vehículos, instrumental de cirugía y cuartos sépticos. Por otro lado se desconoce su acción para destruir virus y su efecto tóxico para las células, es de suma importancia determinar el efecto que presentan las **soluciones de superoxidación** sobre los virus y las células permisibles de ellos. En este trabajo se pretende valorar las **soluciones de superoxidación*** *in vitro*, para determinar el efecto que presenta el químico sobre las células y los virus de las diferentes familias virales más frecuentes que afectan a los bovinos en México, determinar las concentraciones mínimas que garanticen la inactivación de virus por parte del desinfectante e inocuidad en la célula huésped (cultivo MDBK). La importancia de la determinación del efecto tóxico de la **solución de superoxidación *in vitro*** y su poder inactivante de virus radica en la posibilidad de ser usada no sólo como un desinfectante más sino como un producto antiséptico que se pueda usar en tejidos vivos infectados con virus *in vitro* y

posiblemente *in vivo*. Por otro lado la industria farmacéutica requiere valorar productos nuevos que coadyuven en los programas de higiene y desinfección que sean totalmente inocuos y muy efectivos contra agentes infecciosos, razón por la cual, surge la necesidad de un desinfectante que cubra todos los requerimientos anteriores y que su efecto se basa en la superoxidación, capaz de establecer una desinfección de alto nivel (eliminar bacterias, esporas, virus y hongos), tanto en el lavado de heridas, equipos, instalaciones y todo aquello que pueda representar un riesgo para infecciones de virus VSRB, IBR, PI3, DVB y Rotavirus.

HIPÓTESIS

La **solución de superoxidación*** aplicada en las diluciones con solución salina de fosfatos, tendrán un efecto de inactivación en todas las diluciones *in vitro* de los virus de VSRB, IBR, PI3, DVB y Rotavirus, que afectan al ganado bovino.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las ventajas que podría tener el uso de las soluciones de superoxidación aplicadas para el control y eliminación de agentes virales como VSRB, IBR, DVB, PI3, Rotavirus que infectan a los bovinos y el efecto tóxico que tiene esta solución en los cultivos celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron diluciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 y 1/200 de la **solución de superoxidación*** en solución salina de fosfatos (PBS pH 7.2), con un volumen final de 1 ml en placas de 24 pozos, se agregó el mismo volumen de uno de los virus en estudio según fuera el caso (IBR, PI3, DVB, VSRB y Rotavirus).

El método beta de la prueba de neutralización viral descrita por Cunningham^{37, 38, 39}, se utilizó para la realización del experimento. El cual consiste en añadir virus constante (título de 10^4 DICCC50%/dosis) y **solución de superoxidación*** diluida al sistema hospedador (cultivo celular MDBK)^{40, 41, 42}. Por lo tanto la dilución del desinfectante que neutralizará el virus en un 100%, determinará el índice de neutralización del desinfectante expresada en dosis infectante cultivo celular (DICC).

Posteriormente las placas de 24 pozos que contienen la mezcla virus- **solución de superoxidación*** se incubaron a una temperatura de 2 a 7 °C durante 30 minutos. Después de la incubación se inocularon 4 placas de 96 pozos por cada virus de cultivos de células MDBK con las diluciones de la mezcla virus- **solución de superoxidación***. Por cada placa se inocularon 5 pozos de cada dilución con 100 microlitros cada uno (filas A, B, C, D y E). La fila F de la placa contiene el control de la **solución de superoxidación*** diluida en PBS más las células MDBK sembradas. En la fila G y H está el control de células MDBK. Simultáneamente se inocularon microplacas con las mismas diluciones con PBS como control de virus y la titulación del mismo.

La interpretación de los resultados fué:

- Positivos aquellos cultivos que no presenten efecto citopatogénico (ECP) del virus en el sistema huésped (cultivo celular MDBK).
- Negativo cuando en la dilución de la mezcla virus- **solución de superoxidación*** se observe el ECP similar a los cultivos de células inoculadas con la mezcla de virus-PBS.

Aquellos cultivos inoculados en donde no se observó ECP, fueron indicativo de su inactivación por el desinfectante.

Los cultivos inoculados con la mezcla virus-PBS presentaron ECP y en el caso de Rotavirus se observó la presencia del virus.

Las placas fueron fijadas con colorante cristal violeta para su lectura por medio del método de Reed y Muench, el cual determinará el índice de neutralización viral.

