



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGICA**

**RECURSO METODOLÓGICO PARA LA RECUPERACIÓN Y
DETECCIÓN EN AEROSOLES DEL BACTERIOFAGO MS2
COMO VIRUS SUSTITUTO DEL SARS-CoV-2**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LIC. QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

P R E S E N T A:

ARIEL NICOLÁS MORENO

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: MTRA. ISaura YÁÑEZ NOGUEZ

ASESORA: Q.F.B. ADRIANA HERNANDEZ REYES

ASESOR: Q.F.B. MANUEL ORDUÑA SANCHEZ

**SINODAL : DRA. MARIA DOLORES CENTEOTL CASTILLO
MONTIEL**

SINODAL : Q.F.B. CARINA GUTIERREZ IGLESIAS





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015

No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del 12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023.

Agradecimientos

La presente tesis fue desarrollada para el cumplimiento de los objetivos del proyecto BG101621 “Desarrollo del procedimiento para evaluar los efectos de tensoactivos, en la inactivación de un indicador viral del virus SARS-CoV2 en ambientes contaminados (aerosoles)”, por lo que se agradece el apoyo y recursos otorgados para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM y a todo el personal del LIA por brindarme las facilidades para realizar mi tesis en esta institución.

A mi directora M. en C. Isaura Yáñez Noguez por darme la oportunidad de realizar esta tesis, así como su apoyo, guía y paciencia durante el desarrollo y escrito del trabajo.

Contenido

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Marco teórico.	4
3.1. Coronavirus y SARS-CoV-2 en el ambiente.	4
3.2. Bacteriófagos como indicadores de virus patógenos.	5
3.3. Bacteriófago MS2 como indicador viral del SARS-CoV-2.	7
4. Técnicas de muestro de virus en el aire.	8
4.1. Recolección de aerosoles.	9
4.2. Equipos.	9
4.2.1. Gravitación o impactación natural.	10
4.2.2. Impactación.	10
4.2.3. Centrifugación.	10
4.2.4. Burbujeo.	10
4.2.5. Filtración.	11
5. Propuesta metodológica para el muestreo del Bacteriófago MS2 en el aire... 15	
6. Muestreador Button.	16
6.1. Operación.	18
6.1.1. Calibración.	21
6.2. Muestreo.	22
6.2.1. Envío de la muestra.	23
6.2.2. Análisis.	23
6.2.3. Limpieza y cuidados del muestreador Button.	23
6.3. Filtros recomendados para el Muestreador Button.	24
6.3.1. Filtros de membrana de Ester de celulosa mixta (MCE).	24
6.3.2. Filtros de membrana PVC.	24
6.3.3. Filtro de fibra de vidrio.	25
6.3.4. Tipos de filtros de fibra de vidrio.	25
6.3.5. Filtros de gelatina.	26
6.3.6. Aplicaciones.	27
6.3.7. Método indirecto.	28
6.3.8. Clasificación del tamaño de los poros.	28

7. Nebulizador TSI Modelo 9302.	29
7.1. Características y beneficios.....	30
8. Bomba recomendada para el muestreador Button es la Airchek® xr5000.	30
8.1. Descripción.....	30
8.2. Especificaciones.....	30
8.2.1. Indicaciones.	31
9. Plan de muestreo.....	32
10. Numero de muestras.	32
11. Lugar de Muestreo (Cámara de contacto).....	34
12. Fundamentos de las técnicas empleadas.	34
12.1. Fundamentación de la técnica de DAL (Double-Agar-Layer).....	34
12.2. Fundamento de API 20E.	35
13. Cepas de Referencia certificadas utilizadas en el proyecto.	36
13.1. Cepas de referencia.	36
14. Planteamiento del problema.	37
15. Pregunta de investigación.	37
16. Hipótesis.....	37
17. Objetivos.	38
17.1. General.	38
17.2. Particulares.	38
18. Diseño de estudio.....	38
19. Universo (población o muestra).....	39
20. Variables.	39
20.1. Dependientes.	39
20.2. Independiente.	40
21. Análisis cualitativo – Descripción del método a utilizar.....	40
22. Procedimiento.....	41
22.1. Diagrama general de la metodología.	42
22.2. Recuperación de las cepas de referencia.	44
22.3. Identificación de la cepa hospedera Escherichia coli ATCC 700891 mediante la técnica de API 20E.	45
22.4. Muestreo y recuperación del Bacteriófago MS2 utilizando el muestreador Button y los filtros de gelatina en un ambiente controlado (cámara de contacto)..	46

23.	Resultados y análisis.....	48
24.	conclusiones.....	62
25.	Bibliografía	63

1. RESUMEN.

Se desarrolló una metodología para la recuperación y detección del bacteriófago MS2 como virus sustituto del SARS-CoV-2 en aerosoles. Se aplicó un diseño experimental en el cual se tomaron muestras aleatorias en un ambiente controlado (cámara de contacto). Las muestras fueron procesadas mediante la técnica microbiológica de doble capa de agar (Doble Agar Layer - DAL), en la cual, posterior a un periodo de incubación se observan zonas o placas de lisis por la infección del virus a la bacteria (zonas circulares traslúcidas). Estas áreas reciben el nombre de unidades formadoras de placa (UFP). Las UFP corresponden a los virus recuperados en muestras de aerosoles mediante el muestreador Button, utilizando filtros de gelatina; ya que estos permitieron capturar y mantener al bacteriófago MS2 en su forma infectiva, así como el volumen mínimo de detección-cuantificación del mismo. El muestreo mediante el dispositivo Button, resultó ser una alternativa viable dado que es un método fácil, altamente eficiente y sensible para el monitoreo del bacteriófago MS2 como virus sustituto del SARS-CoV-2. La densidad inicial suministrada a través de aerosolización fue de 1×10^6 partículas virales y el conteo de las UFP recuperadas con la metodología propuesta se encontró en un intervalo de 3.5×10^3 - 8.2×10^3 UFP/mL. A partir del análisis estadístico, se concluyó que la metodología probada se puede utilizar eficazmente en el monitoreo de virus en el aire.

2. INTRODUCCIÓN.

A finales del año 2019, un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) fue identificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el agente causal de la enfermedad respiratoria COVID-19. El mecanismo de infección del SARS-CoV-2 es a través de gotas de saliva expulsadas al toser y estornudar, al estrechar la mano, al tocar un objeto o superficie contaminada (Matos et al. 2020). Además de la transmisión por gotas respiratorias y fómites, existe una creciente evidencia de la transmisión aérea por aerosoles (OMS, 2020).

Investigaciones recientes se han enfocado en la desinfección de espacios contaminados con el SARS-CoV-2, ya sea en objetos, superficies o espacios contaminados. Es por ello, y de relevancia contundente que debe realizarse la desinfección de los aerosoles como vehículo de transmisión primaria, sobre todo en espacios cerrados como oficinas, salas de espera, aulas, bibliotecas, laboratorios, auditorios, clínicas, cubículos, casetas de vigilancia, comedores, tiendas, vehículos, etc (OMS, 2020). De tal manera que para lograr dicha desinfección es necesario enfocar estudios en relación a los procedimientos a seguir tanto para la recuperación como para la detección del virus SARS-CoV-2 a partir de los aerosoles de espacios que pudieran estar contaminados.

El riesgo que implica el uso del virus SARS-CoV-2 es alto de tal forma que el uso de virus sustitutos resulta ser una alternativa viable, tal es el caso de los bacteriófagos los cuales son un tipo de virus con características similares a los virus patógenos pero que sólo infectan bacterias introduciendo su material genético para replicarse en su interior hasta destruirla, lo mismo que sucede en las células humanas por los virus patógenos como el SARS-CoV-2.

El presente proyecto de tesis se dirigió a proponer un recurso metodológico para evaluar la recuperación y detección en aerosoles del bacteriófago MS2 utilizado como virus sustituto del virus SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos servirán de

base para aplicar la metodología propuesta a investigaciones sobre la desinfección de espacios contaminados y extrapolarla posteriormente a situaciones reales.

La metodología de muestreo propuesta para virus en aerosoles en un ambiente controlado (cámara de contacto), se planteó mediante el uso del muestreador Button y posteriormente se determinó la recuperación del virus aplicando la siembra por el ensayo doble capa de agar (Double Agar Layer - DAL). La siembra en agar demostró la presencia del virus al contaminar el cultivo de una bacteria huésped que se visualiza por la lisis de las células presentes en el cultivo.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Coronavirus y SARS-CoV-2 en el ambiente.

A causa de la pandemia COVID-19, que comenzó a finales del año 2019 y que ha afectado al mundo y nuestro país por el virus de SARS-CoV-2 el cual es responsable de causar el síndrome agudo respiratorio severo, trajo como consecuencia que se implementaran algunas medidas generales de bioseguridad para evitar el contagio entre la población.

Se conoce que este nuevo virus causa una enfermedad respiratoria con fiebre, tos y dificultad para respirar, sin embargo, pueden presentar algunos otros síntomas. Este virus se ha propagado por todo el mundo, y la mayoría de las personas que padecen esta enfermedad la pueden presentar de leve a moderada y en adultos mayores y aquellas personas con ciertas comorbilidades tienen un alto riesgo de causar una enfermedad grave o incluso la muerte (Wu Z, McGoogan JM, 2020).

Los coronavirus son una familia de virus que caracteriza por tener picos o espigas en forma de corona en su superficie, de ahí que así se le llame, el virus SARS-CoV-2 es un virus que entra en esta familia y que se caracteriza por poseer un RNA monocatenario, además que se encuentran envueltos en una membrana constituida por una doble capa lipídica asociada a glicoproteínas que pueden proyectarse en forma de espículas desde la superficie de la partícula viral hacia el exterior, además de que pueden afectar a personas y animales, por lo tanto pueden causar enfermedades respiratorias (como un resfriado común) así como afecciones entéricas, hepáticas y neurológicas (Tsang et al. 2020).

La vía de transmisión de este nuevo virus entre humanos se considera similar al descrito para otros coronavirus, es decir a través de las secreciones de personas infectadas, principalmente por contacto directo con gotas respiratorias de más de 5 micras (capaces de transmitirse a distancias de hasta 2 metros) o por contacto directo con las manos o fómites, así como superficies contaminadas con

secreciones, seguido del contacto con la mucosa de la boca, nariz u ojos. De ahí todas las medidas de bioseguridad que se establecieron a nivel mundial (Ong et al. 2020).

La transmisión aérea generalmente se da por microgotas o aerosoles. Los aerosoles son entendidos como la suspensión de partículas diminutas de una sustancia en un medio gaseoso como es el aire. En una investigación realizada en la localidad de Kioto en Japón, se muestra que el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 es detectable hasta las tres horas, y se mantiene en suspensión en el aire por periodos prolongados de hasta 20 minutos, por lo cual el investigar y proponer medidas sanitarias efectivas son necesarias para la desinfección de lugares concurridos (Bourouiba, 2020).

Es por eso, que el uso de aerosoles en ambientes contaminados con partículas virales resulta viable, por lo cual la implementación de indicadores virales para su estudio es muy factible, debido a que se perciben como excelentes modelos para el estudio de virus en el aire porque son seguros de usar y son una buena alternativa como virus sustitutos. El bacteriófago MS2 fue seleccionado para su uso en el presente proyecto, dado que presenta estructuras similares al virus SARS-CoV-2.

3.2. Bacteriófagos como indicadores de virus patógenos.

Un indicador viral es un patógeno que revela la presencia de un virus, es una alerta o “informante” de la calidad de una superficie o espacio, es de gran importancia porque logran determinar la presencia de microorganismos causantes de afecciones, con ellos se podría prevenir grandes brotes de enfermedades infecciosas. Entre estos indicadores se encuentran los bacteriófagos, los cuales son virus que sólo infectan bacterias y que son inocuos para los humanos (Cervantes C, 2015).

Los bacteriófagos se perciben como buenos modelos para el estudio de virus en el aire porque son seguros, además de que presentan características estructurales similares a las de los virus humanos y animales, y son

relativamente fáciles de producir. Cabe hacer mención que la captura en aerosoles de virus en un pequeño volumen de líquido, es esencial cuando se monitorean los virus en el aire (Simmons et al. 2017).

Los bacteriófagos se han estudiado en todo el mundo como indicadores de contaminación debido a la facilidad de su detección y su similitud morfológica con los virus humanos. Además, la detección de patógenos humanos sigue siendo un proceso altamente calificado y costoso. En general los bacteriófagos han mostrado un buen potencial de aplicación como indicadores en determinadas situaciones (Armon & Kott, 1996). Con base en su ciclo replicativo, los fagos se clasifican en dos tipos: lisogénicos (o templados) y líticos (o virulentos) (Domínguez, 2020). Una vez que un bacteriófago se adhiere a un huésped susceptible sigue una de las dos estrategias de replicación: lítica o lisogénica; durante un ciclo de replicación lítica un fago se adhiere a una bacteria huésped susceptible introduce su genoma en el citoplasma de la célula huésped y utiliza los ribosomas del habitante para fabricar sus proteínas. Los recursos de la célula anfitriona se convierten rápidamente en genomas virales y proteínas de la cápside que se ensamblan en múltiples copias del fago original; cuando la célula comensal muere es lisada activa o pasivamente liberando los nuevos bacteriófagos para infectar otras células huésped. En el ciclo de replicación lisogénica el fago también se adhiere a una bacteria huésped susceptible e introduce su genoma en el citoplasma de la célula anfitriona; sin embargo, el genoma del fago se integra en el cromosoma de la célula bacteriana o se mantiene como elemento episomal donde en ambos casos se replica y pasa a las células bacterianas hijas sin matarlas. Los genomas de los fagos integrados se denominan profagos y las bacterias que los contienen se denominan lisógenos; los profagos pueden volver a un ciclo de replicación lítica y matar a su anfitrión, la mayoría de las veces en respuesta a condiciones ambientales cambiantes (Kasman & Porter, 2020).

3.3. Bacteriófago MS2 como indicador viral del SARS-CoV-2.

El bacteriófago MS2 se ha utilizado ampliamente para evaluar el rendimiento del muestreo de aire porque su morfología es similar a la de los virus patógenos, incluidos el virus de la fiebre aftosa (FA), el rinovirus, entre otros (Rae et al. 2021). Se caracterizan por ser un virus icosaédrico sin cola, que tiene una cadena de ARN de sentido positivo monocatenario además de que estos virus no cuentan con una envoltura como tal, sin embargo, posee una cubierta proteica que le da más resistencia a condiciones ambientales; también se caracteriza por infectar a la bacteria *Escherichia coli* y otros miembros diferentes de las Enterobacterias.

