

ARTÍCULO ORIGINAL

Estabilidad de coronavirus y virus herpes simplex tipo 1 en barbijos y batas quirúrgicas que componen el EPP

Coronavirus and Herpes simplex virus type 1 stability in surgical masks and gowns

Ayala-Peña, Victoria Belen^{1,2*}; Scolaro, Luis Alberto²; Alvarez, Vera Alejandra³; Lassalle, Verónica Leticia⁴

¹INIBIBB, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET. Bahía Blanca, Argentina.

²Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica – IQUIBICEN-

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

³INTEMA, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata-CONICET. Mar del Plata, Argentina.

⁴INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-

CONICET. Bahía Blanca, Argentina.

*Contacto: Victoria Belen, Ayala-Peña. INIBIBB, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-CONICET, camino la Carrindanga Km7, Bahía Blanca 8000, Buenos Aires, Argentina; vayala@criba.edu.ar

Resumen Introducción: Durante la actual pandemia de COVID-19 han surgido muchas controversias e interrogantes respecto de la persistencia de la actividad viral en distintas superficies. Para el área de salud, ha sido un gran desafío lograr optimizar los usos de equipos de protección personal (EPP), teniendo en cuenta la incertidumbre acerca de la estabilidad de las partículas virales sobre distintas superficies. Objetivos: Analizar la estabilidad viral en barbijos quirúrgicos y batas descartables. Materiales y métodos: Se emplearon barbijos quirúrgicos tricapa comerciales y batas aprobados por ANMAT a los cuales se los inoculó artificialmente con cantidades definidas de virus *herpes simplex tipo 1* (HSV-1) y de coronavirus bovino (BCoV) en condiciones ambientales estrictamente establecidas, o se los expuso a pacientes COVID positivos para luego evaluar la infectividad viral residual o remanente mediante la técnica de UFP (unidad formadora de placa) y por la aparición de ECP (efecto citopático) en cultivos celulares infectados con el virus residual. Resultados: El tiempo de inactivación fue dependiente de la dosis infectiva inicial; para las dosis máximas estudiadas, los virus inoculados artificialmente permanecen viables hasta 72 horas, sin embargo, en la bata expuesta a pacientes COVID positivo, no se pudo recuperar la actividad viral luego de las 16 horas. Conclusiones: El tiempo de inactivación viral depende de la dosis infectiva inicial bajo las mismas condiciones ambientales. Mientras más alta es la dosis infectiva, más tiempo tardará en inactivarse el inóculo. Con dosis superiores a las esperadas naturalmente, el tiempo de inactivación de la actividad viral es de 72 horas.

Palabras clave: infectividad viral, coronavirus, inactivación, barbijo, bata.

Abstract

Introduction. During the current COVID-19 pandemic, many controversies and questions have arisen regarding the persistence of viral activity on different surfaces. In particular, for the health area, it has been a great challenge to optimize the uses of the personal protective equipment, even more so taking into account the uncertainty about the stability of viral particles on different surfaces. Objectives. To analyze viral stability in surgical masks and disposable gowns. Materials and methods. Commercial three-layer surgical masks and gowns approved by the Argentine Agency of Medicines, Food and Medical Technology (ANMAT) were artificially inoculated with defined amounts of herpes simplex virus type I (HSV-1) and bovine coronavirus (BCoV) under strictly established environmental conditions, or exposed to COVID-positive patients. Then, residual or remnant viral infectivity was evaluated using the PFU technique and by the appearance of cytopathic effects in cell cultures infected with residual virus. Results. The inactivation time was dependent on the initial infective dose. For the maximum doses studied, the artificially inoculated viruses remained viable for up to 72 hours. However, in the gowns exposed to COVID-positive patients, no viral activity was recovered after 4 h. Conclusions. Under the same environmental conditions, the viral inactivation time depends on the initial infective dose. The higher the infective dose, the longer it will take for the inoculum to become inactivated. With doses higher than those naturally expected, the inactivation time of viral activity is 72 hours.

Keywords: viral infectivity, coronavirus, surgical masks, gown.