Para evidenciar la presencia del virus en las placas de 96 pozos con la mezcla virus- **solución de superoxidación***, se utilizó la prueba de inmunofluoresencia directa para IBR y DVB y ELISA indirecta para VSRB, PI3 y Rotavirus.

Se determinó la prueba estadística de análisis bilateral de la variancia por jerarquías de Friedman de cada virus ⁴³.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

RESULTADOS

Se realizaron 5 réplicas de cada dilución por microplaca (4 microplacas por virus), dando un total de 600 pozos en estudio. En donde se observó ECP en las diluciones 1/100 y 1/200 de los virus IBR, DVB y VSRB. En el caso del virus PI3, el ECP se presentó en las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200. Mientras que para el Rotavirus la presencia del virus se observó a partir de la dilución 1/100. En las diluciones donde existe más concentración de la **solución de superoxidación***, no se observó ECP, es decir, son negativos a la presencia del virus. Así mismo en los grupos control de **solución de superoxidación*** no se observó efecto tóxico en el cultivo celular MDBK. El grupo control positivo, formado por cultivos inoculados con los virus en estudio, se observó el ECP confirmando la presencia del virus y obteniendo el título original de trabajo, (10^4 DICC50%/dosis) el grupo control negativo donde sólo contenía células, no se observó ECP o presencia de virus durante el tiempo que duró el ensayo.

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Para la obtención de los resultados se utilizó el Análisis Bilateral de la Varianza por Jerarquías de Friedman, (Estadística no paramétrica y de libre distribución).

IBR. 4 microplacas de 96 pozos en estudio en las cuales se observó ECP en las diluciones 1/100 y 1/200, donde hay una diferencia en la media de rangos de 1.88 y 1.12, es decir, el valor de las réplicas es homogéneo en las diluciones 1/5 hasta 1/50 con una probabilidad de .001 positivo a la presencia del virus. Por lo tanto la **solución de superoxidación*** neutralizó el virus con un título de 10^4 DICC50%/dosis hasta la dilución 1/50.

Diluciones	Media de Rangos	N (muestra)	4
Cinco	4.50	χ^2	19.848
Diez	4.50	Grados de libertad	5

Veinte	4.50	p (probabilidad)	.001
Cincuenta	4.50		
Cien	1.88		
Doscientos	1.12		

DVB. 4 microplacas de 96 pozos en estudio en las cuales se observó ECP en las diluciones 1/100 y 1/200, donde hay una diferencia en la media de rangos de 2.00 y 1.00, es decir, el valor de las réplicas es homogéneo en las diluciones 1/5 hasta 1/50 con una probabilidad de .001 positivo a la presencia del virus. Por lo tanto la **solución de superoxidación*** neutralizó el virus con un título de 10^4 DICC50%/dosis hasta la dilución 1/50.

Diluciones	Media de Rangos	N (muestra)	4
Cinco	4.50	χ^2	20.000
Diez	4.50	Grados de libertad	5
Veinte	4.50	p (probabilidad)	.001
Cincuenta	4.50		
Cien	2.00		
Doscientos	1.00		

VSRB. 4 microplacas de 96 pozos en estudio en las cuales se observó ECP en las diluciones 1/100 y 1/200, donde hay una diferencia en la media de rangos de 1.75 y 1.25, es decir, el valor de las réplicas es homogéneo en las diluciones 1/5 hasta 1/50 con una probabilidad de .001 positivo a la presencia del virus. Por lo tanto la **solución de superoxidación*** neutralizó el virus con un título de 10^4 DICC50%/dosis hasta la dilución 1/50.

Diluciones	Media de Rangos	N (muestra)	4
Cinco	4.50	χ^2	19.796
Diez	4.50	Grados de libertad	5
Veinte	4.50	p (probabilidad)	.001
Cincuenta	4.50		
Cien	1.75		
Doscientos	1.25		

ROTAVIRUS. 4 microplacas de 96 pozos en estudio en las cuales se observó la presencia del virus en las diluciones 1/100 y 1/200, donde hay una diferencia en la media de rangos de 1.88 y 1.12, es decir, el valor de las réplicas es homogéneo en las diluciones 1/5 hasta 1/50 con una probabilidad de .001 positivo a la

presencia del virus. Por lo tanto la **solución de superoxidación*** neutralizó el virus con un título de 10^4 DICC50%/dosis hasta la dilución 1/50.