El bacteriófago MS2 (ATCC 15597-B1), es un modelo para virus de ARN sin envoltura que se ha utilizado ampliamente en estudios de ingeniería ambiental (Lin et al. 2020), debido a su pequeño tamaño, composición relativamente simple y facilidad de crecimiento, el fago MS2 se utiliza como organismo modelo para la realización de procesos macromoleculares que incluyen la replicación, traducción, infección y ensamblaje viral, debido a su facilidad de purificación, inocuidad para el hombre y durabilidad, el MS2 también se utiliza como marcador cuantitativo de la eficacia de los agentes antivirales y antisépticos (Kuzmanovic et al. 2003).

También se ha utilizado con frecuencia como sustituto de virus patógenos en estudios de aerosolización. Se utilizó en un estudio realizado por el Centro de control de enfermedades (CDC) y la Universidad Estatal de Kansas (KSU) en Estados Unidos, para estimar la dispersión en el aire del SARS-CoV-2, usando el bacteriófago MS2 como sustituto. Modelaron la relación entre la exposición al SARS-CoV-2 y la proximidad de los asientos de los aviones, considerando escenarios de ocupación total y de ocupación del asiento intermedio vacante (Dietrich et al. 2021).

En otro estudio se analizó la supervivencia de tres bacteriófagos sugeridos como buenos modelos para microorganismos patógenos respiratorios: el Phi6 envuelto (un sustituto del SARS-CoV-2) y el PhiX174 y MS2 no envuelto (Fedorenko et al. 2021). Estos fagos se han establecido como buenos, seguros y fáciles de trabajar,

en modelos de sustitución para estudiar la supervivencia de microorganismos patógenos tanto en superficies como en el aire; el Phi6 envuelto y los otros dos bacteriófagos que son modelos sin cola no envueltos. Como una referencia Phi6 es un fago de ARNdc (doble cadena) de la familia Cystoviridae que se ha sugerido como un buen sustituto para el estudio de virus de ARN con envoltura, incluidos los coronavirus del SARS; está envuelto por una membrana lipídica y tiene proteínas en forma de espiga (Lin et al. 2020).

Para evaluar la viabilidad del bacteriófago MS2 el cual funciona como virus alternativo al SARS-CoV-2 y que se utilizará como indicador de desinfección de espacios, es fundamental estudiar la efectividad de su recolección. Es por ello que este proyecto se centrara en evaluar las condiciones de muestro en aire, así como la recuperación del fago MS2 para utilizarlo como indicador de la presencia de virus de interés. Por lo tanto, se propondrá una metodología para tomar muestras del bacteriófago MS2 como indicador del virus SARS-CoV-2 en aerosoles.

4. TÉCNICAS DE MUESTRO DE VIRUS EN EL AIRE.

Como se sabe, la mayoría de las tecnologías de muestreo de aire dependen generalmente de una serie de características como son:

- Diámetro aerodinámico de las partículas en el aire.
- Las propiedades de adhesión de las partículas en el aire.
- El movimiento browniano.
- Los gradientes térmicos.
- La inercia de las partículas.

Las partículas en aerosol se adhieren a cualquier superficie con la que entran en contacto debido a las fuerzas adhesivas como las fuerzas de Van Der Waals, las fuerzas electrostáticas y la tensión superficial explican en parte esta adhesión y es por eso que la mayoría de las metodologías de muestreo se basan en este principio. Las partículas en el aire con diámetros aerodinámicos del orden de 100 nm o menos son propensas a una forma particular de moverse, principalmente debido a los miles

de millones de colisiones que encuentran con las moléculas de gas. Esto se llama movimiento browniano y cuanto más pequeña es la partícula mayor es el movimiento y es más probable que la partícula se difunda, entre en contacto con una superficie y se adhiera a ella (Verreault et al. 2010).

Cuando esto sucede las otras partículas en suspensión ocupan el espacio que dejó la partícula que se ha adherido a la superficie, este fenómeno es la base para la eliminación eficiente de partículas muy pequeñas por filtración particularmente cuando la distancia entre dos superficies del filtro es suficiente para que las partículas pasen; es por eso que las partículas más grandes con diámetros aerodinámicos del orden de un micrómetro o más están menos influenciadas por el movimiento browniano, pero tienen una mayor inercia (Verreault et al. 2010).

4.1. Recolección de bioaerosoles.

Los bioaerosoles son muestreados removiéndolos del aire y reteniéndolos para un análisis subsecuente (Tilley, 1997). Los bioaerosoles son captados al producirse la separación de las partículas que los forman por la acción de distintas fuerzas físicas (Hernández, 2003). En otro aspecto, se puede decir que ningún método de muestreo puede recolectar, identificar y cuantificar todos los componentes de los bioaerosoles en un ambiente en particular (Mandal & Brandl, 2011).

4.2. Equipos.

Los equipos están basados en la toma, recuperación y subsiguiente cultivo de microorganismo, estos métodos pueden ser clasificados también de acuerdo con el procedimiento de toma de muestra o el manejo de la muestra tomada e incluye: Gravitación, impactación, succión, centrifugación, burbujeo y filtración.

4.2.1. Gravitación o impactación natural.

Es considerada la forma más simple de toma de muestra de aerosoles, en la cual las partículas biológicas aerotransportadas son recogidas sobre una superficie adherente (agar, portaobjetos, etc.) por su capacidad de sedimentar por gravedad (INSHT, 1997).

4.2.2. Impactación.

En este tipo de equipo, el aire es aspirado por una bomba de vacío que forma parte del muestreador, pasa a través de un orificio y es dirigido a la superficie del medio de cultivo contenido en una placa adecuada. Las partículas con suficiente movimiento de inercia abandonan la corriente e impactan sobre la superficie (INSHT, 1997).

4.2.3. Centrifugación.

Estos muestreadores de impactación utilizan la fuerza centrípeta para la separación de las partículas de la corriente de aire de aspiración. Operan creando un remolino en el cual las partículas con suficiente inercia dejan la corriente de aire para impactar sobre la superficie (medio de cultivo) de recogida (INSHT, 1997).

4.2.4. Burbujeo.

En este tipo de muestreo, el aire a muestrear pasa a través de un volumen conocido de líquido (suero salino, agua peptonada con agentes humectantes generalmente) donde posteriormente las partículas abandonan la corriente de aire por impactación en el líquido, quedando retenidas en el mismo; posteriormente y ya en el medio de cultivo adecuado se transfiere una alícuota del líquido de captación, procediéndose a su cultivo, recuento y en su caso a su identificación (viables o cultivables) (INSHT, 2003).

4.2.5. Filtración.

Aquí el aire es aspirado a través de un medio de filtración en el cual las partículas se depositan (Hernández, 2003), los medios de filtración generalmente están disponibles tanto en fibra (generalmente de vidrio) y en formas membranosas. Las partículas más pequeñas que el tamaño del poro pueden ser fácilmente recogidas (Srikanth & Steinberg, 2008).

Finalmente, en un estudio realizado por Verreault (Tabla 1) se muestra un compendio de métodos, en donde se describen los instrumentos de muestreo comúnmente utilizados en aerobiología para recuperar virus suspendidos en aire. En este estudio se revisaron más de 100 artículos para evaluar los métodos más utilizados actualmente para el muestreo de aerosoles virales.

Tabla 1. Resumen de las técnicas de muestreo aerosoles de virus.

Tipo de muestreador	Tasa o capacidad de muestreo de aire	Entorno de muestreo	Virus	Tamaño de partícula (µm)	Fuente de aerosol
Impactador de Porton levantado	11,5 L/min durante 1 min	Sistema estático de doble pared de 2.000 L con ventilador	Bacteriófago MS2	2 (antes de la evaporación)	Aparato de pulverización directa (FK8)
Impactador de Porton levantado	1 o 5 min	Cámara (50 o 2000 litros)	Bacteriófago φX174, esporas de <i>Bacillus globigii</i> o sin trazador		Nebulizador o pistola pulverizadora Collison de tres chorros (tipo FK-8)
Impactador MicroBio MB1 portátil de un solo tamiz	100 a 600 litros	Baño doméstico en habitación de 2,6 m ³	Bacteriófago MS2		Descarga del inodoro.
Placas de asentamiento	30 min	Baño doméstico en habitación de 2,6 m ³	Bacteriófago MS2		Descarga del inodoro.
Muestreadores ciclónicos	700 (± 50) L/min durante 5 min	Cámara	Bacteriófago MS2		Uno o dos nebulizadores Collison de tres o seis chorros
AGI-30	Set 2 experimentos, 12.5 L/ min	Sistema cerrado	Bacteriófagos MS2 y T3	menos de 300 nm de diámetro	Atomizador de salida constante
SKC BioSampler	Set 2 experimentos, 12.5 L/ min	Sistema cerrado	Bacteriófagos MS2 y T3	menos de 300 nm de diámetro	Atomizador de salida constante
Frit bubbler	Set 2 experimentos, 12.5 L/ min	Sistema cerrado	Bacteriófagos MS2 y T3	menos de 300 nm de diámetro	Atomizador de salida constante

SKC BioSampler	12,5 L/min durante 20 min	Campo a favor del viento de un rociado de biosólidos o agua subterránea sembrada	Bacteriófago MS2		Cisterna de pulverización
Impactador de una etapa Andersen; También se utilizó un impactador de seis etapas para la distribución del tamaño.	28,3 L/ min	Cámara de 29 cm de diámetro y 32 cm de altura	Bacteriófagos ϕ X174, MS2, T7 y ϕ 6	1,23-1,25 (diámetro aerodinámico medio;> 95% de las PFU recuperadas con el muestreador Andersen de seis etapas tenían <2,1 μ m de diámetro)	Nebulizador Collison de tres chorros
AGI-30	12.5 L/min durante 5 min	Cámara de 29 cm de diámetro y 32 cm de altura	Bacteriófagos ϕ X174, MS2, T7 y ϕ 6	1,23-1,25 (diámetro aerodinámico medio;> 95% de las PFU recuperadas con el muestreador Andersen de seis etapas tenían <2,1 μ m de diámetro)	Nebulizador Collison de tres chorros
Filtro de gelatina (tamaño de poro de 3,0 μm)	30 L/min durante 5 min	Cámara de 29 cm de diámetro y 32 cm de altura	Bacteriófagos ϕ X174, MS2, T7 y ϕ 6	1,23-1,25 (diámetro aerodinámico medio;> 95% de las PFU recuperadas con el muestreador Andersen de seis etapas tenían <2,1 μ m de diámetro)	Nebulizador Collison de tres chorros
Filtro nucleopor (membrana de policarbonato; tamaño de poro de 0,4 μm)	2 L/min durante 20 min	Cámara de 29 cm de diámetro y 32 cm de altura	Bacteriófagos ϕ X174, MS2, T7 y ϕ 6	1,23-1,25 (diámetro aerodinámico medio;> 95% de las PFU recuperadas con el muestreador Andersen de seis etapas tenían <2,1 μ m de diámetro)	Nebulizador Collison de tres chorros
Muestreador de seis etapas Andersen (para distribución de tamaño)		Cámara de exposición de 23 litros	Bacteriófagos MS2, ϕ X174, ϕ 6 y T7	0.5-3.0 (> 95% de las partículas que contienen virus eran <2.1 μ m)	Nebulizador Collison de tres chorros
Andersen one-stage sampler	28.3 L/min durante 0.5 a 5 min	Cámara de exposición de 23 litros	Bacteriófagos MS2, ϕ X174, ϕ 6 y T7	0.5-3.0 (> 95% de las partículas que contienen virus eran <2.1 μ m)	Nebulizador Collison de tres chorros
Filtro de gelatina (tamaño de poro de 3 μm)	4 L/min	Cámara	Bacteriófago MS2	10-80 nm	Nebulizador de chorro de aire tipo

					colisión de seis chorros
Filtro PTFE (tamaño de poro de 0.5 µm)	4 L/min	Cámara	Bacteriófago MS2	10-80 nm	Nebulizador de chorro de aire tipo colisión de seis chorros
Filtro PTFE (tamaño de poro de 1 µm)	4 L/min	Cámara	Bacteriófago MS2	10-80 nm	Nebulizador de chorro de aire tipo colisión de seis chorros
Filtro PTFE (tamaño de poro de 3 µm)	4 L/min	Cámara	Bacteriófago MS2	10-80 nm	Nebulizador de chorro de aire tipo colisión de seis chorros
Filtro PTFE (tamaño de poro de 0.3 µm)	2 L/min	Cámara	Bacteriófago MS2	10-80 nm	Nebulizador de chorro de aire tipo colisión de seis chorros

*Verreault et al, 2008.

5. PROPUESTA METODOLÓGICA PARA EL MUESTREO DEL BACTERIÓFAGO MS2 EN EL AIRE.

Después de investigar diferentes técnicas de muestro de aire, para el presente proyecto se determinó que la utilización de filtros de gelatina sería el método más adecuado debido a que es altamente eficiente y sensible para el monitoreo de microorganismos patógenos en el aire, incluyendo virus.

Los filtros son particularmente adecuados ya que muestran una excelente eficiencia de recolección de microorganismos con tasas de retención de hasta 99.76%. Además, el procedimiento de muestreo de aire con filtros de gelatina permite varias posibilidades para extender el límite de detección inferior a tan solo 102 partículas/m³ (Scherwing y Patzelt, 2020).

La alta idoneidad de los filtros de gelatina fue demostrada por primera vez por Jaschhof (1992a, 1992b) así como Friese, quien observó que en casos individuales el filtro de gelatina es superior a otros métodos de muestreo de virus. Esta eficiencia se logra sin realizar ningún paso adicional de preparación o pos-procesamiento para tomar muestras de aerosoles de virus al tiempo que se mantiene la capacidad de retención de los filtros constantemente alta.

Los filtros de gelatina están disponibles como unidades de filtración pre-ensamblada y preesterilizadas listas para ser usadas. Otro beneficio muy importante es que durante el muestreo de virus patógenos humanos no se necesita líquido, lo cual reduce el riesgo de infección del personal que realiza las pruebas analíticas y es por eso que la reducción reportada de la infectividad del virus después del muestreo con filtros de gelatina demuestra ser ventajosa ya que las muestras pueden considerarse como material no infeccioso.