Introducción

La forma de transmisión de los virus respiratorios y, en particular, de los coronavirus, involucra gotas respiratorias microscópicas, que son expulsadas cuando las personas infectadas estornudan, tosen, hablan, etc.^{1,2,3} Se ha observado que las gotas grandes son demasiado pesadas para permanecer en el aire y, eventualmente, caen contaminando las superficies sobre las que se depositan.⁴ El virus se propaga así, a través del “contacto indirecto”, cuando un individuo toca la superficie contaminada. A su vez, quienes se encuentren infectados también pueden contaminar con sus manos, al tocar una superficie, barandillas públicas, manijas y otras superficies de alto contacto, blancos comunes a este modo de evento. A partir de entonces, si esa superficie es tocada por un individuo sano puede producirse la autoinoculación de las membranas mucosas o transferencias superficiales en serie⁵.

Por ello, es importante el uso de EPP para la atención de pacientes infectados. El número de barbijos requeridos para responder a la pandemia de COVID-19 en las áreas de salud, según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es de 89 millones por mes.⁶ Estos datos son recopilados teniendo en cuenta que el personal de salud debe cambiar rigurosamente el barbijo entre paciente y paciente. Tal demanda ha ocasionado un aumento inédito en la producción mundial de mascarillas poliméricas (como barbijos quirúrgicos descartables) y se han sobrepasado los presupuestos sanitarios. Además, los elementos que se descartan constantemente generan grandes cantidades de desechos en el área de salud. Por ello hemos puesto el foco de nuestra investigación en evaluar la posibilidad de reutilización que podrían tener los EPP, particularmente, las máscaras y/o batas.

En este trabajo, hemos investigado el tiempo que perdura la infectividad de virus como contaminantes de barbijos quirúrgicos y batas. Con estos datos, podremos estimar a partir de qué momento estos elementos podrían ser reutilizados, sin necesidad de aplicar procesos descontaminantes como el calor, que dañarían su material de fabricación, o sin aplicar sustancias químicas que encarecerían los costos o podrían agregar residuos tóxicos en los mismos.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se utilizaron células Vero (*African green monkey kidney*) [ATCC, CCL-81] y células de adenocarcinoma colorrectal [HRT-18: ATCC, CCL-244]. Ambos tipos celulares crecieron en *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM, GIBCO) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (Internegocios, Mercedes, Argentina) y fueron cultivados a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire con 5 % CO₂. Para el mantenimiento de las células Vero, la concentración del suero fue reducida a 1,5 %.⁷

Stock viral

El virus *herpes simplex tipo 1* (HSV-1) cepa KOS fue propagado por infección en células Vero. Las células fueron infectadas e incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂. El virus *betacoronavirus bovino* (BCoV) cepa Mebus fue propagado en células HRT-18 con adición de 0,05 % de tripsina al medio de cultivo. BCoV fue gentilmente donado por la Dra. Viviana Parreño del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

La infectividad viral fue determinada por titulación en células confluentes con la técnica de plaqueo viral y los valores fueron expresados en UFP (unidades formadoras de placas).⁷

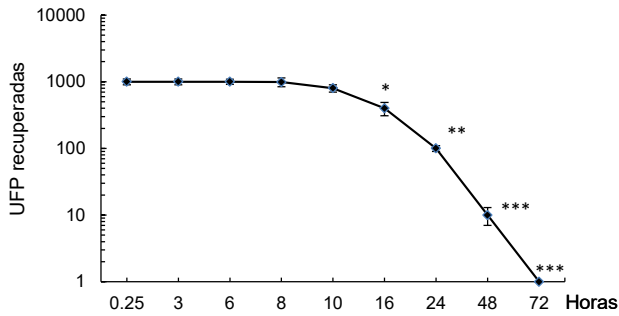
Superficies estudiadas

Se utilizaron batas y barbijos quirúrgicos, componentes de los equipos de protección del personal de salud. Los barbijos usados en este trabajo eran comerciales, de tres capas y aprobados por la ANMAT. La capa media interna de *meltblown* (filtro de polipropileno de 25 gramos producido por proceso *meltblown*) está protegida en ambas caras por un textil no tejido, unido, *spunbond*, (tela de polipropileno de 18 y 25 gramos producida por proceso *spunbonding*). También se utilizaron camisolines-batas descartables (de *spunbond* de 45 gr) aprobadas por ANMAT, provistos por el personal de salud de un centro sanitario de atención para COVID-19 (Centro de salud Norte, Bahía Blanca, Argentina), que habían sido expuestos a, por lo menos, dos pacientes COVID-19 positivos cada una. Luego de 16 horas de su uso, sobre distintas zonas frontales de estas batas, se analizó mediante dos técnicas de recolección diferentes la presencia de infectividad viral. Una de las técnicas consistió en recortar trozos de 1cm² y sumergirlos en DMEM realizando lavados, como se había hecho en el caso de los barbijos. La otra técnica se llevó a cabo mediante hisopados, simulando el acto de tocar con la mano una superficie infectada.⁸