Diluciones	Media de Rangos	N (muestra)	4
Cinco	4.50	χ^2	19.848
Diez	4.50	Grados de libertad	5
Veinte	4.50	p (probabilidad)	.001
Cincuenta	4.50		
Cien	1.88		
Doscientos	1.12		

PI3. 4 microplacas de 96 pozos en estudio en las cuales se observó ECP en las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200, donde hay una diferencia en la media de rangos de 3.00, 1.50 y 1.50 en dichas diluciones, es decir, el valor de las réplicas es homogéneo en las diluciones 1/5 hasta 1/20 con una probabilidad de .001 positivo a la presencia del virus. Por lo tanto la **solución de superoxidación*** neutralizó el virus con un título de 10^4 DICC50%/dosis hasta la dilución 1/20, aun así en comparación con los cuatro virus anteriores los tratamientos cumplen con la hipótesis nula (H_0).

Diluciones	Media de Rangos	N (muestra)	4
Cinco	5.00	χ^2	20.000
Diez	5.00	Grados de libertad	5
Veinte	5.00	p (probabilidad)	.001
Cincuenta	3.00		
Cien	1.50		
Doscientos	1.50		

H_0 =Todos los tratamientos tienen efectos idénticos.

El valor de χ^2 es un valor muy grande en los cinco virus cuando la hipótesis nula es verdadera, con una $p=.001$ menor que $\alpha=.05$, por lo cual la H_0 se rechaza.

Por lo tanto los parámetros indican que hay una diferencia significativa en cada uno de los virus.

DISCUSIÓN

Con base a las normas NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos Generales de Análisis-Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas y las emitidas por *la Association Francaise de Normalisation (AFNOR) NFT 72-150* (Norma Francaise- Détermination de l'activeté bactericide) ¹⁰, que establece el método de dilución- neutralización como prueba para determinar el efecto bactericida y la NFT 72-180 (Norma Francaise- Détermination de l'activeté virucide vis-á-vis des virus vertébrés) ¹¹, que establece la actividad viricida de los antisépticos y desinfectantes, se determinó en el presente trabajo como la **solución de superoxidación*** es capaz de inactivar los virus: IBR, VSRB, DVB y Rotavirus, cuando se utiliza concentrado y hasta la dilución 1/50, debido a que en el ensayo se observó que los cultivos celulares inoculados con los agentes virales, privamente tratados con la **solución de superoxidación*** los inactivó, de tal manera que los cultivos permanecieron sin ECP y sin presencia de virus en el caso de Rotavirus, a partir de la dilucion 1/100. Se observó ECP para IBR, VSRB, PI3 y DVB. El efecto observado y la presencia del virus en las células es compatible con el daño que causan los virus en estudio en el sistema huésped y fueron corroborados mediante las técnicas de inmunofluorescencia directa para IBR y DVB, ELISA indirecta para VSRB, PI3 y Rotavirus y todas las microplacas fueron fijadas con la tinción de cristal violeta para ser observadas. Sin embargo, en el caso de PI3 la **solución de superoxidación*** sólo es capaz de inactivarlo en una dilución 1/20, ya que a partir de la dilución 1/50, se observa ECP. El porqué este virus requiere mayor concentración de la **solución de superoxidación*** en

cuestión, puede deberse a ciertos componentes externos presentes en el virus como son mucoproteínas y lipoproteínas que envuelven los ligandos del virus para la célula huésped, tal vez este sea uno de los factores que lo hace más resistente. Cabe señalar que en este ensayo se trató de estandarizar la cantidad de virus inoculado (10^4 DICC50%/dosis). Al trabajar con la **solución de superoxidación*** más la mezcla de virus, se observó también que en las concentraciones utilizadas el desinfectante fue capaz de inhibir la posible contaminación bacteriana, esto en base a que en los diferentes ensayos no se utilizó ningún inhibidor de bacterias, hongos y levaduras que generalmente se usan en la manipulación del cultivo celular.