Además, la posibilidad de almacenar los filtros de gelatina después del muestreo, así como de enviar los filtros de gelatina a otro laboratorio para su posterior análisis antes de la disolución, pueden ser una opción muy benéfica para el usuario (Scherwing y Patzelt, 2020).

Tan pronto como el filtro de gelatina se haya disuelto en agua desionizada o cualquier otro tampón o medio apropiado, todas las partículas de virus retenidas en el filtro pueden procesarse y detectarse adicionalmente mediante técnicas como la PCR o cualquier otra técnica alternativa. Para obtener resultados rápidos, sensibles, altamente específicos y fiables sobre la presencia de virus específicos, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es el método de elección. Varios estudios han demostrado que un análisis de PCR posterior al muestreo de aire utilizando filtros de gelatina proporciona resultados de recuperación superiores a otros métodos de detección y, por lo tanto, puede considerarse como un método preciso y práctico para la detección de virus en el aire (Scherwing y Patzelt, 2020).

En otro estudio se determinó la eficiencia de recolección física de filtros disponibles comercialmente para recolectar bacterias, virus y otras partículas en aire; en un rango de tamaño de 10-900 nm (nanómetros) y se demostró que los filtros de PTFE y gelatina mostraban una excelente eficiencia de recolección (> 93%) para todas las partículas de prueba. Los filtros de PC mostraron una menor eficiencia de recolección para partículas pequeñas, especialmente <100 nm por lo cual se indican en los resultados que el efecto del material de filtro es más significativo para el rango de tamaño de viriones individuales que para las bacterias (Burton et al. 2007).

6. MUESTREADOR BUTTON.

Para el muestro y recuperación de virus en el aire se pueden utilizar varios dispositivos, los más comunes son los conocidos como impactadores de líquidos y sólidos, aunque también se han probado muestreadores electrostáticos (Verreault et al. 2008). El muestreador Button está diseñado para mejorar las características de recolección de polvo inhalable, esto incluye bioaerosoles para el análisis de partículas viables y no viables.

El muestreador fue desarrollado en la Universidad de Cincinnati (2000). El muestreador es de forma redondeada (32 mm de diámetro) con la parte superior curvada. El 21% de la superficie curva es porosa, con orificios de 381 µm de

diámetro. La base del muestreador es de aluminio y la superficie curva es de acero inoxidable. El caudal de muestreo es de 4 L/min. Las partículas se recogen en un filtro con un tamaño de poro de 25 mm situado dentro del muestreador. La determinación analítica considera las partículas depositadas en el filtro. Si se va a realizar un análisis gravimétrico del filtro, el fabricante recomienda guardar el filtro en cápsulas de transporte de plástico conductor. La determinación gravimétrica incluye la cápsula de transporte junto con el filtro. En el caso en el que se vaya a efectuar un análisis químico al filtro, éste se transporta en un vial adecuado.

Las características generales del filtro dadas por el fabricante se resumen en la Tablas 2, 3 y 4, en donde se muestra de forma más detallada las características propias del muestreador Button, así como los filtros recomendables para realizar estudios de aerosolización con diferentes filtros de gelatina.

Tabla 2. Características generales del muestreados Button dadas por el fabricante.

Muestreador						
Muestreador	Característica	Caudal de muestreo	Elementos de retención	Determinación analítica	Fabricante	
Button	Muestreador de forma redondeada (32 mm de diámetro) con la parte superior curvada. El 21% de la superficie curva es porosa, con orificios de 381 µm de diámetro. La base del	de 4 l/min Para ajustar el caudal de muestreo necesario acoplar un adaptador al muestreador.	Para el de diámetro es de tamaño de poro ≥ 1,0 µm. Pueden ser de fibra de vidrio, membrana de éster de	Filtros de 25 mm de diámetro y depositadas en el filtro.	Se consideran las partículas depositadas en el filtro.	SKC.

muestreador es de aluminio y la superficie curva es de acero inoxidable.	celulosa (MCE), PVC, teflón o gelatina.
--	---

Tabla 3. Características técnicas del nebulizador Button.

Gasto	4 L/min. *
Entrada de muestreo	Acero inoxidable conductivo.
Cuerpo	Aluminio.
Pantalla de soporte	Acero inoxidable. *
Pinzas	Acero inoxidable y nylon.
Tóricas	PTFE (entrada) y BUNA-N (Cuerpo)
Filtros	25 milímetros. **
Análisis de polvo inhalable	Gravimétrico.
Análisis de esporas fúngicas	Microscopía de epifluorescencia, inmunoensayo o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Análisis de metales	Fluorescencia de rayos X (XRF).
Tubería	ID de 1/4 de pulgada (6,25 mm).

* El muestreador Button sigue de cerca la curva de inhalabilidad ISO 7708/CEN a 4 L/min.

** Se recomienda un tamaño de poro de filtro de 1,0 µm o mayor para su uso con el Button para reducir la contrapresión.

6.1. Operación.

1. Para el muestreo gravimétrico, se acondiciona y se pesa un filtro de 25 mm según el método utilizado.
2. Desatornille la entrada del muestreador en sentido antihorario hasta que se salga y retire la junta tórica de PTFE.

3. Coloque el filtro de 25 mm en la parte superior de la rejilla de soporte dentro del muestreador.
4. Coloque la junta tórica de PTFE en la parte superior del filtro.
5. Reemplace la entrada y muy gentil gire en el sentido de las agujas del reloj hasta que esté moderadamente apretado.

Nota: Utilizar guantes y pinzas al manipular los filtros. Los filtros representativos utilizados para la calibración no requieren acondicionamiento ni pesaje.

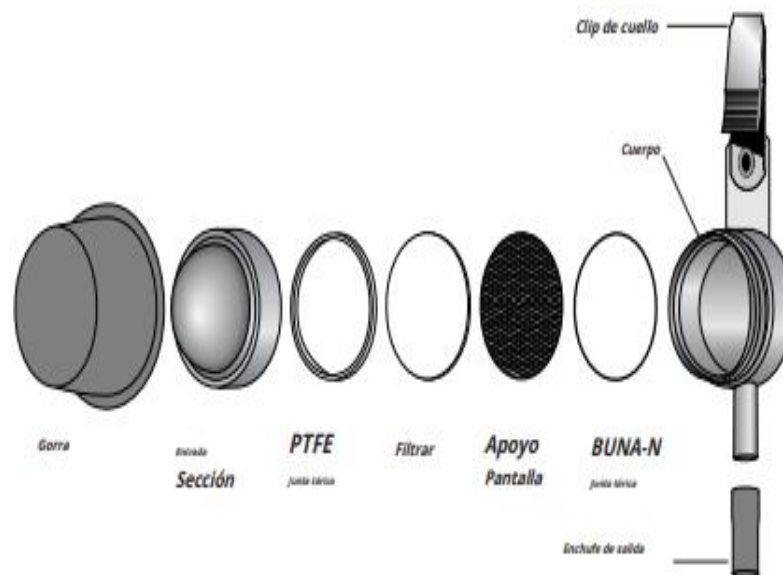


Figura 1. Composición del muestreador Button.

Tabla 4. Accesorios y descripción de los componentes del muestreador Button.

Descripción	Imagen
Escudo protector, para entornos de voladura abrasiva.	
Adaptador de calibración de muestreador de botón.	
Estuche de transporte de filtro, para filtros de 25 mm de diámetro, plástico conductor.	
PTFE de la o-anillo tórica de reemplazo, para el muestreador de botones.	
Repuesto de la o-ring BUNA-N, para button sampler	
Filtros de fibra de vidrio, diámetro 25 mm, 1,0 µm Tamaño nominal del poro líquido.	
Filtros de éster de celulosa mixta (MCE), diámetro 25 mm, tamaño de poro 1,2 µm.	
Filtros de PTFE con soporte PMP (Teflo®) # ‡ diámetro 25 mm, tamaño de poro 3 µm.	

Filtros de gelatina, esterilizados, diámetro 25 mm. †



Filtros de cloruro de polivinilo (PVC), diámetro 25 mm, tamaño de poro 5.0 μm .

Pantalla de soporte para muestreador de botones, 25 mm de diámetro.

Nota: La contrapresión en los filtros de PTFE puede variar dentro del mismo lote. Los filtros de gelatina se disuelven cuando se colocan en el agar. La temperatura máxima de funcionamiento es de 240 ° C (464 ° F).

6.1.1. Calibración.

1. Asegúrese de que la bomba haya funcionado durante 5 minutos antes de calibrar.
2. Con un tubo flexible, conecte la salida del muestreador de botones a la entrada de una bomba de muestra.
3. Coloque la salida del adaptador de calibración en la entrada del muestreador de botones y conecte la entrada del adaptador de calibración a un calibrador.
4. Calibre a 4 L/min siguiendo las instrucciones de funcionamiento de la bomba y el calibrador. Desconecte el calibrador y el adaptador de calibración.
5. Reemplace el filtro utilizado para establecer la velocidad de flujo con un filtro nuevo acondicionado y pesado para la recolección de muestras.

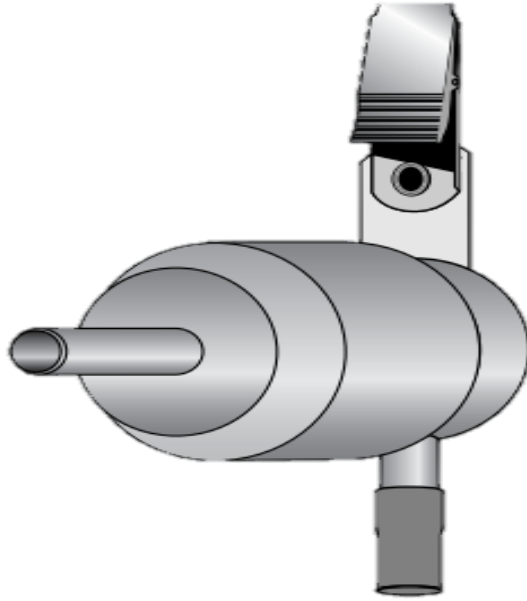


Figura 2. Imagen representativa del muestreador Button para su calibración.

6.2. Muestreo.

1. Asegúrese de que se haya calibrado el caudal.
2. Con un tubo flexible, conecte la salida del Button Sampler a la entrada de una bomba de muestra.
3. Para muestreo personal, coloque el Button Sampler en el cuello o bolsillo de un trabajador cerca de la zona de respiración. Sujete la bomba al cinturón del trabajador o colóquela en una bolsa protectora. Encienda la bomba y registre la hora de inicio, la ubicación del trabajador y el caudal.
4. Para el muestreo de áreas, coloque el muestreador de botones para evitar corrientes de aire cruzadas y la proyección directa de partículas en la entrada.
5. Al final del período de muestreo, detenga la bomba y registre el tiempo de parada.

6.2.1. Envío de la muestra.

1. Cuando se complete el muestreo, desenrosque con mucho cuidado la entrada del muestreador y use unas pinzas para quitar la junta tórica de PTFE.
2. Con unas pinzas, retire con cuidado el filtro del muestreador.
3. Empaque para envío según las instrucciones del método o laboratorio.
4. Envíe las muestras con la información de muestreo pertinente a un laboratorio acreditado para su análisis.

6.2.2. Análisis.

Dependiendo del interés, las muestras tomadas con el Button Sampler se pueden analizar mediante análisis gravimétrico, técnicas analíticas como fluorescencia de rayos X, absorción atómica (AA) o plasma acoplado inductivamente (ICP). Pueden usarse cultivos de crecimiento, microscopía y otros ensayos para la determinación de esporas de hongos, endotoxinas y bacterias. Si se utiliza el análisis gravimétrico, pese el filtro y reste el peso previo al peso posterior. El peso neto será el polvo recogido.

6.2.3. Limpieza y cuidados del muestreador Button.

Método 1. Se recomienda lavar con agua jabonosa suavemente, limpiando todas las partes del muestreador Button Sampler antes de seguir muestreando. El Button Sampler se puede cepillar y / o limpiar con un paño limpio sin polvo, secar al aire, secar con secador o limpiar con alcohol isopropílico. Tenga especial cuidado al limpiar la junta tórica de PTFE.

Método 2. El muestreador BUTTON también se puede esterilizar en autoclave hasta 273,2 F (134 C). Antes de esterilizar en autoclave el muestreador, retire el clip del collar con un destornillador Phillips y retire la junta tórica BUNA-N del cuerpo del muestreador (SKC no recomienda esterilizar en autoclave la junta tórica BUNA-N). El adaptador de calibración del muestreador se puede esterilizar en autoclave hasta la temperatura indicada anteriormente.

6.3. Filtros recomendados para el Muestreador Button.

6.3.1. Filtros de membrana de Éster de celulosa mixta (MCE).

Es el filtro estándar para la mayoría del muestreo de aerosoles en aplicaciones de higiene industrial, los filtros de membrana de éster de celulosa mixta (MCE o MEC) se componen de mezclas puras y biológicamente inertes de acetato de celulosa y nitrato de celulosa. Las membranas MCE son naturalmente bajas en fondo metálico y son compatibles con bases y ácidos diluidos e hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Los filtros MCE son hidrófilos y autoclavables.

Descripción: Filtros de MCE, 1.2 μm , 25 mm.

6.3.2. Filtros de membrana PVC.

Son adecuados para muestrear sílice, metales y polvo.

- Adecuado para múltiples métodos de muestreo de aire.
 - Sílice, metales, polvo.
 - Cumple con el método ID-215 (V. 2) de OSHA para el cromo hexavalente.
- Bajo peso de tara y captación de humedad para estabilidad gravimétrica.
 - <0.5% después de 24 horas a 48 % HR y 50 ° C (122 ° F).
- Casetes precargados de 25 y 37 mm disponibles.
 - los casetes de 25 mm son convenientes para muestrear dentro de un casco de soldadura.
- Análisis gravimétrico y químico en el mismo filtro utilizando NIOSH 7300 o 7301 para metales (elementos).

6.3.3. Filtro de fibra de vidrio.

Los filtros de profundidad de fibra de vidrio se utilizan cuando se requiere un alto caudal y filtración de micras / submicras. Son adecuados tanto para la filtración de aire como de líquidos. Seleccione entre filtros sin aglutinantes para una pureza que sea ideal para la determinación analítica y gravimétrica, o filtros con aglutinante para mayor resistencia en aplicaciones de larga duración, de alta presión o húmedas.