Infecciones virales

La metodología que se siguió se adaptó del protocolo descrito en Warnes y colaboradores.⁹ Se utilizaron células Vero para las titulaciones. Las superficies de batas o barbijos fueron inoculadas con una gota por cm² de suspensiones del virus (1 gota= 20 microlitros, que contienen, aproximadamente, 1000 UFP de virus u otras dosis indicadas) a 21 °C y 40 % de humedad. Luego de los diferentes intervalos de tiempo, se recuperaron los virus lavándolos con medio de cultivo (DMEM). Posteriormente, se realizaron diluciones con DMEM 1,5 % SFB y titulaciones mediante el ensayo de formación de placas en células Vero (UFP), como Morens y colaboradores.¹⁰ Para algunos ensayos, se implementaron hisopos con torunda de nylon a fin de recolectar virus de las superficies estudiadas en lugar de implementar lavados. Algunos cultivos se destinaron al contacto con el DMEM con el que se realizaron los lavados de las superficies expuestas a virus y, a determinados tiempos, se observó bajo microscopio invertido el ECP (efecto citopático), producto de la actividad viral.

Figura 1. Curva de decaimiento de la infectividad viral del virus HSV-1 respecto del tiempo.



► Las barras de error representan el promedio \pm SD, y los datos son el resultado de tres experimentos individuales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Análisis estadístico

Se utilizó el software *GraphPad Prism* versión 7 u 8 para el análisis estadístico. Los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos, con tres o cuatro platos para cada condición \pm SEM, si no se indicalo contrario. La significación estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student de dos colas o mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey con $p < 0,05$ considerado significativo.