Este estudio revela también que la **solución de superoxidación*** en forma concentrada no es tóxica para los cultivos celulares. Estos generalmente son muy sensibles a cualquier contaminante que puede causarle efecto tóxico y la muerte a las células. Al tratar de explicar cómo es que la **solución de superoxidación*** no causa efecto tóxico en las células, es probable que se deba a su mecanismo de acción denominado ozonólisis en donde el ozono (O_3) se rompe en presencia de un agente oxidante como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), matando a los agentes infecciosos por medio de la ruptura en la membrana celular¹⁸. Este mecanismo es utilizado por los macrófagos en el proceso de fagocitosis dependiente de oxígeno, por lo tanto, puede ser que este mecanismo es el que permite que las células eucarióticas permanezcan sin presentar ningún tipo de alteración celular. Este ozónido tiene un alto potencial de oxidación, es inestable y ejerce su propia acción de desinfección atacando enzimas, grupos sulfhidrilo o aldehídos, liberando

compuestos peroxiles, que son también desinfectantes, todo esto conduce a la dispersión del citoplasma y por consiguiente a la muerte del microorganismo. La acción viricida del ozono (O_3) oxida la cubierta lipídica destruyéndola, así se modifica su estructura impidiendo la unión a su receptor. ²⁰.

Esta investigación se realizó con los virus que forman parte del complejo respiratorio y abortivo que afecta a los bovinos en nuestro país. Sólo DVB genera importantes pérdidas económicas, impidiendo que los hatos sean libres de esta enfermedad, debido a la presencia de animales inmunotolerantes que representan el foco de infección para todo el hato. Por ello es importante contar con sustancias que coadyuven en el control del agente etiológico.

Las **soluciones de superoxidación*** pueden ser una alternativa en base a lo observado en esta investigación para su posible utilización en animales infectados, para esto se hace necesario continuar las investigaciones para determinar su uso tópico o parenteral, en base a que no causa efecto tóxico en las células y es eficaz para destruir virus. Este trabajo de investigación da la pauta para usar las **soluciones de superoxidación*** hasta una dilución 1/50.

CONCLUSIONES

1. La **solución de superoxidación*** es capaz de neutralizar los virus *in vitro* con un título de 10^4 DICC50%/dosis, hasta una dilución 1/50, excepto PI3 que se neutraliza hasta la dilución 1/20.
2. Se comprobó la presencia de los virus en estudio por medio de las pruebas de inmunofluorescencia directa para IBR y DVB, ELISA indirecta para VSRB, PI3 y Rotavirus y todas las placas en estudio fueron fijadas con la tinción de cristal violeta para ser observadas.
3. La **solución de superoxidación*** no causa efecto tóxico en las células empleadas.
4. Hace falta realizar investigaciones sobre el uso de las **soluciones de superoxidación*** *in vivo* en el laboratorio, en campo, equipo y animales enfermos.

