



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE TOMA DE
MUESTRA DE AIRE PARA LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DEL BACTERIÓFAGO MS2 EN
CONDICIONES SIMULADAS.**

Por:

Eva Cecilia Pérez Zatarain

TESIS APROBADA POR LA

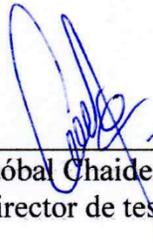
COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

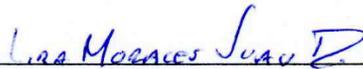
MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN Y FIRMAS

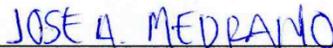
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Eva Cecilia Pérez Zatarain, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Director de tesis



Dr. Juan Daniel Lira Morales
Integrante del comité de tesis



Dr. José Andrés Medrano Félix
Integrante del comité de tesis



Dra. Nohelia Castro del Campo
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Estandarización de un Método de Toma de Muestra de Aire para la Detección y Cuantificación del Bacteriófago MS2" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Eva Cecilia Pérez Zatarain, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo brindado durante el posgrado.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) subsección Culiacán por abrirme las puertas para poder realizar mis estudios de posgrado y brindarme las instalaciones necesarias para completarlos.

También agradezco a mi comité de tesis por haberme ayudado a darle forma a este proyecto, y darme las herramientas necesarias para completarlo.

Agradezco a las Q.F.B. Célida Isabel Martínez Rodríguez y Miriam Belén Vega Rodríguez, por ayudarme con conseguir los materiales y equipos necesarios para llevar a cabo el proyecto, así como el conocimiento brindado en cuanto a las buenas prácticas de laboratorio.

A mis compañeros de LANIA, cuyo apoyo y conocimiento facilitaron el cumplir todos los objetivos planteados, en especial al Dr. Jean Pierre González Gómez, quien me enseñó la técnica de propagación en agar doble capa y me ayudó con los cálculos de concentraciones. También a la M. en C. Cecilia Sánchez Armenta, que no solamente me apoyó en el laboratorio, también ha sido un gran apoyo emocional.

Al cuerpo docente de CIAD, quienes, con su conocimiento y experiencia, me abrieron nuevas perspectivas y me ayudaron a madurar mis conocimientos, paradigmas y ética de trabajo. También al personal administrativo de CIAD, quienes me ayudaron en trámites, me animaron a realizar nuevas actividades, y con su buen humor, amenizaron mi estancia.

Y finalmente un agradecimiento a mis compañeros de generación, particularmente a Jocelyn, Bárbara y Carlos, fue muy grato coincidir con todos y poder congeniar y compartir experiencias y conocimientos a pesar de tener trasfondos académicos tan distintos.

DEDICATORIA

A todos quienes hicieron posible completar este proyecto.

CONTENIDO

APROBACIÓN Y FIRMAS	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTADO DE FIGURAS	8
LISTADO DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Ambientes Aéreos	16
2.2. Supervivencia de Microorganismos en el Aire en Espacios Cerrados	18
2.2.1. Tamaño de la Partícula Viral y Dosis Infecciosa: Consideraciones para el Muestreo de Aire	20
2.3. Situación Histórica de la Transmisión Aérea de Virus.....	21
2.3.1. Impacto de la Pandemia de COVID-19 en el Estudio de la Transmisión Aérea de Virus	22
2.4. Metodologías Empleadas para el Monitoreo de Microorganismos en el aire	24
2.4.1. Métodos de Muestreo Pasivos	25
2.4.2. Métodos de Muestreo Activos	25
2.4.3. Métodos de Cuantificación	26
2.5. Estandarización de Métodos de Toma de Muestra de Aire	28
2.6. Equipos de Toma de Muestra de Aire	29
2.6.1. Toma de Muestra con Filtro de Gelatina	30
2.7. Empleo de Bacteriófagos como Subrogados.....	32
2.7.1. Bacteriófago MS2	34
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.2. Objetivos Específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Cámara Aerobiológica.....	39
5.1.1. Limpieza y Desinfección de la Cámara	40
5.2. Preparación del Inóculo	40
5.3. Preparación de la Curva Estándar para qPCR	40

CONTENIDO (continuación)