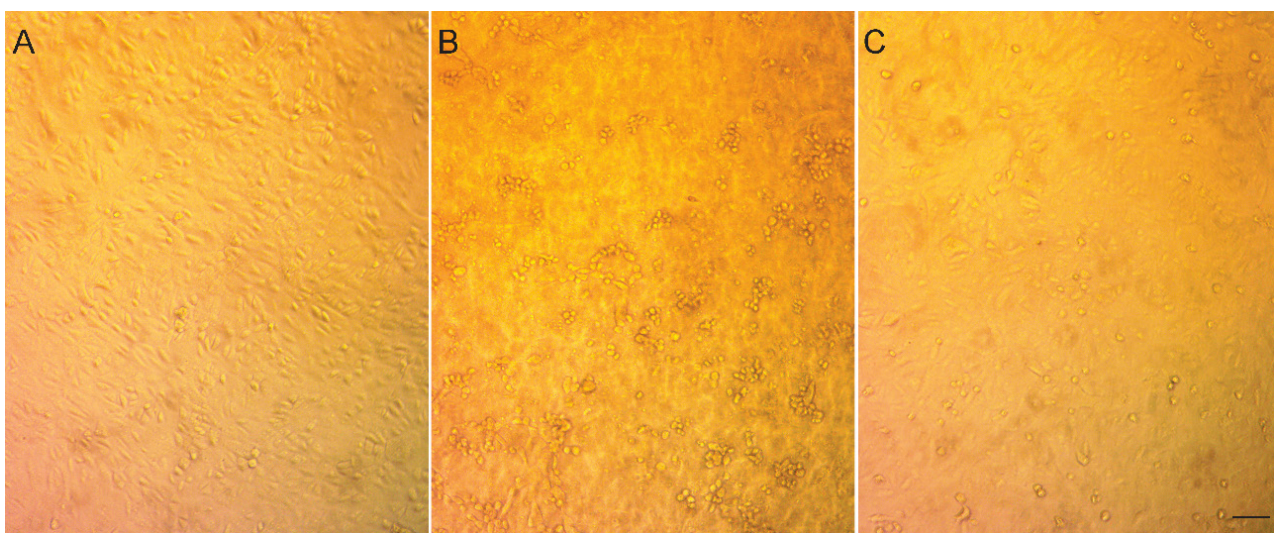
Resultados

Se realizó un estudio del decaimiento de la infectividad viral respecto del tiempo (Figura 1). Para ello se utilizó el virus humano HSV-1, el cual posee una envoltura compuesta de una membrana bicapa lipídica, al igual que otros virus envueltos como el SARS-CoV-2, a fin de obtener un conocimiento general del comportamiento de estos virus sobre barbijos quirúrgicos. A

partir de estudios realizados con HSV-1, puede inferirse que este virus podría ser tanto o más resistente que los distintos coronavirus.¹¹ Se utilizó una dosis de 1000 UFP/gota, según datos bibliográficos⁹. En este ensayo, se utilizaron como superficie de prueba barbijos quirúrgicos comerciales. Los rangos estudiados incluyeron tiempos desde 0,25 (15 minutos) a 72 horas. Se puede observar que, a medida que transcurre el tiempo, la infectividad viral va decayendo: al inicio de los ensayos este parámetro comienza a disminuir levemente para incrementarse luego, a partir de las 8-10 horas de contacto, hasta llegar al tiempo máximo estudiado de 72 horas. Nuestros resultados muestran que la infectividad de HSV-1 decae 3 logaritmos a las 72 horas de contacto con la superficie, lo que representa un 99,9% de inactivación bajo las condiciones ensayadas (Figura 1).

Posteriormente, estudiamos el comportamiento de HSV-1 y BCoV (coronavirus bovino, un *betacoronavirus*, al igual que SARS-CoV-2) en batas quirúrgicas descartables. Dado el alto nivel de seguridad biológica que requiere la manipulación de stocks virales de SARS-CoV-2, decidimos emplear el virus BCoV para los siguientes estudios. Como se puede ver en la tabla 1 y en la figura 2, las batas expuestas a una dosis de 1000 UFP/gota tanto con virus HSV-1 como con BCoV presentaron niveles de infectividad detectables durante 16 horas, los cuales resultaron indetectables a las 72 horas del contacto de los virus con las batas. Sin embargo, cuando la dosis inoculada en las batas fue de 100 UFP/gota, la infectividad viral resultó despreciable incluso a las 16 horas del ensayo. Por otro lado, se estudiaron batas de médicos de unidades sanitarias expuestas a pacientes COVID positivos. Luego de 16 h de exposición a estos pacientes, se evaluó la actividad viral recuperada por técnicas de lavado o de hisopado, como se detalla en "Materiales y métodos". Para ambos tipos de ensayos, la infectividad viral fue indetectable (Tabla1).

Figura 2. Efecto citopático observado en células Vero.



► A) Células expuestas a Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) de la bata sin infectar, a tiempo cero B) Células expuestas a DMEM de la bata infectada con 10^3 UFP de virus BCoV, luego de las 16 horas C) Células expuestas a DMEM de la bata infectada con 10^3 UFP de virus BCoV, luego de las 72 horas. Barra de escala: 30 μ m.

Tabla 1. Infectividad viral recuperada.

Bata expuesta a:	paciente COVID +		10 ³ UFP HSV-1	10 ² UFP HSV-1	10 ³ UFP BCoV
	(a)	(b)	(b)	(b)	(b)
UFP recuperadas 16 hs pos..	Ind	Ind	400±90	Ind	310±55
UFP recuperadas 72 hs pos.	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

► Infectividad viral recuperada a las 16 y 72 horas pos. (pos exposición), luego de exponer batas a pacientes COVID-19 positivo (segunda columna) o de manera artificial a distintas dosis de virus (tres últimas columnas). Las superficies fueron estudiadas por hisopado (a) o por lavado de la zona (b). Ind: indetectable.