REFERENCIAS



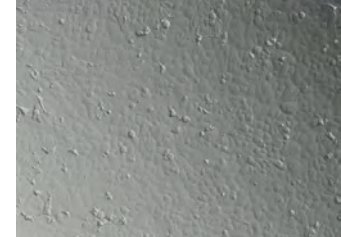




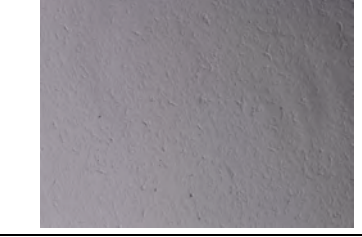
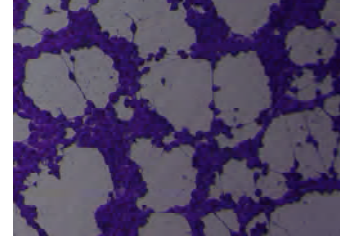
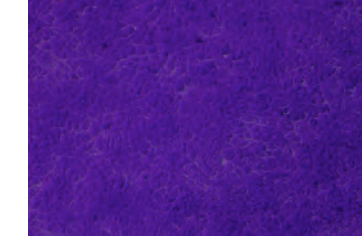
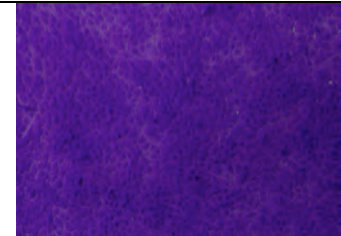
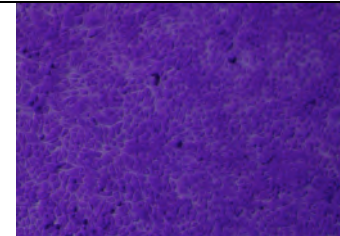
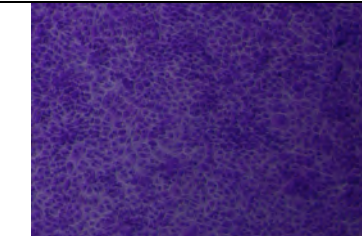
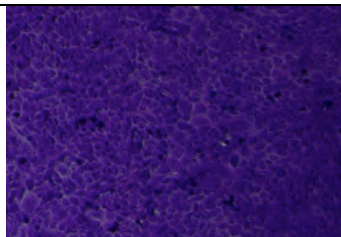
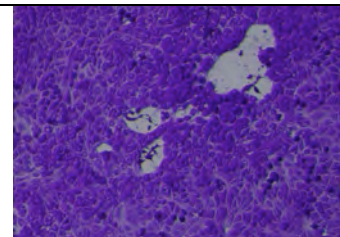
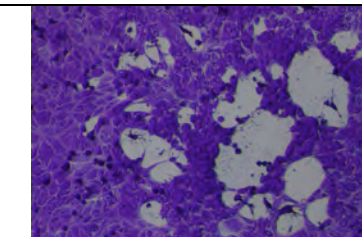
1. Andrews C. H. Historia natural de los virus. Buenos Aires: Centro Editor. 1969: 55, 103, 229, 243,329.
2. Hugo WB. Historical introduction En: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Desinfection, preservation and sterilization. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 1999: 1-4.
3. Cremieux A, Freney J, Davin-Regli A. Methods of testing desinfectants. En: Block SS (ed) Desinfection, Sterilization and Preservation. 5th ed. Philadelphia: Lippinco Williams and Wilkins, 2001: 1305-1327.
4. Food and Drug Administration and Environmental Protection Agency. Memorandum of understanding between the Food and Drug Administration. Public Health Service, Department of Health and Human Service and Environmental Protection Agency: notice regarding matters of mutual responsibility-regulation of liquid chemical germicides intended for use on medical devices. 1993. Disponible on- line: ftp://fedbbs.access.gpo.gov/gpo_bbs/epafrc/epa_fda.asc.
5. Food and Drug Administration. Interim measures for the registration of antimicrobial products/ liquid chemical germicides with medical device use claims under the memorandum of understanding between FDA and EPA. CDRH facts and demand, self No. 851, pág. 14. Disponible on- line: <http://www.fda.gov>.
6. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health, Infection Control Devices Branch, Division of Dental, Infection Control and General Hospital Devices, Office of Device Evaluation (2000). Guidance for Industry and FDA Reviewers.
7. Sattar SA and Springthorpe VS. Methods under development for evaluating the antimicrobial activity of chemical germicides in health care. Cincinnati: Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. 1994: 237-254.
8. Chemical desinfectants and antiseptics- basic bactericidal activity- test method and requirements. European Committee for Standardization (CEN), 1997.
9. Métodos Generales de Análisis- Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas, Secretaría de Economía. Diario Oficial de la Federación. NMX-BB-040-SCFI (11/03/1999).
10. Norma AFNOR/NFT 72-150. Antisépticos y desinfectantes utilizados en estados líquidos miscibles en agua y neutralizables. Determinación de la

- actividad bactericida (método por dilución- neutralización), Paris, Francia. 1981.
11. Norma AFNOR/NFT 72-180. Antisépticos y desinfectantes utilizados en estados líquidos miscibles en agua y neutralizables. Determinación de la actividad viricida. Paris, Francia. Diciembre, 1989.
 12. R. Cruickhank., Duguid, J.P: The practice Medical Microbiology. Twelfth edition. Volume two. Sumano, Ocampo.: Desinfección en Medicina Veterinaria, Vrot, México DF, 2001.
 13. Babb J. R. & Bradley C. R. A Review of Glutaraldehyde Alternatives. British Journal of Theatre Nursing. 1995; 5 (7): 20-24.
 14. Tanaka H., Hirakata Y., Kaku M., Yoshida R., Takemura H., Mizukane R., Ishida K., Tomono K., Koga H., Kohno S. & Kamihira S. Antimicrobial activity of superoxide water. Journal of Hospital Infection. 1996; 34: 43-49.
 15. Paéz ED y Salgado HEG. El uso de las soluciones de superoxidación como alternativa en el control de las mastitis en vacas en producción. Memorias de XXX Congreso Nacional de Buiatría; 2006 agosto 10-12; Acapulco (Guerrero) México.
 16. Sosa OL., Torres TJF., Garita ME., González CV., García LJC. Prótesis faciales retenidas con implantes e imanes: Presentación de tres casos clínicos en pacientes oncológicos. Cancerología. 2008; 3: 71-76.
 17. Landa- Solis C., González- Espinoza D., Guzmán- Soriano B., Snyder M., Reyes- Terán G., Torres K. & Gutierrez A.A. Microcyn: a novel super-oxide water with neutral pH and disinfectant activity. Journal of Hospital Infection. 2005; XX: 1-9.
 18. Yurkanis B.P. Química Orgánica. 5ª ed. México: Pearson Educación. 2008: 908-926.
 19. DeMers L.D. Ozone System Energy Optimization Handbook. AWWA. Research Foundation. 1996.
 20. Rakness K.L. Ozone System Fundamentals for Drinking Water. J. Amer. Water Assoc. 2 (7), 1996.
 21. Janeway C.A., Travers P., Walport M. y Capra J.D. Inmunobiología. España: Masson, 2000: 333-335.