5.3.1. Preparación de Bacterias Quimiocompetentes	41
5.3.2. Ligación del Vector de Clonación	42
5.3.3. Transformación de las Células Competentes	42
5.3.4. Extracción de DNA plasmídico	43
5.3.5. Cálculo del Número de Copias del Plásmido	44
5.4. Cuantificación del Bacteriófago MS2	44
5.5. Aerosolización del Inóculo	45
5.6. Toma de Muestra de Aire	45
5.7. Cálculo de la Recuperación Viral	46
5.8. Diseño Experimental y Análisis Estadístico	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1. Preparación del Inóculo y Título Viral	48
6.2. Construcción del Estándar de Cuantificación	49
6.3. Aerosolización	52
6.4. Extracción de RNA Viral	53
6.5. Verificación del Tamaño de Producto de PCR	55
6.6. Cuantificación con Curva Estándar	55
6.7. Recuperación Relativa	57
6.7.1. Análisis de Regresión Lineal	62
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES	66
9. BIBLIOGRAFÍA	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cámara aerobiológica.....	39
2	Diluciones del título viral.....	48
3	Placa con <i>E. coli</i> Mach1™ - T1R transformadas.....	50
4	Placa para confirmar la transformación de <i>E. coli</i> Mach1™ - T1R	51
5	Registro de temperatura y humedad relativa.....	53
6	Gel de electroforesis.....	55
7	Ciclos de amplificación de qPCR.....	56
8	Curva estándar de qPCR.....	57
9	Relación de la concentración de fagos aerosolizados y recuperados.....	59
10	Recuperación relativa del bacteriófago MS2.....	60
11	Interacción entre variables de flujo y tiempo de muestreo.....	62
12	Correlación de fagos en el ambiente con la concentración de fagos estimada.....	64

LISTADO DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Factores ambientales asociados a la supervivencia de virus en el aire.....	20
2	Atributos que se deben considerar al momento de elegir un subrogado.....	33
3	Diseño experimental de la toma de muestra.....	46
4	Acotaciones del diseño experimental	46
5	Condiciones de extracción de RNA.....	53
6	ANOVA y prueba de Tukey de las condiciones de extracción de RNA.....	53
7	Ecuación de Regresión.....	62
8	Relación de la Concentración Aerosolizada con la Concentración Estimada....	62

RESUMEN

La calidad microbiológica del aire debe ser analizada debido a la posibilidad de encontrar microorganismos patógenos. De estos, destacan los virus por su alta tasa de replicación, capacidad de supervivencia y de desplazamiento en aerosoles donde pueden permanecer suspendidos durante horas. Este fenómeno, previamente descrito por la Organización Mundial de la Salud, es un factor clave en la generación de brotes y pandemias como las ocasionadas recientemente por los virus de la Influenza A H1N1 en 2009 y SARS-CoV-2 en 2020. Para prevenir la propagación de virus y otros microorganismos, el aire debe ser monitoreado logrando la captura, identificación y cuantificación de las partículas virales, principalmente en espacios cerrados. Existen varios métodos de monitoreo del aire, sin embargo, no existe consenso científico para unificar la metodología de recuperación de. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estandarizar un método de toma de muestra de aire para identificar y cuantificar partículas virales en condiciones simuladas de un espacio cerrado. Para lograrlo, se aerosolizaron tres concentraciones diferentes del bacteriófago MS2, un subrogado común de virus de transmisión aérea, en un espacio de 11,230 L, manteniendo una temperatura de 24 °C y humedad relativa del 88%. El bacteriófago MS2 fue recuperado empleando el filtro de gelatina MD8 AirPort (Sartorius), utilizando diferentes tratamientos que consistieron en combinaciones de 2 concentraciones aerosolizadas del bacteriófago MS2 (1×10^6 y 1×10^{12} copias genómicas L^{-1}), 2 flujos de muestreo (20 y 50 L/min) y 2 tiempos de muestreo (5 y 25 min). Además, se hicieron 4 réplicas de un punto central en la concentración de 1×10^9 copias genómicas L^{-1} , con un flujo de muestreo de 30 L/min durante 15 min. La cuantificación se hizo mediante qPCR empleando un estándar de cuantificación a partir de DNA plasmídico obtenido con células *E. coli* Mach1™-T1R transformadas. Se obtuvo un promedio de recuperación del 80 ± 26.5 % de las partículas virales. También se generó un modelo de regresión lineal el cual permite predecir el número de copias virales en el ambiente, a partir de las copias detectadas por qPCR. Los resultados sugieren que un flujo menor de aire durante el muestreo genera resultados más confiables y replicables. Un monitoreo de virus en el aire usando un filtro de gelatina e identificación y cuantificación con qPCR es efectivo permitiendo identificar al virus en concentraciones tan bajas como 1×10^6 copias genómicas L^{-1} incluso durante tiempos de 5 minutos de muestreo.