Discusión

En este trabajo estudiamos la persistencia de la capacidad infectiva de HSV-1 y BCoV como agentes contaminantes de barbijos y batas quirúrgicas. Esta capacidad infectiva es lo que le permite al patógeno desarrollar su ciclo de multiplicación con la consiguiente producción de enfermedad. Es importante destacar que la evidencia de contaminación por ARN no corrobora la presencia de virus infeccioso, dado que la existencia sola de material genético no indica que el virus continúe siendo infectivo. Como se discutió en el trabajo de Atkinson y Petersen¹², la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es utilizada para detectar material genético, no discrimina entre virus infecciosos y no infecciosos, es decir, puede haber material genético sobre una superficie y, sin embargo haber perdido su capacidad infectiva. Por ello, en este trabajo no empleamos tal técnica para determinar el nivel de partículas infectivas y, por consiguiente, productoras de enfermedad. La mayoría de los trabajos sobre persistencia de coronavirus en superficies publicados hasta el presente determinan la cantidad de copias de coronavirus en los EPP¹³⁻¹⁵, sin embargo, como ya mencionamos, esto no necesariamente coincide con la actividad viral; incluso la infectividad puede estar por debajo de estos valores de copias virales.^{16,17}

Con el surgimiento de la pandemia, se han publicado varios trabajos que han intentado demostrar la persistencia de la infectividad viral de los coronavirus en distintas superficies, incluyendo los EPP. Sin embargo, muchos de ellos no han sido concluyentes o resultan controversiales. Por ejemplo, Kasloff realiza un estudio muy minucioso, sin embargo, no incluye en sus análisis las batas o barbijos quirúrgicos aquí estudiados⁸, cuando estos elementos son los que más se recambian y generan mayor número de desechos. Algunos estudios no contemplan condiciones ambientales reproducibles o difieren en las dosis infectivas empleadas inicialmente. En este estudio, establecemos claramente las condiciones de trabajo, las cuales representan un ambiente controlado, equivalente a una sala de atención de pacientes como la de un centro hospitalario o unidad sanitaria. También se estandarizaron los parámetros a 21

°C con humedad de 40 %.

Por otro lado, hasta el momento ha sido bastante difícil estimar el título infectivo viral que un individuo COVID positivo puede expulsar en cada estornudo, tos o durante el habla. Escasos trabajos estudiaron la capacidad infectiva viral sobre barbijos y batas. En un trabajo de simulación de infecciones con SARS-CoV-2 en elementos del EPP, se utilizaron gotas de 50 microlitros, tamaño que se aleja del real generado por aerosoles al toser o estornudar.¹⁹ Este y otros trabajos emplean dosis de virus consideradas muy altas para las dosis esperables de SARS-CoV-2.^{19,20m} Por ello, consideramos que este trabajo realizado por nuestro grupo aporta datos más cercanos a los reales sobre la estabilidad de los virus mencionados en superficies del EPP, en individuos ambulatorios.

Los resultados de este estudio deben interpretarse a la luz de sus limitaciones: ciertos procedimientos de las vías respiratorias de alto riesgo como la intubación o la aspiración incrementan el potencial de producir grandes cantidades de flema, mucosidad, y/o saliva, además de aerosoles²¹, por ello, nuestros resultados no serían extrapolables a los casos de pacientes intubados.

Hasta el momento, no existe literatura que especifique cantidades exactas de coronavirus en gotas de aerosol de pacientes infectados, sin embargo la cantidad de ARN de virus respiratorios como el virus influenza en aerosoles ha sido medida con una concentración equivalente a 10 - 100 partículas virales en una gota, es decir, con menor cantidad inclusive que las partículas del virus de la gripe capaces de crecer en un ensayo de placa.²² Teniendo en cuenta estos datos y que la carga viral por gota depende de la gravedad del paciente, fuerza de expectoración, edad, etc., en nuestro estudio, decidimos trabajar con un rango viral infectivo apenas por encima del límite superior anteriormente mencionado para asegurarnos de cubrir todos los posibles escenarios y especialmente, el más infectivo en un simulado estado de máxima infectividad esperable. La dosis inicial de estudio fue de 10³ UFP por gota como la empleada por Warnes y col.⁹