- Tolerancia a altas temperaturas.
 - Autoclavable.
- Tamaño de poro nominal líquido de 1,0 µm.
- Alta retención de partículas y resistencia a la humedad.
- Fibra de vidrio de borosilicato sin aglutinante para eliminar interferencias.
- Ideal para análisis gravimétricos.

6.3.4. Tipos de filtros de fibra de vidrio.

- Fibra de vidrio A/E.
 - Para el análisis gravimétrico de contaminantes atmosféricos y pruebas de sólidos de aguas residuales disueltas/suspendidas.
 - Altos caudales, resistencia a la humedad y capacidad de retención de suciedad (sólidos).
- A/B Fibra de vidrio.
 - Alta capacidad de retención de suciedad con vidrio más grueso.
 - Fabricado con microfibras de vidrio de borosilicato de la más alta calidad.

6.3.5. Filtros de gelatina.

Son ideales para mantener la viabilidad de los microorganismos recolectados, los filtros de gelatina proporcionan niveles de retención de bacterias inigualables para el análisis cuantitativo. El alto contenido de humedad ayuda a mantener la viabilidad de los microorganismos durante períodos de muestreo de hasta 30 minutos. Los filtros se disuelven fácilmente cuando se colocan en agar, lo que permite una transición suave del medio de muestra al medio de crecimiento. Para una máxima culturalidad y una recolección superior de bioaerosoles de tamaño inhalable, es recomendable combinar los filtros de gelatina de 25 mm con el muestreador SKC Button Sampler. Las características generales de este tipo de filtros se resumen en la tabla 5.

- Tasa de retención absoluta:
 - 99.9995% para esporas de *Bacillus subtilis*.
 - 99,94% para fagos T3 (colifagos).
 - 99,9% para fagos T1 (colifagos).
- Alto contenido de humedad.
 - Mantener la viabilidad de los microbios durante períodos de muestreo cortos.
- Completamente soluble en agua.
 - Disolver fácilmente cuando se coloca sobre agar.
 - Requisito previo para el muestreo de virus.
- Preesterilizadas por irradiación gamma.
- Ideal para monitorización en plantas farmacéuticas.
- Se puede usar para monitorear en áreas donde hay desinfectantes o antibióticos presentes.

Tabla 5. Características técnicas de los filtros de gelatina.

Material	Gelatina soluble en agua
Tamaño de poros	Si bien tiene un tamaño de poro nominal de 3 µm, se puede esperar una mayor eficiencia de captura de partículas

	subcrónicas debido a las separaciones que ocurren en la superficie y dentro del filtro. Es a través de la impactación inercial y la intercepción por difusión que estos filtros pueden eliminar partículas mucho más pequeñas que 3 µm.
Espesor	Aproximadamente 250 µm.
Esterilización	Presellado por radiación gamma. Filtros envueltos individualmente y empaquetados en unidades de cinco, cada uno en una bolsa de polietileno.
Resistencia térmica	Máximo 60°C (140°F).
Contenido de humedad	46 a 49%.
Condiciones de uso	La temperatura ambiente máxima es de 30 ° C (86 ° F); la humedad relativa máxima es del 85%.
Tiempo de muestreo	30 minutos a humedad relativa típica en interiores.
Caudal de muestreo	1 a 4 L/min para el muestreo por filtro de contaminantes biológicos utilizando un cassette de filtro estándar, un muestreador de botón o el IOM.
Almacenamiento	Los filtros de gelatina pueden almacenarse en condiciones ambientales de baja humedad; se recomienda el almacenamiento entre 4 y 8 °C (39,2 y 46,4 °F). Precaución: No guarde los filtros de gelatina por debajo de 4°C (39.2°F). La condensación durante la descongelación disolverá el filtro. Evite exponer los filtros a la humedad, los vapores químicos y las temperaturas extremas.
Vida útil	3 años a partir de la fecha de fabricación.
análisis	3 años a partir de la fecha de fabricación.

6.3.6. Aplicaciones.

- Calidad del aire interior (IAQ).

- Mediciones ambientales al aire libre.
- Monitoreo de salas limpias.
- Clínicas veterinarias.
- Hospitales.
- Fabricación farmacéutica.
- Militar.

6.3.7. Método indirecto.

Nota: Este método se utiliza para prevenir el choque osmótico en los organismos muestreados, para proporcionar submuestras para la eliminación de inhibidores como desinfectantes, para la dilución de la muestra donde se esperan recuentos altos o para permitir la siembra en diferentes medios nutritivos donde se requiere la identificación de especies.

1. Disuelva el filtro de gelatina en líquido estéril calentado entre 35 y 40 °C, como solución salina fisiológica o agua con peptona al 0,1%.
2. Agite la solución con un agitador magnético estéril para - Filtrar a agar - Incubar - Contar acelerar la disolución del filtro.
3. Procese la solución de acuerdo con el método de vertido en placa de Koch o la técnica de filtración por membrana.
4. Incube las muestras.
5. Evalúe las colonias que se forman.

Durante el proceso de disolución y agitación (método indirecto), las unidades formadoras de colonias (UFC) en el caso de bacterias, y unidades formadoras de placa (UFP) en el caso de fagos, se separan en microbios individuales, por lo que se obtendrá un recuento de UFC ó UFP más alto que si se coloca directamente el filtro expuesto en un medio de cultivo (método directo).

6.3.8. Clasificación del tamaño de los poros.

Las clasificaciones de tamaño de poro del filtro se basan en las clasificaciones de filtración de líquidos. Los filtros retendrán partículas mucho más pequeñas del aire

(por ejemplo, un filtro con clasificación líquida de 0,8 μm retendrá >50% de partículas tan pequeñas como 0,08 μm).

Por lo general, se aplica una clasificación nominal o aproximada a los filtros de profundidad. A diferencia de los filtros de membrana, los filtros de profundidad no contienen una estructura de poros definida uniformemente, sino fibras o partículas sinterizadas que se entrelazan para crear un camino tortuoso de aberturas que permiten el paso del aire, pero atrapan partículas a lo largo de la profundidad del filtro. Debido a esta estructura los filtros de profundidad generalmente se prueban para determinar el tamaño de los poros al pasar líquido que contiene partículas de cierto tamaño a través del filtro.

7. NEBULIZADOR TSI MODELO 9302.

Son dispositivos utilizados para la administración de soluciones o suspensiones de medicamentos en forma de una fina niebla, y puedan ser inhalados a través de una mascarilla o boquilla. En el presente proyecto se utilizará para aerolizar una suspensión, en la cual se encontrará disuelto el bacteriófago MS2, donde posteriormente se muestreará este aerolizado dentro de una cámara de contacto y después de un análisis microbiológico se verá si se recuperó dicho microorganismo.

El nebulizador TSI modelo 9302 es la forma más rentable de generar una corriente de aerosol polidisperso a partir de una simple fuente de aire comprimido. También es un atomizador más simple con un regulador de presión incorporado para controlar el aire de una fuente externa. El atomizador de chorro único 9302 produce partículas en concentraciones superiores a 107 partículas/cm³ a un caudal nominal de 5.86 L/min. El tamaño medio de gota aritmética de salida (D10) de 4 ~ 5 μm y 40,000 partículas / cm³ hace que el 9302 sea ideal para la alineación de sistemas LDV y PDPA, especialmente sistemas de tres componentes. Estos valores son típicos para el agua a una presión de entrada de 175 kPa (25 psi). El cómodo control de presión y el tubo de salida flexible permiten al usuario colocar la cantidad correcta de aerosol justo donde se necesita. El depósito translúcido permite al usuario ver

exactamente cuanto fluido hay en la unidad.

7.1. Características y beneficios.

- Concentraciones superiores a 107 partículas/cm³.
- Caudal nominal de 5.86 L/min.
- Fidedigno.
- Rentable.
- Tamaño de paquete pequeño.
- Cómodo control de presión.
- Conveniente tubo de salida flexible.
- Fácil de rellenar y limpiar.

8. BOMBA RECOMENDADA PARA EL MUESTREADOR BUTTON ES LA AIRCHEK® XR5000.

8.1. Descripción.

La bomba de muestro AirChek® XR5000 cuenta con una batería de ion Litio, que provee una gran fuerza para el muestro de partículas a flujos bajos para gases y vapores con la batería de alto poder hasta por 40 horas y con la batería de litio estándar 20 horas.

8.2. Especificaciones.

Es bomba de muestreo es adecuada para la toma de muestras de gases/vapores o partículas a flujos altos, puede monitorear hasta 4 tubos simultáneamente con el uso del controlador de flujo bajo/portatubo de 4 estaciones además de que posee un rango de flujo de 5-5000 mL/min, que la hace adecuada para:

- Flujos de gas o vapor y para altos flujos en muestro de partículas.
- Extiende la capacidad de la contrapresión (Arriba de 50 pulgadas de agua a 2 L/min).
- Cuenta con un sistema isotérmico de gran precisión para el control de flujo.

- Es seguro por su característica de corrección automática de flujo por cambios de temperatura proporciona volúmenes exactos.
- Extremadamente fácil de usar (cuenta con un teclado con 3 botones, temporizador para inicio/apagado hasta 9999 min, se puede habilitar el ciclo continuo con un botón, cuenta con una pantalla LCD que acumula el tiempo de ejecución transcurrido y viene incluido con luz brillante azul para indicar el estatus de la bomba).
- Posee funciones automáticas para conservar la integridad de la muestra (Es decir cuando ocurre una corrección de flujo hay cambios de temperatura, indicador de error de flujo, reinicio automático cuando existe alguna falla e indicador del estado de la batería).

8.2.1. Indicaciones.

Cargue completamente un nuevo paquete de baterías antes de hacer funcionar la bomba. Tal vez sea necesario cargar unas cuantas veces la batería antes de lograr su máxima capacidad, esta batería también cuenta con circuitos de seguridad intrínsecos dentro de la batería que hacen que la bomba se autodescargue durante el almacenamiento.

1. Para obtener una carga completa asegúrese de que la bomba no esté funcionando. Inserte el enchufe de la unidad de carga en el Jack de carga de la batería en la parte trasera de la bomba.
2. Inserte el enchufe a la fuente de alimentación en el Jack de la unidad de carga.
3. Tire de la oreja de la traba hacia un lado e inserte en el enchufe apropiado de la pared.
4. El paquete de baterías de dos celdas de iones de litio estándar se recargará en aproximadamente 4 horas. El paquete de baterías de cuatro celdas de litio se recargará en aproximadamente 8 horas. Se tiene que hacer funcionar la bomba 5 min después de completar la carga.

La unidad de carga de iones de litio indica el estado de carga de la batería a través de un LED en la unidad que destella siguiendo pasos específicos. Observe el LED constantemente durante más de 5 segundos para leer el estado de carga.

- Carga en curso: Encendido contantemente.
- Cargado aproximadamente el 80%: encendido dos segundos, o repeticiones.

9. PLAN DE MUESTREO.

El plan de muestreo debe basarse en objetivo del estudio y en el caso de muestreo en aire se debe especificar qué aerosoles se están estudiando, dónde y cuándo las muestras deben ser recogidas y cuál es la técnica más apropiada (Goyer et al. 2001), otros aspectos a considerar son:

- Identificación y localización de las posibles fuentes de aerosoles.
- Identificar los posibles mecanismos de propagación de aerosoles en el aire.
- Identificar las medidas correctoras y las medidas a aplicar.

Así mismo debe asegurarse que un número suficiente de muestra deberá ser tomado para determinar que la situación observada es representativa y que los resultados que se obtendrán se interpretaran de manera correcta, además de que las muestras tomadas deben ser suficientes para llegar a una conclusión inequívoca (Goyer et al. 2001).

10. NUMERO DE MUESTRAS.

La estadística puede ayudar a los investigadores al calcular el número de muestras que son necesarias para discernir diferencias de magnitud al ser fijada una probabilidad de detección y un nivel de confianza. Pequeñas diferencias, altas

probabilidades de detección y niveles de confianza altos requieren de un número alto elevado de muestras (Millipore et al. 1999).

En la Tabla 6 se resume, a modo de sugerencia, el número de muestras necesarios (Goyer et al. 2001) (Hernández, 2003).

Tabla 6. Número de muestras recomendadas para la determinación de aerosoles.

Objetivo de la medición	Propuesta
Exposición por inhalación (Peor de las situaciones)	Tomar 3 muestras o más muestras no aleatorias. Las muestras serán por duplicado, como mínimo para todos los análisis.
Exposición por inhalación (concentración promedio)	Muestrear 3 veces o más en un día, durante 3 o más días consecutivos que sean representativos. Las muestras serán por duplicado, como mínimo para todos los análisis.
Estimación del intervalo de confianza de la media	Tomar 6 o más muestras.
Estimación de la varianza de un conjunto de mediciones	Tomar 11 o más muestras.

(Goyer et al. 2001) (Hernández, 2003)

El número de muestras significa, cuantas muestras se han de tomar para cada tipo de parámetro de interés que se haya decidido muestrear y no el número de los diferentes tipos de muestras (Hernández, 2003).

11. LUGAR DE MUESTREO (CÁMARA DE CONTACTO).

La experimentación se llevó a cabo dentro una cámara de contacto para simular un ambiente contaminado con virus. La cámara de contacto (Figura 3) fue diseñada por el Instituto de Ingeniería-UNAM, para tener condiciones ambientales controladas durante el muestreo. Para la simulación de los espacios cerrados se utilizó esta cámara de fabricada en acrílico de 6 mm, con dimensiones de 25 x 20 x 30 cm, cuenta con puertos de entrada y distintos puntos de muestreo. Dentro de la cámara se lleva a cabo la generación de bioaerosoles mediante la nebulización de partículas virales del bacteriófago MS2.

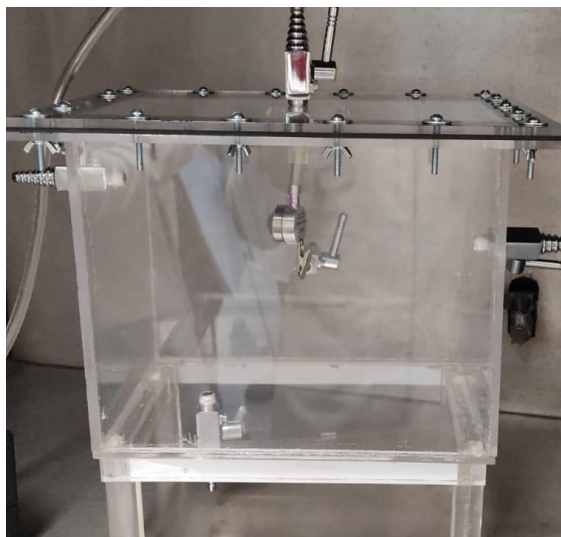


Figura 3. Cámara de contacto diseñada por del instituto de ingeniería para la captación de aerosoles.

12. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.

12.1. *Fundamentación de la técnica de DAL (Double-Agar-Layer).*

Para determinar la recuperación del bacteriófago dentro de la cámara se utilizó la metodología microbiológica doble capa de agar, como su nombre lo indica consta de dos capas, una capa base también conocida como agar duro y una capa blanda en la que se encontraran los disueltos los fagos, este método se usa generalmente

para la enumeración de fagos en donde se implica mezclar diluciones de nuestro bacteriófago en una suspensión con bacterias huésped en una matriz diluida de agar o agarosa y posteriormente distribuir esta mezcla en una placa de agar estándar para solidificar. Después del periodo de incubación, generalmente durante toda la noche, las placas se visualizan con zonas de lisis (o disminución de crecimiento bacteriano). La visualización de las UFP (unidades formadoras de placa) permitirá mucho más que una mera enumeración ya que esta es la base para el aislamiento de los fagos lo cual se puede apreciar a través de la turbidez del medio y la presencia o ausencia de un halo (Barquero et al. 2012). Además de que esta técnica nos permite apreciar si nuestro virus de interés se encuentra viable, ya que se utilizan virus enteros a diferencia de la PCR en donde solo se identifica la presencia de genes específicos de fagos codificados a partir de muestras ambientales, ya sean bacterias o virus purificados.

12.2. Fundamento de API 20E.

Para tener la certeza de que durante todos los análisis realizados se trabajó con la bacteria hospedera *Escherichia coli*, su identificación fue corroborada mediante el sistema API-20E; el cual es un procedimiento rápido que permite la identificación de la bacteria anfitriona del bacteriófago MS2, ya que como se sabe los virus necesitan de una célula hospedera para sobrevivir. Esta técnica se basa en una serie de pruebas bioquímicas miniaturas para la identificación de bacterias entéricas incluso hasta nivel de especie, además de es un método fácil de usar; consiste en 21 pruebas bioquímicas en miniatura, se compone de microtubos de material de plástico colocados en una tira, los cuales son inoculados con una suspensión bacteriana; en donde cada microtubo contiene sustratos específicos deshidratados en los cuales se llevan a cabo las reacciones bioquímicas que resultan como producto del metabolismo bacteriano (Salazar et al. 2008).

Cada reacción genera un color un color en el microtubo después de 18- 24 horas de incubación, la lectura de dichas reacciones se hace de acuerdo con la tabla de identificación "Analytical Profile Index API 20E".

13. CEPAS DE REFERENCIA CERTIFICADAS UTILIZADAS EN EL PROYECTO.

Para la implementación de la metodología se usaron cepas de referencia, ya que estas nos permiten garantizar la calidad de las actividades. En el caso de los métodos microbiológicos la única forma de estudiar el funcionamiento de los ensayos es estandarizar los microorganismos que se analizan (Puerto et al. 2009). En los laboratorios de microbiología, las cepas de referencia son herramientas indispensables para realizar el control de calidad interno, ya que ayudan a garantizar que los resultados obtenidos por el laboratorio son fiables y reproducibles (WHO, 2003).

Estas cepas fueron adquiridas directamente de American Type Culture Collection (ATCC); es una organización estadounidense que recoge, almacena y distribuye microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales de investigación.

13.1. Cepas de referencia.

- *Escherichia coli* bacteriophage MS2 (ATCC 15597-B1). El proveedor autorizado de cepas ATCC en México es Científica Senna.
- Bacteriófago MS2 (ATCC 15597-B1), se proveen liofilizadas por el fabricante.

14. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Para evaluar la recuperación del bacteriófago MS2, el cual funciona como virus alternativo al SARS-CoV-2 y que se utilizará como indicador de desinfección de espacios, es fundamental estudiar la efectividad de su recolección, para un diagnóstico adecuado en la evaluación de diferentes contaminantes en cualquier matriz ambiental. El muestreo se considera como la etapa más crítica ya que si no se lleva a cabo de manera eficaz se pueden emitir resultados falsos negativos o falsos positivos. Es por ello que la presente tesis se centrará en evaluar las condiciones de muestreo en aerosoles, así como la recuperación mediante muestreador Button del bacteriófago MS2 para utilizarlo como indicador de la presencia de virus SARS-CoV-2; por lo tanto, se propondrá una metodología para tomar muestras del bacteriófago MS2 como indicador del virus SARS-CoV-2 en aerosoles.

15. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuál es la eficacia de recuperación del bacteriófago MS2 en aerosoles cuando se utilizan el muestreador Button y los filtros de gelatina bajo condiciones controladas de laboratorio?

16. HIPÓTESIS.

El muestreo de bioaerosoles mediante la utilización de un muestreador Button y filtros de gelatina es eficaz para la recuperación de partículas virales del bacteriófago MS2 en un ambiente controlado de laboratorio.

17. OBJETIVOS.

17.1. General.

Establecer las condiciones de muestreo y recuperación del bacteriófago MS2 en aerosoles en un ambiente controlado utilizando el muestreador Button, como indicador viral de la presencia de SARS-CoV-2.

17.2. Particulares.

1. Determinar las condiciones de succión de la bomba muestreo AirChek® XR5000 para la colecta del bacteriófago MS2 utilizando el filtro Gelatina estéril 25mm.
2. Fijar las condiciones de nebulización para la generación de bioaerosoles de las partículas virales del bacteriófago MS2 dentro de una cámara de contacto.
3. Evaluar la recuperación mediante muestreador Button de las partículas virales del bacteriófago MS2 aerosolizadas dentro de una cámara de contacto.
4. Confirmar la recuperación del bacteriófago MS2 mediante la técnica de doble capa de agar (DAL-Double Agar Layer) analizando el filtro Gelatina estéril 25mm.

18. DISEÑO DE ESTUDIO.

Se establecieron las condiciones de muestreo y recuperación del bacteriófago MS2 en aerosoles utilizando el muestreador Button. Se planteó el uso de una cámara de contacto diseñada y construida para tal fin por el Instituto de Ingeniería-UNAM, dentro de la cámara se llevaron a cabo la generación de bioaerosoles mediante la nebulización de partículas virales del bacteriófago MS2. Se utilizó el nebulizador TSI modelo 9302, este nebulizador cuenta con un depósito en el cual se colocó una solución acuosa con una cantidad conocida de partículas virales; una vez generados los bioaerosoles se procedió a probar la succión de los mismos

aplicando diferentes velocidades y flujos de succión a través de la bomba de muestreo AirChek® XR5000, la bomba de succión se conectó al muestreador Button dentro del cual se colocó un filtro de gelatina que se encarga de la captura de las partículas virales. Se probaron diferentes tiempos de succión para la recuperación del bacteriófago, posteriormente los filtros de gelatina se procesaron aplicando la técnica de doble capa de agar (DAL); los virus recuperados en la gelatina se sembraron en un cultivo de bacterias (*Escherichia coli*) en su fase logarítmica y posteriormente a un periodo de incubación se realizó el conteo de las zonas de lisis provocadas por los virus, y con ello se confirmó la recuperación de estos últimos.

19. UNIVERSO (POBLACIÓN O MUESTRA).

El presente estudio se compone de diferentes elementos que determinarán las condiciones de muestreo del bacteriófago MS2 como virus sustituto del SARS-CoV-2, generación de bioaerosoles a través de nebulización, recuperación del bacteriófago mediante succión y captura con muestreador Button en filtros de gelatina, visualización de la infectividad del bacteriófago en la bacteria hospedera mediante las zonas de lisis; la población problema son los bacteriófagos que representan al virus SARS-CoV-2 disperso en los bioaerosoles de un ambiente contaminado.

20. VARIABLES.

20.1. Dependientes.

- Tiempo, velocidad y flujo de succión de los bioaerosoles con el muestreador Button y los filtros de gelatina.
- Concentración del bacteriófago MS2 nebulizado dentro de la cámara de contacto.

20.2. Independiente.

- Conteo de las zonas de lisis ocasionadas por el bacteriófago recuperado a partir de los bioaerosoles generados dentro de la cámara de contacto.

21. ANÁLISIS CUALITATIVO – DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO A UTILIZAR.

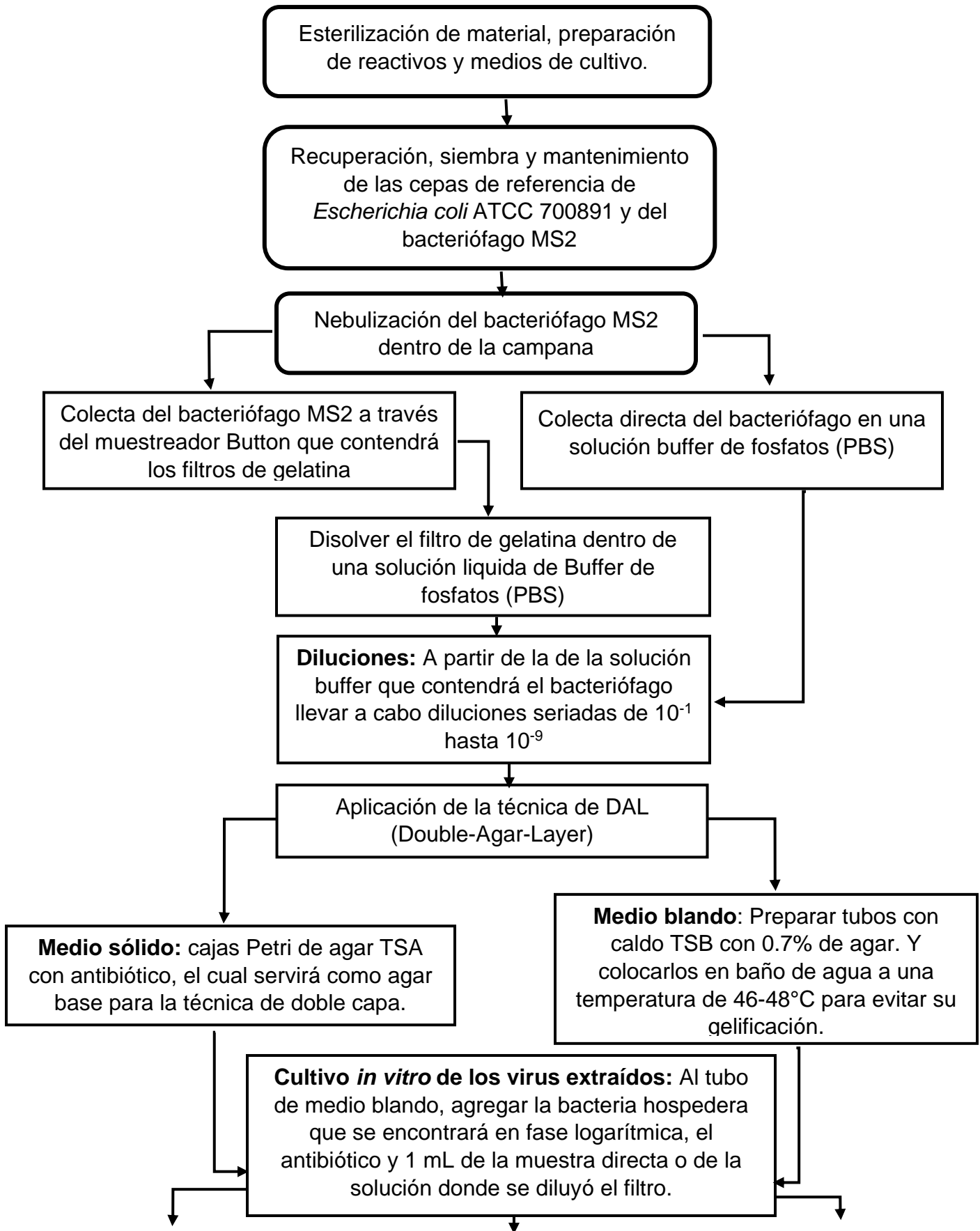
Debido a que el objetivo principal de la investigación es el desarrollo de una metodología que involucra probar diferentes condiciones y variables. Los resultados que se presentarán serán presencia – ausencia de las diferentes condiciones probadas. De las condiciones que resulten idóneas para la recuperación del bacteriófago a partir de los bioaerosoles, se establecerá la metodología de muestreo. Las zonas de lisis que ocasionen los bacteriófagos recuperados en la bacteria hospedera se contarán y se determinará un porcentaje de recuperación que se calculará en función de la densidad inicial del bacteriófago nebulizada dentro de la cámara.