Palabras Clave: *muestreo de aire, espacios interiores, fago MS2, cuantificación viral, RT-qPCR*

ABSTRACT

Air microbiological quality, particularly in indoor spaces, must be analyzed, due to the presence of pathogens, with viruses being particularly notable because of their high replication rate and ability to remain airborne for extended periods. This has been described by the World Health Organization as a key factor in the occurrence of outbreaks and pandemics as the ones caused by Influenza A H1N1 Virus in 2009 and SARS-CoV-2 in 2020. To prevent such events, it is essential to sample the air to capture, identify and quantify airborne viruses in indoor environments. Nevertheless, no current scientific consensus to unify the methodology used to recover airborne viruses indoors although there are several methodologies applied to surveil these microorganisms. This work aim was to standardize an air sampling method to identify and quantify airborne viral particles in a simulated indoor environment. To achieve this objective, three viral concentrations of the bacteriophage MS2, a common surrogate of airborne viruses, were aerosolized in a 11,230 L indoor space. The experiments were conducted at a temperature of 24 °C and a relative humidity of 88%. A gelatin filter, MD8 Airport (Sartorius) was used to recover the aerosolized MS2 bacteriophage. Different combinations of viral concentration and sampling flow and time were tested, the concentrations being of 1×10^6 and 1×10^{12} genomic copies L^{-1} , sampling flows of 20 and 50 L/min and sampling times of 5 and 25 minutes. With a central point consisting of a viral concentration of 1×10^9 genomic copies L^{-1} , with a sampling flow of 30 L/min during 15 min. Absolute quantification was performed via qPCR, using a plasmidic DNA as standard, obtained from transformed *E. coli* Mach1™-T1R cells. A recovery of 80 ± 26.5 % was achieved. A linear regression model was developed to predict the number of environmental viral particles based on recovery measurements obtained via qPCR. The obtained results suggest that a sampling flow of 20 L/min provided more accurate and reliable measurements. The proposed surveillance methodology, based on sampling using a gelatin filter sampler, and the identification and quantification via qPCR has proven to be an effective methodology, being able to identify airborne viral loads as small as 1×10^6 genomic copies L^{-1} even during sampling periods as short as 5 minutes.

Keywords: *air surveillance, indoor spaces, MS2 phage, viral quantification, qPCR*

1. INTRODUCCIÓN

El aire es fuente de vida, al proporcionarnos oxígeno, sin embargo, en ciertas ocasiones, se convierte en vehículo de alérgenos, y de microorganismos patógenos que pueden afectar la salud, ya sea por inhalación o por deposición en alimentos que posteriormente consumimos (Yezli y Otter, 2011). Esta problemática se intensifica en ambientes interiores debido al hacinamiento y a las condiciones ambientales favorables para la supervivencia y viabilidad de los microorganismos como la reducción de la radiación UV, y la estabilidad de la temperatura y humedad; estas condiciones benefician la acumulación, propagación y supervivencia de patógenos en espacios como oficinas, escuelas, hospitales, laboratorios y áreas de producción y almacenamiento de alimentos (Pepper *et al.*, 2015; Ijaz *et al.*, 2016). De acuerdo con Hussain *et al.*, (2022) la mayoría de las personas permanecen el 90% de su tiempo en espacios cerrados ya sea en el trabajo o escuela, en el hogar, espacios recreativos y medios de transporte; debido a esto, el monitoreo de la calidad microbiológica del aire, particularmente en interiores, es una gran preocupación para la salud pública que requiere del entendimiento del proceso de transmisión de microorganismos de diferentes ambientes, incluso a lo largo de la cadena de producción de alimentos, para así desarrollar e implementar medidas de prevención y control localizadas y efectivas que prevengan afectaciones en el ser humano y animales (Ijaz *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2022).