Nuestros resultados muestran que la infectividad de virus envueltos como el HSV-1 decae en 3 logaritmos a las 72 h de contacto, lo que representa un 99,9 % de inactivación bajo las condiciones ensayadas. Brady y colaboradores demostraron para el virus parainfluenza que la supervivencia viral se incrementa al aumentar la dosis infectiva inicial.²³ Asimismo, nuestros estudios demuestran que el tiempo de inactivación viral depende de la dosis inicial de virus. Muchos trabajos establecen que el coronavirus puede inactivarse luego de varios días, sin embargo, la velocidad de inactivación depende claramente de la dosis infectiva inicial, como indican nuestros resultados. Al respecto, Kasloff y col.⁸ utilizan dosis de 10^{5,88}TCID₅₀ por gota, sin embargo, estas dosis son mucho mayores que las que se emplearon en este estudio, en su equivalencia en UFP. Al emplear dosis iniciales tan elevadas, se promueve la perduración de la actividad viral, como se observa en este trabajo y anteriores.²³ De esta manera, con dosis tan altas, en el trabajo de Kasloff y col.⁶, observaron que el virus perdura por más tiempo, en comparación con lo que se determinó en este estudio.

Teniendo en cuenta que actualmente existe una gran generación de elementos de desecho y acumulación de residuos patógenos, es importante poseer la información sobre si aquellos elementos podrían volver a reutilizarse, pasado cierto tiempo de inactivación, bajo condiciones ambientales comunes y corrientes. Nuestros ensayos demuestran que aquellos elementos expuestos a dosis infectivas por encima del límite superior a lo esperado pierden la infectividad viral pasadas por lo menos 72 horas, siempre y cuando las condiciones ambientales reproduzcan las reportadas en este trabajo. Más específicamente, para el virus BCoV, la presencia de un inóculo de 10^3 UFP todavía es infectiva a las 16 horas, sin embargo, a las 72 horas, ha perdido completamente su infectividad viral (Tabla 1 y Figura 2). Posteriormente, se estudió el comportamiento de la infectividad viral sobre las batas que componen el EPP tanto con el virus HSV-1 como con BCoV y también, en aquellas expuestas a pacientes COVID positivo. En este último caso, no se detectó infectividad viral a las 16 h post exposición de bata al paciente. Esto puede depender de dos factores: el primero es que no sabemos cuál fue el inóculo real inicial del paciente sobre la bata del médico, el cual podría haber sido muy bajo como para mantener su infectividad viral por más de 16 horas; la segunda causa, no menos importante, puede haber sido que la saliva o mucosidad contienen sustancias que interfieren (por ejemplo, proteínas antimicrobianas) que, a menudo, perjudican la estabilidad del patógeno^{19,24} y que nuestros medios de cultivo no contienen, o bien, podría haber sido producto de ambas situaciones. Las batas expuestas a pacientes COVID positivo fueron estudiadas luego de lavados con PBS, directamente por inmersión del trozo de bata o por hisopado de la zona. En ambos casos, el resultado obtenido fue negativo para la infectividad viral. Es importante remarcar que actualmente tampoco hay datos disponibles sobre la transmisibilidad de coronavirus de las superficies inoculadas a las manos. Por ello, aquí empleamos métodos de hisopado, que son más representativos de las interacciones mano-superficie.⁸

Teniendo en cuenta que el DMEM (medio líquido de cultivo) empleado para la recolección de los virus desde las distintas superficies no es clínicamente representante de una secreción humana, nuestros medios empleados incluso no perjudicarían la estabilidad viral, como ocurriría en una secreción natural; por ende, los resultados obtenidos en este trabajo aportarían información útil para conocer cuánto debe ser el tiempo máximo esperable para que bajo condiciones ambientales normales se inactive el virus desde un barbijo o bata quirúrgica sin necesidad de emplear métodos costosos para su desinfección y luego, si se requiere, poder reutilizar estos elementos.

Conclusiones

Estos datos nos aportan información de cómo disminuyen los niveles de infectividad viral a lo largo del tiempo en ciertos elementos del EPP en condiciones estándares controladas. Por ello, nuestro trabajo es útil para estimar el tiempo mínimo necesario que debería transcurrir, el cual se sitúa en las 72 horas poscontaminación, aproximadamente, para que barbijos o batas del EPP contaminados dejen de ser un posible elemento de

contagio. A partir de este estudio es posible contar con un protocolo para analizar la persistencia de virus en EPP, que podría extenderse más allá de los virus envueltos como el que ocasionó la pandemia y alcanzar a otros virus e incluso bacterias que causan, por ejemplo, altos índices en nuestro país de infecciones intrahospitalarias.