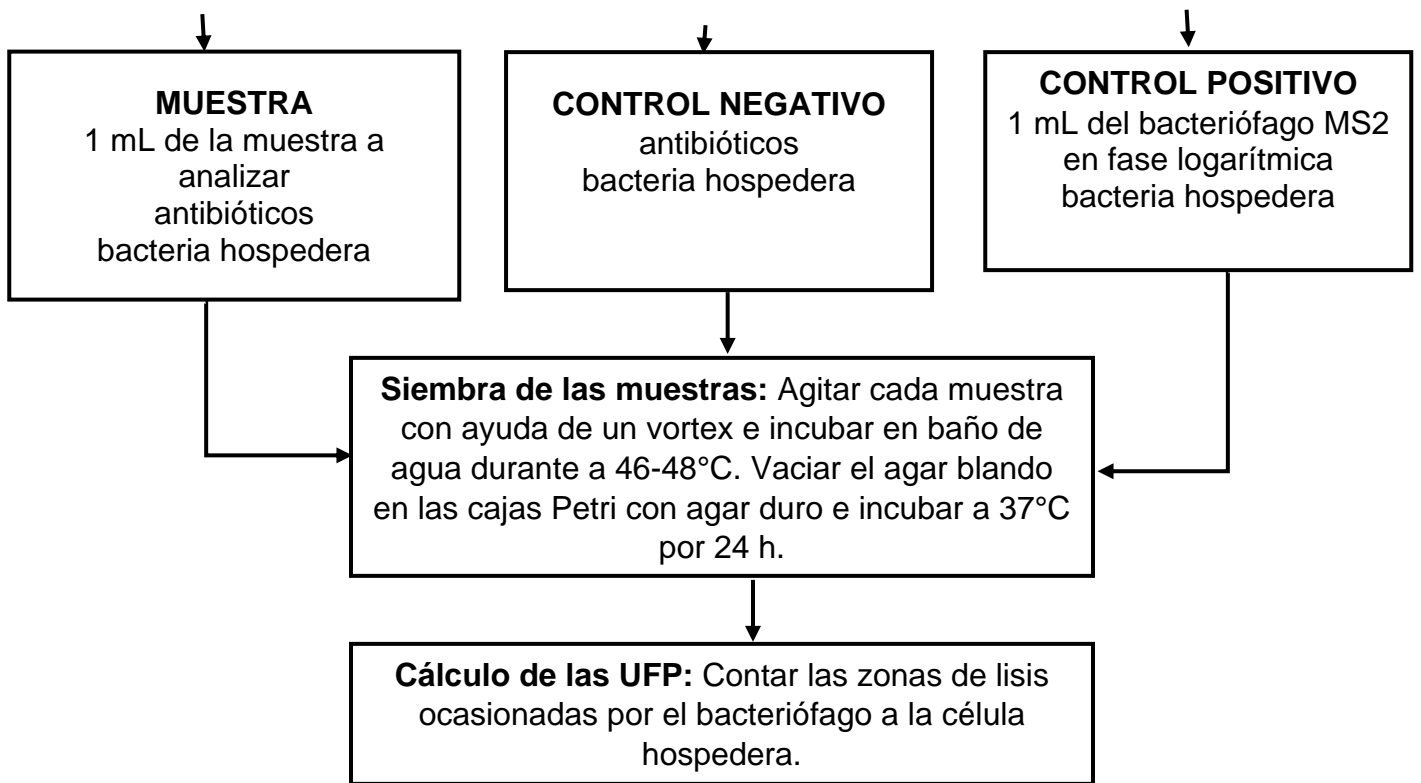
22. PROCEDIMIENTO.

Para el desarrollo de la técnica de muestreo en aire del bacteriófago MS2, como indicador del virus SARS-CoV-2, se llevó a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica de los componentes que se seleccionaron en el presente diseño experimental. Dicha selección se realizó tomando en cuenta el fago MS2, así como la utilización del muestreador Button y los filtros de gelatina debido a que es un método fácil, eficiente y sensible para el monitoreo de microorganismos patógenos en el aire.

La propuesta metodológica aplicable a condiciones controladas de laboratorio, se compone principalmente del siguiente arreglo experimental. 1) identificación de la célula hospedera, 2) preparación de una suspensión del bacteriófago MS2 dentro del nebulizador TSI, 3) colocar el muestreador Button (con el filtro de gelatina) dentro de la cámara (punto representativo), 4) nebulizar la suspensión antes mencionada dentro de un ambiente controlado (cámara de contacto), 5) utilizar la bomba AirChek® y el muestreador Button para coleccionar las muestras de bioaerosoles del bacteriófago MS2 mediante succión a través de un filtro de gelatina, 6) depositar el filtro de gelatina en una solución buffer (PBS) para su disolución, 7) análisis microbiológico de la solución anterior llevando a cabo ensayos control para saber si no hay una afectación por el proceso de nebulización y realizar el conteo respectivo de partículas del MS2 viables; posteriormente determinar la recuperación del bacteriófago MS2 siguiendo una metodología de siembra por la técnica doble capa de agar, 8) llevar a cabo la lectura de las zonas de lisis (UFP/mL) generadas por los bacteriófagos recuperados durante el muestreo, 9) cálculo de densidad del bacteriófago en las diferentes pruebas realizadas.

22.1. DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA.





22.2. Recuperación de las cepas de referencia.

La cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 700891 fue proporcionada por científica Senna, la cepa liofilizada fue recuperada en condiciones asépticas en 1 mL de caldo TSB con antibiótico Amp/Strep, se mezcló perfectamente y posteriormente se transfirió la cepa rehidratada a un tubo de ensaye que contenía 6 mL de caldo TSB con antibiótico. Seguidamente algunas gotas de esta suspensión fueron inoculadas en placas de agar TSA para obtener cultivos puros de la cepa bacteriana, y se incubaron por 24 horas a 37 °C, las colonias en el medio de cultivo poseen las siguientes características macroscópicas: circulares, enteras, brillantes, poco convexas y translúcidas.

La cepa fue resembrada cada 7 días, de igual manera se realizaron cultivos de reserva de la bacteria hospedera en donde a partir de una colonia aislada en placas de TSA se inocularon en caldo TSB con antibiótico Amp/Strep y se hizo crecer en fase logarítmica. Posteriormente se cosechó añadiendo glicerol en una proporción 1:4 y se almacenaron en viales de 5 mL estos cultivos se congelan a -80°C.

La cepa del bacteriófago MS2 (ATCC 15597-B1) de igual manera se proveen liofilizadas por el fabricante. Para su recuperación el liofilizado se rehidrató añadiendo 1 mL de caldo TSB, esta suspensión es considerado el stock del fago MS2.

Previo a su recuperación se preparó una siembra en agar TSA de la bacteria hospedera, posteriormente se tomaron de 3-5 colonias aisladas y se inocularon en viales con 2.5 mL de caldo TSB. Se incubó a 37°C por 18 a 24 h, posterior a ello se tomó 1 mL del cultivo y se transfirió a una botella lechera que contenía la célula hospedera en crecimiento activo (fase logarítmica). Se centrifugó a 3500 x G durante 10 minutos y se recuperó utilizando filtros de PVD (polivinilo bifloruro) de 0.22 µm, posteriormente se guardó en viales de 1 mL. Se estima que cada vial tiene una densidad de 1×10^6 partículas virales, finalmente se guardaron en ultracongelación a -80°C hasta su uso.

22.3. Identificación de la cepa hospedera *Escherichia coli* ATCC 700891 mediante la técnica de API 20E.

Se realizó la siembra por estría en cuatro cuadrantes por agotamiento de la bacteria hospedera a partir del cultivo liofilizado, se incubó por un periodo de 24 horas a 37°C, posteriormente se tomaron de 3-5 colonias perfectamente aisladas y se inocularon con ayuda de un palillo de madera estéril en 6 mL de solución salina estéril al 0.85% ajustando a 1 según la escala nefelométrica de McFarland.

La preparación de la cámara de inoculación del sistema API 20E se identificó con los datos necesarios para dar un seguimiento al cultivo (Nombre de la bacteria, fecha y quien realizó). Se llenaron los pozos de la cámara de plástico con agua destilada para que esta proporcione el ambiente húmedo necesario a la tira reactiva con ayuda de una piseta.

Siguiendo con el análisis, se colocó la tira reactiva de API 20E dentro de la cámara de plástico y se inocularon cada uno de los microtubos con la suspensión bacteriana preparada esto con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Los microtubos los cuales se encontraban marcados con un recuadro fueron llenados hasta la cúpula (CIT, VP y GEL) mientras que los microtubos los cuales se encuentran subrayados (ADH, ODC, LDC, H₂S y URE) solamente se llenaron hasta el borde y posteriormente se le añadió 1 gota de aceite mineral, este último para generar un ambiente de anaerobiosis. El resto de los microtubos fueron llenados hasta el borde y se procedió a incubar de 18-24 horas a 37°C.

Por último, se observó si ocurrió cambio de color en los microtubos al compararla con la tabla de resultados dada por el proveedor. Para las pruebas de TDA (FeCl₃), Indol (reactivo de James) y VP (KOH y Alfa Naftol) se le añadieron reactivos complementarios para poder dar un resultado positivo o negativo. También se realizó la prueba de oxidasa considerada una prueba complementaria, en donde se utilizó un papel filtro y se colocó en una caja Petri, con ayuda de un palillo de madera

estéril se tomó una colonia aislada del medio de cultivo que se utilizó originalmente y se distribuyó en el papel filtro que se encontrara previamente embebido con el reactivo para dicha prueba (*N, N*-Dimetil-*p*-fenilendiamina).

Del conjunto del resultado se sumaron los tripletes las pruebas positivas (7 tripletes) y se obtuvo el perfil numérico que posteriormente se buscaría en la base de datos (Analytical Profile Index API 20E) que dio la confirmación final del género y especie de la bacteria aislada.

22.4. Muestreo y recuperación del Bacteriófago MS2 utilizando el muestreador Button y los filtros de gelatina en un ambiente controlado (cámara de contacto).

Se realizó la esterilización de medios de cultivo y material a utilizar, a partir de un cultivo de la bacteria hospedera previamente identificado por la técnica API 20E, se tomó una colonia perfectamente aislada y se inoculó en viales con 2.5 mL de caldo TSB por un periodo de 16-18 horas a 37°C, después de dicho periodo de incubación se transfirió 1 mL de esta suspensión a botellas lecheras que contenían 30 mL de caldo TSB con antibiótico (Amp/Strep) y se metieron a incubar durante un periodo de 3 horas y media a 37°C a 80 rpm.

Se realizó un control negativo de referencia, este se hizo antes del muestreo para así evitar resultados falsos, para esto se colocaron 20 mL PBS en el nebulizador TSI y se procedió a nebulizar durante un periodo de 3 minutos y medio en un vaso de precipitado con 9 mL de PBS y se procedió a realizar la técnica de DAL que se describe más adelante.

Para el muestreo, el nebulizador TSI el cual fue el encargado de la generación de aerosoles se enjuagó con una solución estéril y a su contenedor se le agregaron 19 mL de solución buffer de fosfatos y 1 mL del bacteriófago que se encontraba en los crioviales, finalmente este se cerró y se esperó a muestrear. Por otro lado, se colocó el filtro de gelatina dentro del muestreador Button previamente esterilizado, el cual se colocó dentro de la cámara de contacto; se procedió a cerrar la cámara. El nebulizador se conectó en el puerto de suministro lateral del lado izquierdo. La

bomba de muestreo para la succión de los aerosoles se conectó en el puerto de muestreo que se encuentra en la parte superior de la cámara.

Siguiendo con la metodología se inició con la nebulización para llevar a cabo el muestreo durante un periodo de 5 minutos con 8 segundos, concluyendo dicho tiempo de muestreo se procedió a disolver el filtro de gelatina que contiene los bacteriófagos recuperados en 9 mL de PBS y se procedió a realizar la técnica de DAL. Para esta técnica se tomó 1 mL de la solución antes mencionada y se vació en tubos que contenían 9 mL de PBS y se procedió a realizar diluciones seriadas ($10^{-1} - 10^{-9}$).

Nota. se cambió la punta de la micropipeta utilizada al realizar cada dilución esto para evitar errores en la lectura.

A partir de las diluciones, se sembraron 1000 μ L de las disoluciones seriadas antes preparadas, en 6 mL de agar blando (caldo TSB con agarosa al 7%). Los cuales se prepararon el mismo día y se mantuvieron en un baño de agua entre 46 y 48°C. Se añadió la suspensión bacteriana hospedera y el antibiótico Amp/Strep, se agitaron los tubos con ayuda de un vórtex y se procedió a incubar en un baño de agua por un periodo de 5 minutos a una temperatura de 46 y 48°C.

Posterior al periodo de incubación el agar blando se vació en cajas Petri previamente identificadas, estas contenían agar TSA (medio duro) y se procedió a homogenizar y esperar su gelificación. Las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C. Posterior a la incubación, se procedió a leer las lisis producidas a la bacteria hospedera por el bacteriófago recuperado durante el muestreo en la cámara de contacto.

También se realizó un control positivo, este se hizo al final de los muestreos, para esto se nebulizó de manera directa el bacteriófago MS2 en un vaso de precipitados que contenía 9 mL de PBS durante un periodo de tres minutos y medio, el cual se sembró de la misma manera que las muestras siguiendo la técnica de DAL antes mencionada.

23. RESULTADOS Y ANALISIS.

El sistema API 20E el cual es un sistema estandarizado que nos permite la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas nos permitió verificar a la bacteria hospedera *Escherichia coli* que fue utilizada en la presente metodología. Esta prueba se realizó periódicamente (cada semana) con el fin de verificar que el cultivo no se contaminara y seguir trabajando con la cepa correcta.

Esta prueba fue de importancia en este proyecto y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7, finalmente se obtuvo el código sumando los triplete de cada prueba, el código obtenido fue: 5-0-4-4-5-5-2 que al buscarse en la base de datos del sistema de API 20E (Analytical Profile Index API 20) corresponde a la bacteria *Escherichia coli*, por lo cual se pudo asegurar que se trabajó con la cepa hospedera correcta al realizar cada prueba.



Figura 4. Resultados de la prueba de API20E

Tabla 7. Resultados obtenidos en la tira reactiva API 20E.

Prueba	Resultado
ONPG	Positivo
ADH	Negativo
LDC	Positivo
ODC	Negativo
CIT	Negativo

<i>H2S</i>	Negativo
<i>URE</i>	Negativo
<i>TDA</i>	Negativo
<i>IND</i>	Positivo
<i>VP</i>	Negativo
<i>GEL</i>	Negativo
<i>GLU</i>	Positivo
<i>MAN</i>	Positivo
<i>INO</i>	Negativo
<i>SOR</i>	Positivo
<i>RHA</i>	Positivo
<i>SAC</i>	Negativo
<i>MEL</i>	Positivo
<i>AMY</i>	Negativo
<i>ARA</i>	Positivo
<i>OX</i>	Negativo

Para establecer el recurso metodológico para la recuperación y detección en aerosoles del bacteriófago MS2 como virus sustituto del SARS-CoV-2 se realizaron diferentes pruebas de cada uno de los aparatos utilizados. En el caso del nebulizador el cual fue el encargado de la generación de bioaerosoles se hicieron 10 análisis para determinar el volumen máximo y mínimo con el que se puede trabajar, y es así como se determinó que el volumen a utilizar dentro del nebulizador sería de 20 mL. También se calculó el tiempo que se tarda en nebulizar 1 mL de la muestra que se desea aerosolizar. Estas pruebas fueron de importancia ya que por cuestiones prácticas de experimentación se llegó a determinar que el nebulizador TSI nebuliza 1 mL de la muestra, en un periodo de 3 minutos y medio, estas pruebas se realizaron 20 veces por duplicado, pesando y midiendo el volumen antes y después de aerosolizar cada cierto tiempo.