Para entender los procesos de transmisión de los microorganismos a través del aire, es necesario comprender cuál es el mecanismo de propagación de microorganismos a través de éste, dicho mecanismo se llama “*ruta aeromicrobiológica*”. Esta ruta describe el comportamiento de una partícula biológica, que puede ser un virus, hongo, bacteria o sus subproductos, desde que es 1) *lanzada*, 2) *transportada*, y 3) *depositada*. Estos contaminantes biológicos, denominados bioaerosoles, pueden ser ingeridos o respirados por personas y/o animales y tienen el potencial de ser depositados en plantas, cultivos y alimentos; la composición de los bioaerosoles es muy variada, muchos están conformados por materia orgánica como saliva, piel muerta o polen; así como materia inerte como humo, polvo y agua, o también pueden estar conformados por una combinación de ambas. Las partículas biológicas en el aire, las cuáles pueden originarse en un hospedero o de una fuente natural, suelen encontrarse asociadas o adheridas a estos aerosoles, y de esta manera se protegen de factores ambientales que las pueden dañar (Pepper *et al.*, 2015).

La contaminación del aire en interiores es responsable de varias enfermedades infecciosas, como lo son la legionelosis y tuberculosis, causadas por bacterias; o por agentes virales, como el virus de la influenza y Coronavirus (Hussain *et al.*, 2022). Adicionalmente, no sólo las enfermedades respiratorias se propagan por la ruta aeromicrobiológica; existe evidencia de la propagación aérea de agentes causales de enfermedades gastrointestinales, como es el caso de *Salmonella* Typhimurium, la cual puede sobrevivir en un estado aerosolizado hasta 5 minutos, con el potencial de volver a ser suspendida después de ser depositada (Pepper *et al.*, 2015), sin embargo, cabe resaltar que globalmente, las enfermedades respiratorias agudas son las enfermedades más frecuentes en todos los grupos de edad (Rogier Van Doorn y Yu, 2020).

Las avanzadas facilidades de transporte en el mundo moderno favorecen el flujo masivo de personas, mismas que conllevan a la propagación rápida, extensiva, y en algunos casos global de diversos agentes patógenos; siendo de particular importancia las enfermedades virales de transmisión aérea. Ejemplo de esto son las dos pandemias del siglo XXI (Hancková y Betáková, 2022) en 2009 el brote de influenza A H1N1 que resultó en 18,500 defunciones y más de 600,000 casos confirmados; y más recientemente, de enero de 2020 a noviembre del 2023, la pandemia ocasionada por la enfermedad COVID-19 con más de 760 millones de casos confirmados y 6.94 millones de defunciones a nivel mundial. En este último, México fue de los principales países de América donde se han confirmado más de 7.6 millones de casos y más de 334,000 defunciones, con una pérdida económica estimada de más de 200,000 millones de pesos. Ante este tipo de eventos, el estudio de la propagación de agentes virales mediante el aire ha cobrado mayor importancia que nunca a fin de evitar a tiempo la propagación de virus en el aire (World Health Organization, 2012; Bhardwaj *et al.*, 2021; CONAHACYT, 2023).

El estudio de virus presentes en el aire presenta desafíos en comparación con su estudio en otras muestras ambientales o clínicas. Esto se debe a varios factores, entre ellos los diversos equipos de toma de muestra los cuáles funcionan bajo diferentes principios, ya sea que el equipo genere una corriente de aire que permita la obtención de grandes volúmenes de muestra en un corto tiempo, o que capture los microorganismos por deposición. Como cada uno de estos equipos funcionan bajo diferentes principios, es necesario plantear una metodología de muestreo que tome en cuenta el principio de funcionamiento de cada equipo y sus limitantes con parámetros bien definidos para identificar y cuantificar patógenos en el aire (Bhardwaj *et al.*, 2021). Estos parámetros engloban el equipo utilizado para la toma de muestra, el tiempo y flujo de muestreo, el volumen del interior

dónde se lleva a cabo del muestreo y la temperatura y humedad relativa medidas durante todo el proceso. (Buonanno *et al.*, 2022). Uno de los principales retos metodológicos para la detección de partículas virales en muestras de aire, es la falta de estandarización. En este sentido, diferentes estudios reportados sobre microorganismos en el aire de interiores carecen de detalles experimentales. A pesar de que este tipo de investigaciones ha aumentado significativamente en los últimos años no todos los autores reportan todas las características del sitio dónde se realizó el estudio, lo cual puede llevar a una falta de homogeneidad en la metodología y hacer que los resultados no sean equiparables (Jimenez *et al.*, 2022; Robotto *et al.*, 2021).