Agradecimientos

Los autores agradecen a: CONICET, FONARSEC (ANPCyT) Universidad Nacional del Sur, Universidad Nacional de Mar del Plata y Universidad de Buenos Aires.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Boone SA, Gerba CP. Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 1687–1696.
- Killingly B, Nguyen-Van-Tam J. Routes of Influenza Transmission. *Infl. Other Respir. Viruses* 2013;7: 42–51.
- Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL. Evidence That Contaminated Surfaces Contribute to the Transmission of Hospital Pathogens and an Overview of Strategies to Address Contaminated Surfaces in Hospital Settings. *Am. J. Infect. Control* 2013; 41: S6–S11.
- Fernstrom A, Goldblatt M. Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. *J. Pathog.* 2013; 1–13.
- Boone SA, Gerba CP. Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:1687-96.
- World Health Organization (WHO) Shortage of personal protective equipment endangering health workers worldwide [WWW Document]. URL 2020.
- Ayala-Peña V, Santillán G, Scolari L. Experimental in vitro infection of rat osteoblasts with measles virus stimulates osteogenic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 451: 609–614.
- Kasloff SB, Strong JE, Funk D, Cutts TA. Stability of SARS-CoV-2 on Critical Personal Protective Equipment. *medRxiv.* 2020;11:984.
- Warnes SL, Little ZR, Keevil CW. Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials. *MBio.* 2015; 10:6:e01697-15.
- Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol.* 1985; 22:250-4.
- Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology.* 5th Edición. Holanda, Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
- Atkinson B, Petersen E. SARS-CoV-2 Shedding and Infectivity. *Lancet* 2020; 395: 1339–1340.
- Córdoba-Lanús E, García-Pérez O, Cazorla-Rivero S, Rodríguez-Esparragón F, Piñero JE, Clavo B, y col., Persistence of SARS-CoV-2 infection on personal protective equipment (PPE). *BMC Infect Dis.* 2021;19:21,1169.
- Shahi AK, Ahmed-Saeed N, Taylor I, Kiernan S, Mahobia N, Pelosi E, Saeed K. Environmental contamination and personal protective equipment contamination with SARS-CoV-2 virus in a real-life clinical setting. *J Infect Prev.* 2022;23:7-10.
- Xue X, Ball JK, Alexander C, Morgan RA. All Surfaces Are Not Equal in Contact Transmission of SARS-CoV-2. *Matter* 2020; 3:1433-1441.
- Colaneri M, Seminari E, Piralla A, Zuccaro V, Di Filippo F, Baldanti R, y col. Lack of SARS-CoV-2 RNA environmental contamination in a tertiary referral hospital for infectious diseases in Northern Italy. *J Hosp Infect* 2020; 105: 474–76. 5
- Colaneri M, Seminari E, Novati S, Asperges E, Biscarini S, Piralla E, y col. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA contamination of inanimate surfaces and virus viability in a health care emergency unit. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 26: 1094.e1–e5.

18. Haddow AD, Watt T, Bloomfield H, Fetterer DP, Harbourn DE. Modeling the Stability of SARS-CoV-2 on Personal Protective Equipment (PPE). *Am J Trop Med Hyg.* 2020;104:549-551.
19. Goldman E. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites. *Lancet Infect Dis.* 2020;20:892-893
20. Mondelli MU, Colaneri M, Seminari EM, Baldanti F, Brunob R. Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites in real-life conditions. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21: e112.
21. Weissman DN, de Perio MA, Radonovich LJ. COVID-19 and risks posed to personnel during endotracheal intubation. *JAMA* 2020; 323: 2027–2028.
22. Lindsley WG, Blachere FM, Thewlis RE, Vishnu A, Davis KA, Cao K, Palmer J, Clark K, Fisher MA, Kakoo R, Beezhold DH. Measurements of airborne influenza virus in aerosol particles from human coughs. *PLoS One* 2010; 5: e15100.
23. Brady MT, Evans J, Cuartas J. Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces. *Am. J. Infect.* 1990;18:18–23.
24. Eccles, R. Respiratory Mucus and Persistence of Virus on Surfaces. *J. Hosp. Infect.* 2020; 105: 350.