En cuanto al muestreador Button se realizaron tres pruebas dentro de la cámara de contacto; nebulizando solamente PBS durante diferentes tiempos (3, 5 y 10 min), esto solo para verificar que el filtro no sufriera daños tales como su desintegración dentro del muestreador Button al realizar el muestreo.



Figura 5. Montaje del nebulizador TSI a la toma de aire.



Figura 6. Nebulizador TSI llenado con la solución de PBS.



Figura 7. Muestreador Button dentro de la cámara de contacto.

También se realizaron pruebas de disolución a los filtros de gelatina, estas pruebas fueron dos y se realizaron por duplicado, tratando de disolverlos de manera directa en una solución buffer de fosfatos (PBS). La idoneidad de estos filtros resultó ser eficaz, ya que al entrar en contacto directo con el PBS estos comenzaban a disolverse por completo en cuestión de minutos. Siempre que se trabajó con estos filtros se realizó en condiciones asépticas para evitar la contaminación.

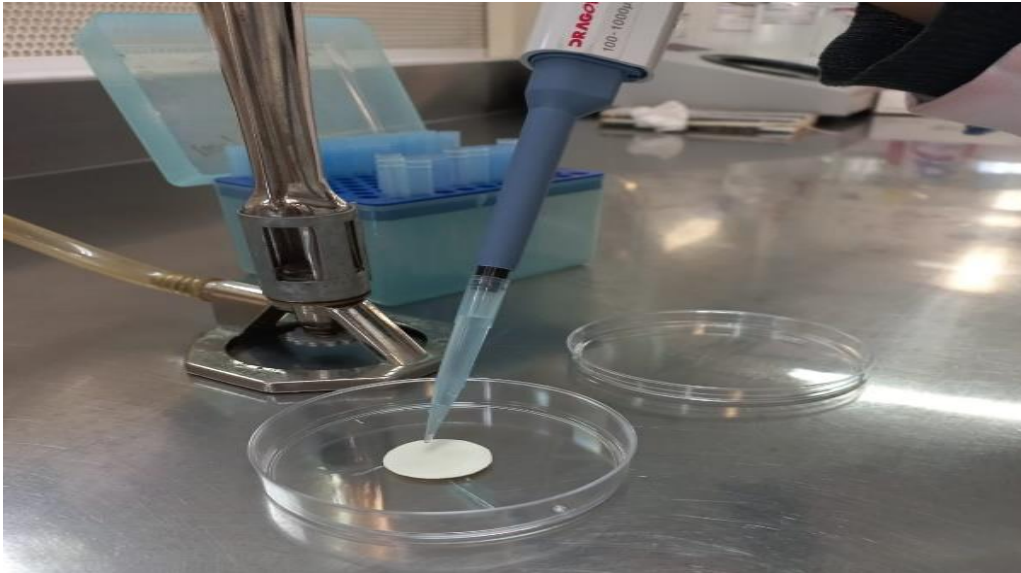


Figura 8: Prueba de disolución a los filtros de gelatina.



Figura 9. Visualización del ambiente estéril con ayuda del mechero Fisher.

En cuanto al muestreo de aerosoles los parámetros se establecieron conforme a la bibliografía investigada, se aplicaron condiciones de muestreo y recuperación del bacteriófago MS2 de acuerdo a la información recabada. Para la simulación del espacio controlado se utilizó una cámara de contacto fabricada en acrílico de 6 mm, con dimensiones de 25 x 20 x 30 cm, que cuenta con puertos de entrada y distintos puntos de muestreo. Dentro de la cámara se llevó a cabo la generación de bioaerosoles mediante la nebulización de partículas virales del bacteriófago MS2, el nebulizador cuenta con un depósito en el cual se colocó una solución acuosa de PBS con una cantidad conocida de partículas virales (1×10^6). Una vez generados los bioaerosoles, se procedió a la succión de los mismos a través de una bomba, la cual se encuentra conectada al muestreador Button, dentro de este se colocó el filtro de gelatina que captura las partículas virales.



Figura 10. Montaje de la metodología empleada para la captura de aerosoles dentro de la cámara de contacto.

Para la presente metodología también se tomó en cuenta el flujo del muestreador Button, el flujo del nebulizador, así como el tiempo que le toma a este último nebulizar un mililitro de muestra. Los cálculos arrojaron que para nebulizar 1 mL de muestra dentro de la cámara contacto, teniendo en cuenta los parámetros anteriormente mencionados, se requiere de un tiempo de 5 minutos con 8 segundos.

Posteriormente los filtros de gelatina se procesaron aplicando la técnica de doble capa de agar (DAL-Double Agar Layer); los virus recuperados en la gelatina se sembraron en un cultivo de bacterias (*Escherichia coli*) en su fase logarítmica, posterior a un periodo de incubación se realizó el conteo de las zonas de lisis provocadas por los virus, (Tablas 8,9 y 10) y con ello se confirmó la recuperación.

Tabla 8. Resultados de los controles positivos realizados para cada muestra y su repetición.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Control positivo muestras 1 y 2 y sus repeticiones	I	I	ID	71	12	4	0	0	0
Control positivo muestras 3 y 4 y sus repeticiones	I	I	ID	90	18	9	1	0	0
Control positivo muestras 5 y 6 y sus repeticiones	I	I	ID	86	25	15	1	0	0

Nota: I= Incontable; ID= Incontables pero distinguibles.

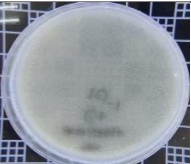
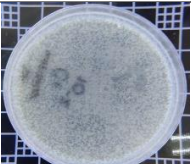
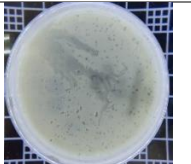
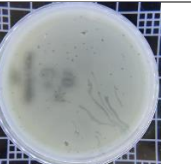
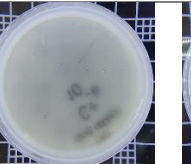
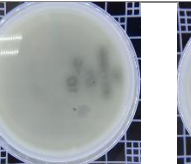
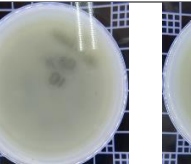
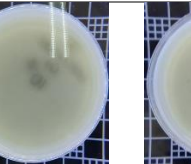






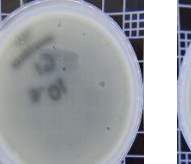
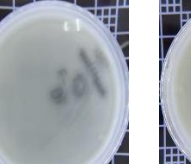
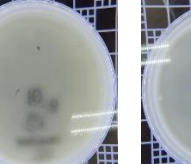

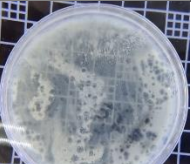
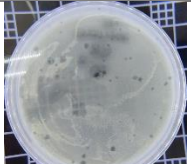
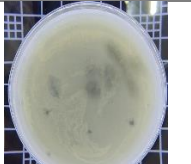
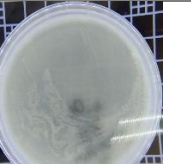
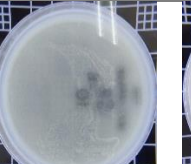
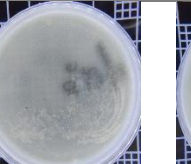
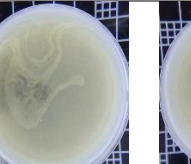
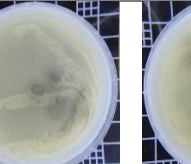

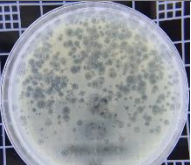

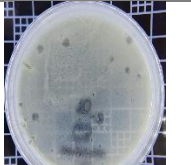
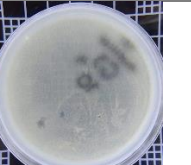
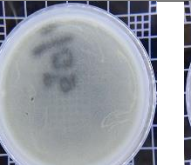

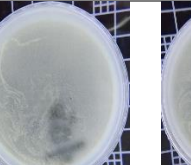
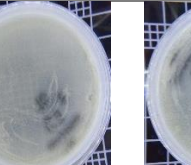



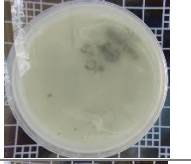
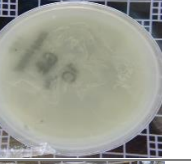
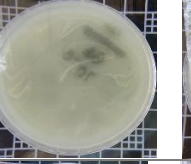
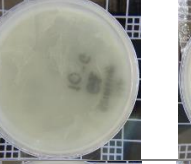
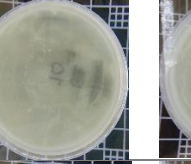
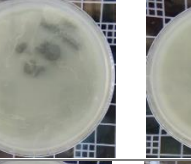





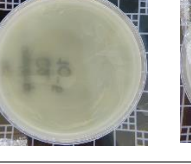

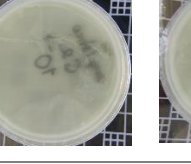
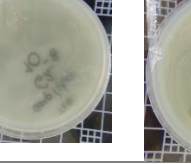

Tabla 9. UFP contadas por placa después del muestreo en la cámara de contacto.

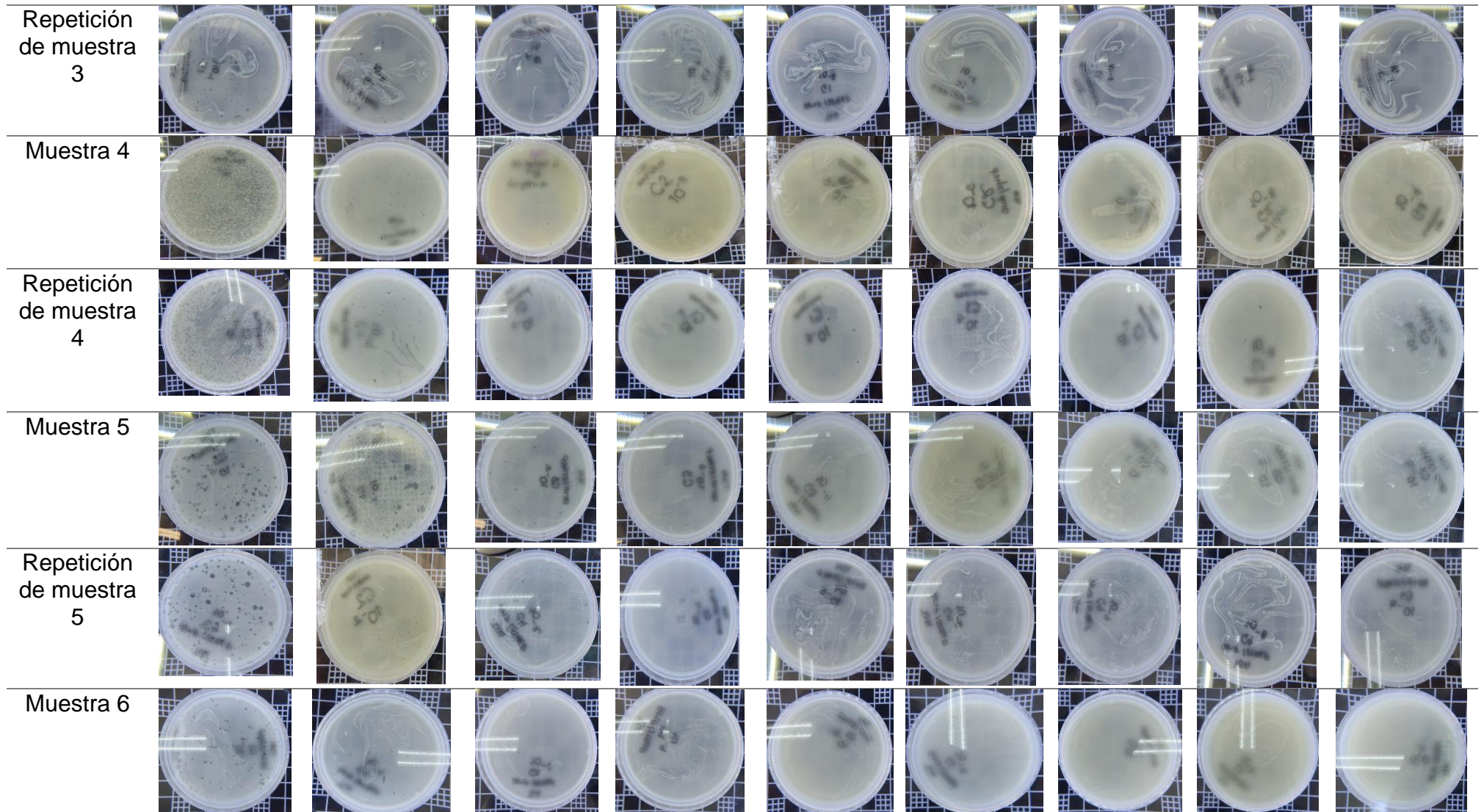
Prueba/Dilución	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸	10⁻⁹
Muestra 1	I	75	19	2	1	0	0	0	0
Repetición de muestra 1	I	67	9	0	0	0	0	0	0
Muestra 2	I	63	12	2	0	0	0	0	0
Repetición de muestra 2	I	77	14	2	1	0	0	0	0
Muestra 3	I	67	10	1	0	0	0	0	0
Repetición de muestra 3	I	60	3	1	1	0	0	0	0
Muestra 4	I	58	11	1	0	0	0	0	0
Repetición de muestra 4	I	82	20	2	1	0	0	0	0
Muestra 5	I	57	12	1	0	0	0	0	0
Repetición de muestra 5	I	75	14	0	0	0	0	0	0
Muestra 6	I	35	3	1	0	0	0	0	0
Repetición de muestra 6	I	38	5	1	0	0	0	0	0

Nota: I= Incontable; ID= Incontables pero distinguibles.

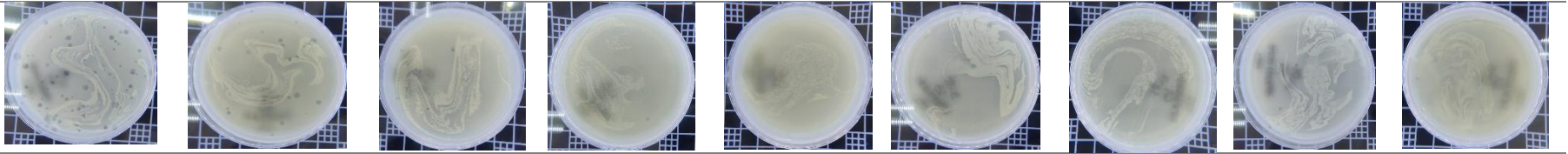
El conteo y observación de las muestras para la obtención de las UFP/ mL se comparó con un control positivo (tabla 8), este se realizó cada vez que se procedió a muestrear y a analizar las muestras. Se puede observar que el tratamiento control que se determinó obedece a las características propias de la muestra control, ya que a medida que se encuentra el bacteriófago purificado se observa una mayor acción lítica de las bacterias que tienen como anfitrión.