Debido a lo anterior, este trabajo tiene la finalidad de estandarizar un método de toma de muestra para identificar y cuantificar partículas virales utilizando un muestreador de aire para encontrar las mejores condiciones de velocidad de flujo de aire y tiempo de muestreo en espacios cerrados. Además, con estos resultados se pretende reducir el error metodológico en futuros trabajos de investigación asociados a la aeromicrobiología.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ambientes Aéreos

El aire que respiramos se puede considerar como un ecualizador, ya que todos los seres vivos nos encontramos expuestos a éste, tanto en espacios abiertos como interiores (Ijaz *et al.*, 2016). En ambos espacios podemos encontrar microorganismos de interés, ya sea por su capacidad de causar enfermedades en humanos, plantas y animales, o por el potencial que representan para contaminar y afectar procesos en la industria y manufactura de diversos alimentos (Alsved *et al.*, 2020; Hussain *et al.*, 2022; Prussin *et al.*, 2015; Sattar *et al.*, 2016).

A los microorganismos y sus subproductos que se encuentran en el aire, se les llama bioaerosoles, estos pueden estar conformados por diversos taxones de microorganismos que incluyen algas, oomycetes, hongos, bacterias y virus, así como compuestos orgánicos derivados de ellos como proteínas, y toxinas. Los bioaerosoles pueden ser de tamaños muy variados que van desde 1 nm hasta los 100 µm, su composición puede ser sólida o líquida, y ésta depende de diversos factores, incluyendo el tipo de agente biológico y el tipo de partículas al que está asociado ya sean partículas de polvo, humo o agua (Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2016; Pepper *et al.*, 2015).

Está comprobado el papel de los bioaerosoles en la dispersión de unidades reproductivas de plantas y microbios a través de diferentes hábitats y barreras geográficas, así mismo, también se conoce su potencial para dispersar patógenos de plantas, animales y humanos, por lo que los bioaerosoles tienen fuertes implicaciones en la agricultura y salud pública (Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2016).

Los bioaerosoles pueden ser emitidos de varias fuentes, por ejemplo, un individuo infectado, y pueden entrar en contacto con personas susceptibles de manera directa (transmisión por gotas) o permaneciendo suspendidos en el aire (transmisión por aire). La transmisión por aire requiere que los patógenos sobrevivan al proceso de aerosolización y persistan en el aire por un período lo suficientemente largo para ser transmitido a un hospedero susceptible (Ijaz *et al.*, 2016).

La rama de la ciencia que estudia los bioaerosoles, sus microorganismos y el comportamiento de estos, es la aeromicrobiología, la cual estudia la ruta aeromicrobiológica la cual es de interés para el sector salud, así como el sector productivo ya que muchos patógenos de plantas se dispersan a

través de esta ruta, lo cual puede ser perjudicial para la producción agrícola. Un monitoreo eficiente de las rutas aeromicrobiológicas, detección y modelación tienen la habilidad de asistir en el control de patógenos aéreos. Sectores productivos como el agrícola y ganadero son beneficiados por la vigilancia aeromicrobiológica, la cual permite el monitoreo y control de patógenos transmitidos por el aire, además de facilitar el control de calidad en ambos sectores (Pepper *et al.*, 2015).

Las partículas en el aire, dependiendo de su tamaño, pueden recorrer grandes distancias, mientras más pequeña sea la partícula, mayor es la distancia que podrá recorrer. Un ejemplo fue el caso del brote de ántrax en 1979, en la actual Ekaterimburgo, Ucrania, donde se registraron al menos 66 fallecimientos. Dicho caso ocurrió en instalaciones militares, donde se produjo una fuga accidental de *Bacillus anthracis*, que causó enfermedades en humanos y ganado hasta 50 km de distancia de la fuente (Meselson *et al.*, 1994).

En contraste con las bacterias, las partículas virales pueden encontrarse suspendidas en el ambiente durante un mayor período, en investigaciones Lindsley *et al.*, (2010) y de Van Doremalen *et al.*, (2020) reportaron que los virus de la Influenza y SARS-CoV-2 pueden permanecer aerosolizados hasta 3 horas; debido a esto, los virus aerosolizados tienen el potencial de recorrer grandes distancias dependiendo de las condiciones ambientales, existe evidencia de que SARS-CoV-2 puede encontrarse en bioaerosoles hasta a 6 metros de distancia de la fuente de emisión. Asimismo, las partículas virales pueden adentrarse más en el sistema respiratorio dependiendo de su tamaño, aumentando su impacto en la salud, reportándose en algunos casos, una carga viral de 100 partículas para infectar a un individuo (Pepper *et al.*, 2015; Bao *et al.*, 2020; Morawska *et al.*, 2020).