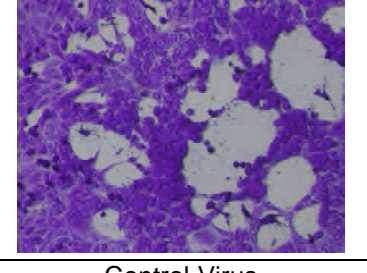
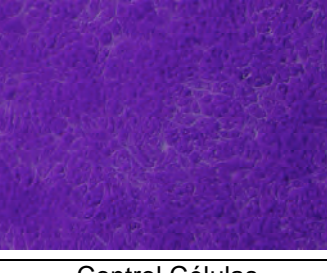
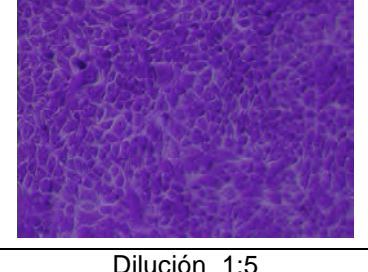
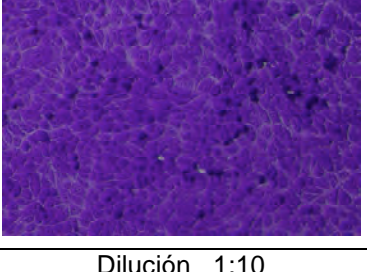
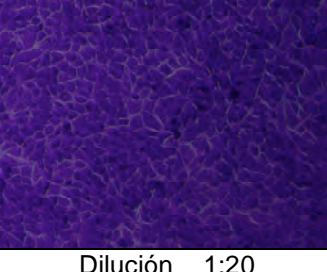
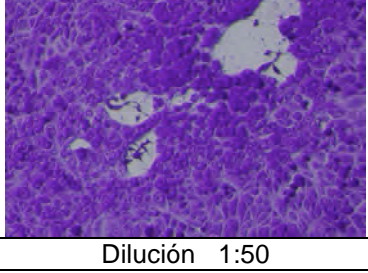
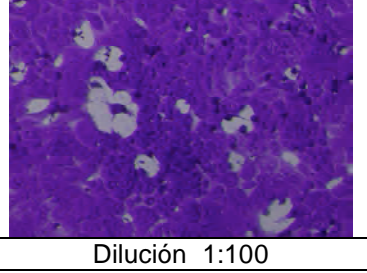
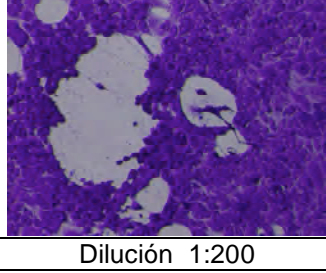
22. Inmunidad Innata (no-especifica). The Board of Trustees of the University of South Carolina. 2006. Traducido por: Dr. Fernando Enríquez-Rincón. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
23. Rojas E.O. y Arce P.P. Fagocitosis mecanismos y consecuencias. *Bioquímica*. 2003; 4 (28): 19-28.
24. Doll K., Moening V. En: Dirksen G., Gründer H. and Stöber M., editores. *Medicina interna y cirugía del bovino*. 4ª ed. Argentina: Inter-médica. 2003: 289-291, 521-528.
25. Cano C. P., Lastra E. M., García D. C., Ramírez L. S., Retana R. A., Monroy L. F. Diagnóstico integral de las principales enfermedades de los bovinos de la zona norte de Chiapas. Fundación Produce Chiapas a. c. UNAM. 2009: 4-22.
26. Ridpath, JF, Neil, JD, Frey M, Landgraf JG. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 VDVb from North America. *Veterinary Microbiology*. 77: 145-155, 2000.
27. Ernst Peterhans, Thomas W. Jungi, Matthias Schweizer. VDVb and innate immunity. *The International Association for Biologicals*. 2003, 31: 107-111.
28. Baker JC: The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infections. *Vet Clin North Am*. 11 (3): 425-446, 1995.
29. Guy H. Loneragan, BVSc, PhD: VDVb Impact on Feedlot Mortality and Morbidity. *The AABP Proceedings Vol. 36*: 52-54, Sept. 2003
30. Virus & Prion Diseases of livestock Research Unit, Ames Iowa. *Detection and Control of Bovine Viral Diarrhea Viruses (VDVB)*, 2002.
31. Houe, Hans Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (VDVB) infections. *Veterinary Microbiology*. 64: 89-107, 1999.
32. Cherry BR, Reeves MJ, Smith G. Evaluation of bovine viral diarrhea virus control using a mathematical model of infection dynamics. *Preventive Veterinary Medicine*. 33: 91-108, 1998.
33. Rebhun W. C. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. España: Acribia. 1995: 105-112, 212-215.
34. Dominguez OJ. *El Complejo Respiratorio-Reproductivo daña la rentabilidad de los hatos*. Cebú Editorial México 2000: 26.