Tabla 10. Imágenes tomadas de los ensayos realizados durante la experimentación.

Prueba/Imagen	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Control									
Muestra 1									
Repetición de muestra 1									
Muestra 2									
Repetición de muestra 2									
Muestra 3									



Repetición
de muestra
6



Los resultados se reportaron en unidades formadora de placa (UFP) por un volumen determinado, en el caso del presente estudio solo se muestro 1 mililitro de la solución contenida dentro del nebulizador TSI de los cuales 19 son de PBS y 1 mL de bacteriófago concentrado, que se mantiene en crioviales (densidad aproximada 1×10^6). El factor de dilución 10^{-2} del bacteriófago MS2 fue seleccionado para el conteo de las UFP debido a que las cajas Petri presentan una alta formación de UFP líticas, pero que nos permite su conteo para posteriormente realizar la determinación de las UFP/ mL mediante la ecuación 1. Se puede observar (tabla 11) que estos varían entre cada muestra teniendo un rango entre los 3.5×10^3 - 8.2×10^3 que, al compararse con su respectivo control positivo, se puede observar que si existe diferencia entre las muestras y el control aplicado.

$$\text{UFP/mL} = (\text{Lisis contadas}) / (\text{Factor de dilución}) \times 1 \text{ mL}$$

Ecuación. 1

Tabla 11. Determinación de las UFP/mL en la dilución 10^{-2} .

<i>Prueba/Dilución</i>	<i>UFP/mL</i>
<i>Muestra 1</i>	7.5×10^3
<i>Repetición de muestra 1</i>	6.7×10^3
<i>Muestra 2</i>	6.3×10^3
<i>Repetición de muestra 2</i>	7.7×10^3
<i>Muestra 3</i>	6.7×10^3
<i>Repetición de muestra 3</i>	6×10^3
<i>Muestra 4</i>	5.8×10^3
<i>Repetición de muestra 4</i>	8.2×10^3
<i>Muestra 5</i>	5.7×10^3
<i>Repetición de muestra 5</i>	7.5×10^3
<i>Muestra 6</i>	3.5×10^3
<i>Repetición de muestra 6</i>	3.8×10^3

Se realizó un análisis estadístico, en el cual se comparó el control positivo con las muestras realizadas en la experimentación (tabla 12), lo que se pretende analizar mediante este estudio, es ver si existieron diferencias entre la muestra control y el muestreo dentro de la cámara de contacto. Para la determinación de las UFP/mL del control positivo se utilizó de igual manera la ecuación 1.

Tabla 12. Comparación de las UFP/mL vs su control positivo.

CONTROL	MUESTRAS
7.10E+05	7.50E+03
7.10E+05	6.70E+03
7.10E+05	6.30E+03
7.10E+05	7.70E+03
9.00E+05	6.70E+03
9.00E+05	6.00E+03
9.00E+05	5.80E+03
9.00E+05	8.20E+03
8.60E+05	5.70E+03
8.60E+05	7.50E+03
8.60E+05	3.50E+03
8.60E+05	3.80E+03

El análisis estadístico aplicado a este experimento fue un ANOVA, (Tablas 13 y 14), ya que este estudio nos permitiría averiguar si las diferencias entre grupos de datos son estadísticamente significativas, ya que funciona analizando los niveles de varianza dentro de los grupos a través de muestras tomadas en cada uno de ellos.

Se comparó el control positivo con los análisis realizados, en donde se puede apreciar que la F crítica resultó ser menor que la F calculada ($4.84 < 1086.75405$) lo cual nos indicó en el presente estudio, que existen diferencias significativas en cuanto al control y las pruebas. Esto tiene sentido de acuerdo a como se realizó el muestreo de cada uno de ellos, el control se realizó de manera directa por lo cual se esperaría una mayor recuperación, mientras que las muestras fueron tomadas dentro de un ambiente controlado (cámara de contacto) utilizando los filtros de gelatina y el muestreador Button.

Tabla 13. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo.

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	2	717500	358750	2.4675E+11
Fila 2	2	716700	358350	2.4732E+11
Fila 3	2	716300	358150	2.476E+11
Fila 4	2	717700	358850	2.4661E+11
Fila 5	2	906700	453350	3.9899E+11
Fila 6	2	906000	453000	3.9962E+11
Fila 7	2	905800	452900	3.998E+11
Fila 8	2	908200	454100	3.9765E+11
Fila 9	2	865700	432850	3.6491E+11
Fila 10	2	867500	433750	3.6338E+11
Fila 11	2	863500	431750	3.668E+11
Fila 12	2	863800	431900	3.6654E+11
Columna 1	12	9880000	823333.333	7296969697
Columna 2	12	75400	6283.33333	2141515.15

Tabla 14. Análisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	3.9748E+10	11	3613434394	0.98039914	0.51279994	2.81793047
Columnas	4.0054E+12	1	4.0054E+12	1086.75405	2.3885E-12	4.84433567
Error	4.0542E+10	11	3685676818			
Total	4.0857E+12	23				

Por lo tanto, se puede determinar que la metodología propuesta en este proyecto es factible para el monitoreo de virus en el aire ya que se logra su recuperación y detección, así como la obtención de las UFP/ mL, además de que esta última resulta ser viable para el seguimiento de otros virus patógenos como es el caso del SARS-CoV- 2.

24. CONCLUSIONES.

Como resultado de la investigación bibliográfica y experimental realizada, es posible concluir que la propuesta metodológica para la recuperación y detección en aerosoles, permite la recuperación del bacteriófago MS2 el cual funciona como virus alternativo al SARS-CoV-2 y posteriormente se utilizará como un indicador en la desinfección de espacios.

En cuanto al muestreador Button diseñado para mejorar las características de recolección de muestras, incluidos bioaerosoles para posteriormente realizar un análisis de partículas virales potencialmente infectivas y filtros de gelatina resultaron ser elementos importantes para este experimento ya que son fáciles de manejar y garantizan reproducibilidad de los resultados.

El análisis estadístico aplicado a la propuesta experimental, arrojó que existen diferencias significativas entre el control positivo aplicado y las muestras tomadas dentro de la cámara de contacto, debido a que la finalidad fue comparar la recuperación directa (no aerosoles) del bacteriófago contra la recuperación mediante aerosoles.

Así mismo las diferentes pruebas realizadas permitieron establecer las condiciones que deben ser consideradas para su muestreo, recuperación y cuantificación del fago MS2, finalmente se desarrolló una metodología para el muestro del bacteriófago MS2 como virus sustituto del SARS-CoV-2 en aerosoles.

25. BIBLIOGRAFÍA

1. Matos-Alviso JL, Reyes-Gómez U, Coria-Lorenzo JJ, Caballero-Noguéz B, Espinosa-Sotero MC, Pérez-Pacheco O, Reyes-Hernández KL, Aguilar-Figueroa ES, Candelas-Delgado E, Soria-Saavedra F. Los aerosoles humanos, principal mecanismo de transmisión del nuevo SARS-CoV-2. *Rev. Enferm Infecc Pediatr* 2021; 33(135):1809-15.
2. Organización Mundial de la salud. Transmisión del SARS-CoV-2: repercusiones sobre las precauciones en materia de prevención de infecciones. [internet]. [consultado 28 noviembre del 2022]. Disponible en: WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Transmission_modes-2020.3-spa.pdf.
3. Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020 (<https://www.who.int/publications-detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>, consultado el 6 de mayo de 2021).
4. Wu Z, McGoogan JM. Características y lecciones importantes del brote de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en China: resumen de un informe de 72 314 casos del Centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades [internet]. *JAMA*. 2020 [consultado 05 septiembre 2021]; 323(13). Disponible en: 10.1001/jama.2020.2648.
5. Tsang OT, Yip CC, Chan KH, Wu TC, Chan JM, Leung WS, Chik TS, Choi CY, Kandamby DH, Lung DC, Tam AR, Poon RW, Fung AY, Hung IF, Cheng VC, Chan JF, Yuen KY. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin Infect Dis*. 2020 Julio 28;71(15):841-843. doi: 10.1093/cid/ciaa149.
6. Bourouiba L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA*. 2020 May 12;323(18):1837-1838. doi: 10.1001/jama.2020.4756. PMID: 32215590.
7. Ong, S.W.X., Tan, Y.K., Chia, P.Y., Lee, T.H., Ng, O.T., Wong, M.S.Y., et al., 2020. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-

- CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA* 323, 1610. (<https://doi.org/10.1001/jama.2020.3227>, consultado el 6 de mayo de 2020).
8. Cervantes C. Bacteriófagos: virus que infectan bacterias [internet].2015 [consultado 14 noviembre 2021]. Disponible en: Bacteriófagos: Virus que infectan bacterias (umich.mx).
 9. Simmons J., Muniesa, M. and Jofre, J. General and host-associated bacteriophage indicators of fecal pollution. (eds) Global Water Pathogens Project. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO August 23, 2017.
 - 10.R. Armon & Y. Kott (1996) Bacteriophages as indicators of pollution, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26:4, 299-335, DOI: 10.1080/10643389609388494
 - 11.Dominguez N. Bacteriophages. Facultad de medicina humana. Enero 2020. Enero 2020;20(1):164-165. DOI 10.25176/RFMH.v20i1.2554.
 - 12.Kasman LM, Porter LD. Bacteriophages. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. DOI: 29630237.
 - 13.Rae, H., An, S. & Hwang, J. High air flow-rate electrostatic sampler for the rapid monitoring of airborne coronavirus and influenza viruses. *Journal of Hazardous Materials*.2021. 412 (125219), 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125219>.
 - 14.Lin K, Schulte CR, Marr LC, Survival of MS2 and Φ 6 viruses in droplets as a function of relative humidity, pH, and salt, protein, and surfactant concentrations. (2020). *PLoS ONE* 15(12): e0243505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243505>
 - 15.Kuzmanovic, D., Elashvili, I., Wick, C., O'Connell, C. & Krueger, S. Bacteriophage MS2: Molecular Weight and Spatial Distribution of the Protein and RNA Components by Small-Angle Neutron Scattering and Virus Counting. 2003. *Elsevier Science*, 11(11), 1339-1348. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.021>
 - 16.Dietrich, W., Bennett, J., Jones, B. & Hosni, M. Laboratory Modeling of SARS-CoV-2 Exposure Reduction Through Physically Distanced Seating in Aircraft

- Cabins Using Bacteriophage Aerosol. November 2021. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 70(16),595–599. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7016e1>external icon.
17. Fedorenko, A., Grinberg, M., Orevi, T. & Kashtan, N. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. 2021. *Scientific Reports* 10, 22419. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79625-z>
 18. Verreault, D., Rousseau, R., Gendron, L., Massé, L., Moineau, S. & Duchaine, C. Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages. 2010. *Aerosol Science and Technology*, 44(3), 197-201, DOI: <https://doi.org/10.1080/02786820903518899>
 19. Tilley, N. and Pawson, R. *Realistic Evaluation: An Overview*. Sage Publications. London. 1997.
 20. Hernández C. NTP. Agentes biológicos: equipos de muestreo (1). España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)[Internet]. 2003[consultado 14 agosto 2021]. Disponible en: NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I). (insst.es)
 21. Mandal j, Brandl, H. Bioaerosols in Indoor Environment - A Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations. *JOUR.* 2011. 83(96), Volumen 4, DOI:10.2174/1875040001104010083.
 22. Hernández C; A. NTP. Agentes biológicos: análisis de las muestras (2). España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)[internet].1997[consultado 14 agosto 2021]. Disponible en: NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras (cso.go.cr)
 23. Srikanth P, Sudharsanam S, Steinberg R. Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Indian J Med Microbiol.* 2008 ;26(4):302-12. DOI: 10.4103/0255-0857.43555. PMID: 18974481.

24. Verreault D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Sep;72(3):413-44. doi: 10.1128/MMBR.00002-08. PMID: 18772283; PMCID: PMC2546863.
25. Scherwing, C. y Patzelt, D. Muestreo de virus patógenos humanos del aire mediante filtros de membrana de gelatina y detección posterior mediante análisis por PCR. *DICSA.* 2020 [consultado el 21 de agosto del 2021]. Disponible en: Muestreo de virus patógenos humanos del aire mediante filtros de membrana de gelatina y detección posterior mediante análisis por PCR – Guíalab (guialab.com.ar)
26. Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg.* 2007 Mar;51(2):143-51. doi: 10.1093/annhyg/mel073. Epub 2006 Oct 14. PMID: 17041245; PMCID: PMC7187796.
27. SKC, LD. Muestreador de botones [ficha tecnica]. Reino unido. Ficha tecnica del muestreador button.
28. Microimport. Bomba de muestreo personal aircheck xr5000 [ficha tecnica](microimport.mx). USA. Ficha tecnica de Bomba de muestreo personal AirChek XR5000 para flujos de 5 a 5000 ml/min (microimport.mx)
29. Goyer, N; Levoie, J; Lazure, L; y Marchand, G. Bioaerosols in the Workplace: Evaluation, control and prevention guide.2001 [consultado el 24 de Agosto del 2021]. *Estudes et Reserches.* Disponible en: Guide for the evaluation, control and prevention of bioaerosols in the workplace (irsst.qc.ca)
30. Barquero Marisol, Chacon Luz, Berrantes Karla, Araya Renata. implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Rev. peru. biol.* 19(3): 335 – 340.2012.
31. Salazar de Vegas Elsa Z, Nieves Beatriz, Ruíz Joaquín, Vila Jordi. Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [Internet]. 2008; 28(2): 89-95. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000200004&lng=es.

32. Puerto Carmen A, Iglesias Elsie, Morales Teresita, Baños Nadiezda, Nocedo María Dolores, Carnota Grettell et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Vaccimonitor* [Internet]. 2009 Abr [citado 2023 Feb 20]; 18(1): 20-24. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2009000100004&lng=es.
33. WHO. Annex 4. Good Manufacturing Practices for pharmaceutical products: main principles. WHO Technical Report Series No. 908. 2003.