Identificar y cuantificar el número y tipo de microorganismos suspendidos en el aire de espacios cerrados, como el de la industria, se incluye en el apartado de buenas prácticas higiénicas del sistema de gestión de la calidad ya que está directamente relacionado con la salud respiratoria de los trabajadores (Santurtún y Shaman, 2023). El monitoreo del aire es cada vez más asistido debido a la inclusión de métodos más sensibles y rápidos de detección como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Este análisis puede incluir microorganismos viables y no viables en espacios confinados (industria, oficina, escuela y residenciales), instalaciones industriales (biotecnología, compostaje, desecho de residuos, manufactura, y procesado de alimentos) y en ambientes exteriores (granjas, sitios de alimentación de ganado, plantas tratadoras de agua residual, y calidad del aire en general). El monitoreo de bioaerosoles en ambientes

ocupacionales es una de las muchas herramientas que se utiliza para evaluar la calidad del aire en interiores, brotes de enfermedades infecciosas, exposición agrícola y salud industrial. El monitoreo del aire puede ser una herramienta apropiada durante la evaluación de la exposición ocupacional a bioaerosoles, estudios de investigación o situaciones valoradas como apropiadas por un médico ocupacional o un inmunólogo. El muestreo también puede ser utilizado para evaluar ambientes ocupacionales antes y después de la mitigación de contaminantes microbiológicos (Lindsley *et al.*, 2017).

2.2. Supervivencia de Microorganismos en el Aire en Espacios Cerrados

Es de suma importancia entender el comportamiento de los microorganismos transmitidos por el aire, particularmente en espacios interiores, ya que las personas pasamos alrededor del 90% del tiempo en estos, y aquí, los microorganismos se encuentran protegidos de diversos factores ambientales que son perjudiciales para ellos, como cambios bruscos de temperatura, humedad relativa muy alta o baja y exposición a la radiación UV, entre otros (Hussain *et al.*, 2022; Rai *et al.*, 2021).

En el aire se pueden encontrar bacterias, hongos y virus, en concentraciones que varían dependiendo de las condiciones del ambiente y de la biología propia del microorganismo. En espacios interiores, se ha reportado la prevalencia de bacterias de hasta 10,000 Unidades Formadoras de Colonia (CFU, por sus siglas en inglés) por litro de aire (Prussin *et al.*, 2015), en contexto, un humano adulto respira 6 litros de aire por minuto (Lindsley *et al.*, 2017), lo que lo expondría a 60,000 CFU por minuto en un área cerrada con estas concentraciones.

Los estudios de supervivencia de microorganismos en aire de interiores así como métodos apropiados de evaluación de descontaminación hacen énfasis en los retos numerosos y resaltan la necesidad de equipos y protocolos especializados, ya que son poco comunes los expertos y las instalaciones experimentales adecuadas para este tipo de investigaciones (Buonanno *et al.*, 2022; Ijaz *et al.*, 2016; Jimenez *et al.*, 2022; Robotto, *et al.*, 2021).

Las investigaciones enfocadas en la detección de virus en el aire son menos numerosas en comparación con las enfocadas en bacterias, sin embargo, estos han ido en incremento con los años,

pero aún falta establecer protocolos unificados para la detección y cuantificación de virus en el aire. Prussin *et al.*, (2015) realizaron uno de los primeros estudios para cuantificar la concentración total de virus en interiores. Durante un período de dos meses tomaron muestras de aire en interiores distintos: un salón de clases, una guardería, un comedor, un centro de salud, tres casas, una oficina y un espacio exterior. Todas las muestras fueron tomadas por triplicado con un filtro Anodisc con un flujo de ~ 0.9 L/min durante ~ 120 min para un volumen total de muestra de ~ 100 L y cuantificaron con un microscopio epifluorescente basándose en el tamaño de partículas. Las partículas de un tamaño entre $0.02 \mu\text{m}$ a $0.50 \mu\text{m}$ fueron clasificadas como virus y aquellas con un tamaño entre $0.50 \mu\text{m}$ y $5.00 \mu\text{m}$ fueron clasificadas como bacterias. Obteniendo una concentración de partículas virales de $4.7 \pm 2.5 \times 10^2 \text{ L}^{-1}$ en interiores y $1.2 \pm 0.7 \times 10^3 \text{ L}^{-1}$ en exteriores, donde no observaron diferencia significativa entre las concentraciones de ambos espacios. Sus resultados fueron consistentes con los obtenidos en otros estudios realizados por Griffin *et al.*, (2001), quienes muestrearon polvo del desierto africano en el aire, que fue transportado al Caribe y encontraron concentraciones de bacterias y virus de 1×10^1 a 1×10^2 partículas L^{-1} . De igual manera, Whon *et al.*, (2012) reportaron concentraciones de 1×10^2 y 1×10^4 partículas de virus y bacterias L^{-1} , respectivamente en un ambiente exterior en Corea del Sur.