35. Bagnis G. Jornada sobre enfermedades emergentes en bovino. F.A.V. UNRC, Río Cuarto. 2000.
36. Radostis OM. Medicina Veterinaria. Mc Graw Hill. 9na Edición. Volumen 2. Madrid España. 1999. 1375-1383.
37. Cunningham, C. Virología práctica. Zaragoza España: Ed. Acribia. 1971
38. Granados P. R. y Villaverde P. M. Virología Características y Técnicas Bioquímicas. España: Thompson Paraninfo. 2002: 127-130.
39. Marín D. J.C., Navarro P. N. F. y Santos A. N. Evaluación del método dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la norma técnica colombiana 5473 de 2007. (tesis de maestría). Bogotá, D. C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2008.
40. Murray and Patrick. Manual of Clinical microbiology. Sexta edición. Press Washington, D.C.1995: 207.
41. Fusenig N. E. Mammalian epidermal cells in culture. En Biology of the ingument. Edit. Bereiter, Matolsky A. G. y Richards K. S. E.U.A.: Springer-Verlag. 1986: 409- 411.
42. Duran R., Valle A., Viña X. y Mijica B. Importancia biológica en la multiplicación de las líneas celulares estables III: Tipos y Líneas. Revista CENIAP. 2005.
43. Daniel W.W. Bioestadística. 4ª ed. México: Limusa Wiley, 2010: 701-706.
44. The ICTVdB was developed by Cornelia Büchen-Osmond, Australian National University and Columbia University. New York, USA: 2002 (updated 2010 Jul 20; cited 2010 agu 3). Aviable from: <http://www.ictvdb.org/index.htm>

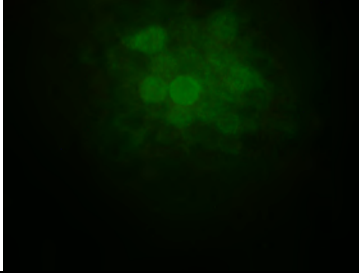
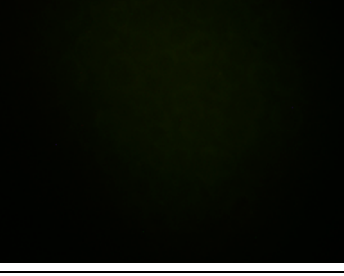

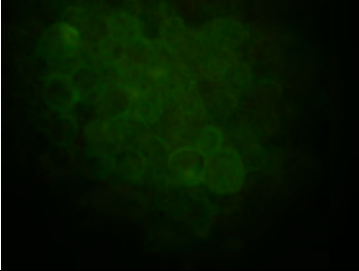
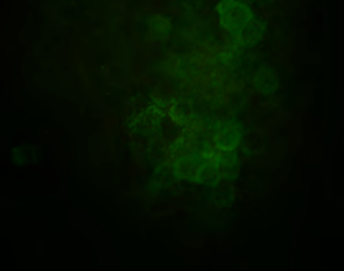
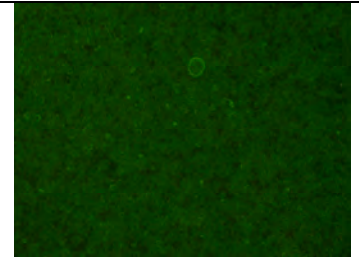
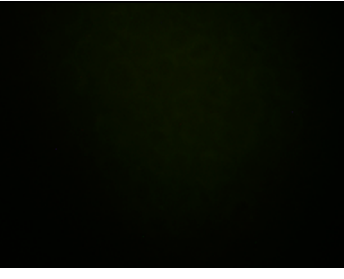