Las condiciones ambientales juegan un papel muy importante al momento de hacer un monitoreo del aire ya que estos factores afectan el comportamiento y supervivencia de los virus. Ijaz *et al.*, (2016) recopilan una serie de estudios que se enfocan en la sensibilidad de los virus ante diferentes factores ambientales como temperatura, humedad relativa, gases atmosféricos, luz e irradiación e incluso incluyen a la materia orgánica que puede rodear a los virus. El efecto que tienen estos factores ambientales en los virus se desglosa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Factores ambientales asociados a la supervivencia de virus en el aire (Ijaz *et al.*, 2016)

Factor ambiental	Efecto en virus
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> ● Mientras la temperatura aumenta, la supervivencia disminuye ● Los virus de DNA son más estables que los virus de RNA a altas temperaturas
Humedad relativa	<ul style="list-style-type: none"> ● Los virus con envoltura tienen un mayor tiempo de supervivencia a una humedad relativa baja (entre 20–30%) ● Los virus sin envoltura tienen un mayor tiempo de superviven a una humedad relativa alta (entre 70–90%)
Gases atmosféricos	<ul style="list-style-type: none"> ● El ozono desactiva a los virus
Luz e irradiación	<ul style="list-style-type: none"> ● La luz UV es dañina para todos los virus
Materia orgánica que rodea al virus (saliva, mucosa, etc)	<ul style="list-style-type: none"> ● Protege a los virus de cambios ambientales.

2.2.1. Tamaño de la Partícula Viral y Dosis Infecciosa: Consideraciones para el Muestreo de Aire

La presencia de agentes virales en el aire tiene fuertes implicaciones en la salud, en especial en ambientes interiores, o intramuros, donde los humanos pasamos la mayor parte de nuestro tiempo (Ijaz *et al.*, 2016). El diámetro aerodinámico del aerosol donde se encuentran los virus es muy importante ya que este está relacionado con la región del tracto respiratorio donde será depositado el virus si es inhalado: en un rango de >5 a ≤ 10 μm , la partícula viral se queda en el tracto superior, que incluye a la nariz, faringe y laringe; en un rango >2.5 a ≤ 5 μm , puede llegar hasta la tráquea; y en un rango que va de <0.1 hasta 2.5 μm permite el ingreso de la partícula viral al sistema respiratorio inferior, comprendido por los pulmones, bronquios, bronquiolos y alvéolos, donde puede causar una sintomatología más severa (Guzman, 2021), por lo que se considera que un virus aerosolizado requiere de una carga viral más baja que uno no aerosolizado para producir una infección (Karimzadeh *et al.*, 2021). Según estudios de Karimzadeh *et al.* (2021) se ha estimado

que la dosis infecciosa de SARS-CoV-2 es tan baja como 100 partículas. En un estudio de Bao *et al.*, (2020) lograron infectar a un 100% de hurones con una dosis de 630 Unidades Formadoras de Placa (UFP) de SARS-CoV-2 a través de aerosoles; también Blair *et al.* (2020) lograron infectar a un 100% de monos africanos verdes con una dosis de 2,000 UFP a través de aerosoles.

La dosis infecciosa de SARS-CoV-2 en humanos es desconocida, hasta el momento. Se considera que es muy baja debido a que el virus se transmite rápidamente y es muy contagioso. Una persona infectada es una fuente de emisión de partículas virales, la cantidad de partículas emitidas dependerá del evento de emisión (cantar, hablar, toser, etc.), y de la etapa y la gravedad de la infección. Se han realizado estudios observacionales a través de muestras tomadas de pacientes contagiados y se ha estimado que la dosis infecciosa mínima de SARS-CoV-2 es de 100 partículas; este número puede ser utilizado para realizar estudios con subrogados y estudiar su comportamiento (Karimzadeh *et al.*, 2021).