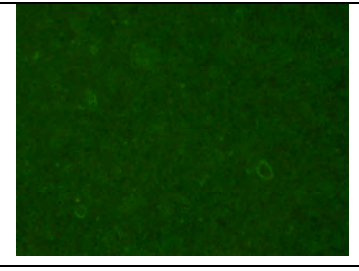

FIGURAS

<p>NEUTRALIZACIÓN VIRAL IBR, DVB y VSRB.</p> <p>Se observa el ECP en las diluciones 1:100 y 1:200.</p>		
	<p>Control Virus</p>	<p>Control Células</p>
		
<p>Dilución 1:5</p>	<p>Dilución 1:10</p>	<p>Dilución 1:20</p>
		
<p>Dilución 1:50</p>	<p>Dilución 1:100</p>	<p>Dilución 1:200</p>
<p>NEUTRALIZACIÓN VIRAL (colorante cristal violeta)</p> <p>IBR, DVB y VSRB.</p> <p>Se observa el ECP en las diluciones 1:100 y 1:200.</p>		
	<p>Control Virus</p>	<p>Control Células</p>
		
<p>Dilución 1:5</p>	<p>Dilución 1:10</p>	<p>Dilución 1:20</p>
		
<p>Dilución 1:50</p>	<p>Dilución 1:100</p>	<p>Dilución 1:200</p>


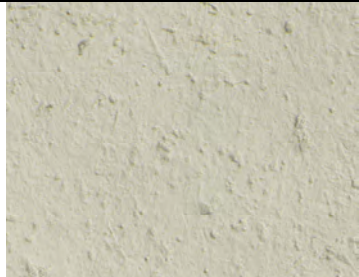


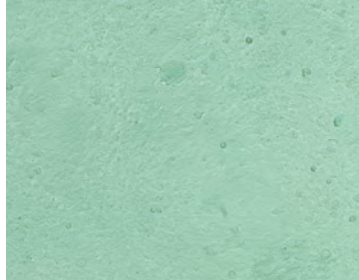
FIGURAS

<p style="text-align: center;">NEUTRALIZACIÓN VIRAL PI3</p> <p>Se observa el ECP en las diluciones 1:50, 1:100 y 1:200.</p>		
	Control Virus	Control Células
		
Dilución 1:5	Dilución 1:10	Dilución 1:20
		
Dilución 1:50	Dilución 1:100	Dilución 1:200
<p style="text-align: center;">NEUTRALIZACIÓN VIRAL (colorante cristal violeta) PI3</p> <p>Se observa el ECP en las diluciones 1:50, 1:100 y 1:200.</p>		
	Control Virus	Control Células
		
Dilución 1:5	Dilución 1:10	Dilución 1:20
		
Dilución 1:50	Dilución 1:100	Dilución 1:200

FIGURAS

<p>INMUNOFLUORESCENCIA</p> <p>IBR</p> <p>Se observa la presencia de virus en las diluciones 1:100 y 1:200.</p>		
	<p>Control Virus</p>	<p>Control Células</p>
		
<p>Dilución 1:50</p>	<p>Dilución 1:100</p>	<p>Dilución 1:200</p>
<p>INMUNOFLUORESCENCIA</p> <p>DVB</p> <p>Se observa la presencia de virus en las diluciones 1:100 y 1:200.</p>		
	<p>Control Virus</p>	<p>Control Células</p>
		
<p>Dilución 1:50</p>	<p>Dilución 1:100</p>	<p>Dilución 1:200</p>

FIGURAS

ELISA ROTAVIRUS		
	Control Virus	Control Células
		
Dilución 1:50	Dilución 1:100	Dilución 1:200

En las diluciones 1:5, 1:10, 1:20 y 1:50 no se observa la presencia de virus, es por ello que se omiten (1:5, 1:10 y 1:20). La coloración azul representa la presencia del virus en las diluciones 1:100 y 1:200 como indica el control de virus.