Riediker y Tsai (2020) generaron un modelo matemático para diferentes eventos de emisión de partículas virales de SARS-CoV-2, categorizaron a los infectados con SARS-CoV-2 como emisores bajos, medios y altos, dependiendo de la cantidad de partículas que emitían, con 1×10^3 , 1×10^6 y 1×10^{11} copias/mL, respectivamente. Los autores estimaron que un emisor alto puede generar hasta 1×10^6 copias virales por cada 1,000 L en una hora y estas partículas pueden quedar aerosolizadas hasta 3 horas sin disminuir su concentración, lo cual es un riesgo de contagio para una persona que está más de unos minutos en una habitación mal ventilada con un emisor alto, estos hallazgos sustentaron la hipótesis de la transmisión aérea de SARS-CoV-2, explicando eventos masivos de contagio en espacios cerrados.

Una medición pronta *in situ* de virus de transmisión por aire es muy importante para la prevención de la propagación de enfermedades en sus etapas tempranas por lo cual un muestreo confiable de las partículas virales junto con técnicas avanzadas de medición es crítico para la cuantificación efectiva de virus en el aire (Bhardwaj *et al.*, 2021).

2.3. Situación Histórica de la Transmisión Aérea de Virus

Durante las últimas tres décadas, la investigación en aeromicrobiología, impulsada por el desarrollo

y mejora de metodologías y el surgimiento de nuevas preguntas ha crecido exponencialmente. La colaboración global de grupos de investigación durante la pandemia de COVID-19, ha fomentado la producción masiva de nueva información y ha aumentado la demanda por más estudios enfocados en el transporte y transmisión de virus. Es invaluable expandir el entendimiento y la capacidad de predicción de la transmisión de patógenos a través del aire ya que, debido al crecimiento de la población humana, existe el riesgo de que se generen nuevas pandemias (Mbareche *et al.*, 2017; Borges *et al.*, 2021; Buonanno *et al.*, 2022; Tastassa *et al.*, 2024).

Una revisión exhaustiva de literatura realizada por Tastassa *et al.*, (2024) refleja claramente el aumento en el interés por la investigación de virus en el aire. En esta publicación, revisaron más de 11,000 publicaciones enfocadas en diferentes taxones de microorganismos de transmisión aérea desde 1965 a 2021; observaron que a partir de la década de los 80s los estudios de bioaerosoles muestran un crecimiento exponencial, pero este crecimiento no está distribuido equitativamente entre los diferentes taxones. Con un total de 3,209 publicaciones de estudios de virus en el aire, estas aumentaron significativamente durante la pandemia de COVID-19, con un incremento de 141 publicaciones acumuladas hasta 2019 a 451 publicaciones en 2020 y 813 publicaciones en 2021.

2.3.1. Impacto de la Pandemia de COVID-19 en el Estudio de la Transmisión Aérea de Virus

Si bien, la transmisión aérea de SARS-CoV-2 es aceptada actualmente, esto no fue así a inicios de la pandemia (US EPA, 2020). Uno de los factores que contribuyó a este sesgo de la información, fue la falta de estandarización al momento de reportar resultados en diferentes estudios relacionados con la detección de SARS-CoV-2 en ambientes cerrados (Jimenez *et al.*, 2022). Por ejemplo, no en todos los estudios se reportó el volumen del sitio de muestreo, ni factores ambientales como la temperatura y humedad relativa del lugar, o el tipo de sistema de climatización del lugar; tampoco se reportó información básica, como la cantidad de personas enfermas en el área COVID al momento de realizar el muestreo. Por lo tanto, se obtuvieron resultados no replicables entre muestreos, dónde en algunos casos se reportaron solamente 2 copias virales por litro de aire muestreado (Hu *et al.*, 2020), o hasta 94 copias por litro muestreado

(Liu *et al.*, 2020), e incluso, hubo varios estudios en los que no se pudo confirmar la presencia de SARS-CoV-2 en el aire a través de su muestreo (Robotto *et al.*, 2021).

Durante la pandemia, varios autores no lograron encontrar el virus causante de COVID-19 en el aire de hospitales, incluso en la presencia de pacientes enfermos lo que los llevó a concluir que el virus no podía ser detectado en el aire (Cheng *et al.*, 2020; Faridi *et al.*, 2020; Ong *et al.*, 2020). En contraste, otros autores lograron reportar la presencia del virus SARS-CoV-2 en muestras de aire de hospital, como Chia *et al.*, (2020), que reportaron concentraciones de SARS-CoV-2 que iban desde 1.8 hasta 3.4 partículas virales por litro de aire muestreado, de igual manera, Santarpia *et al.*, (2020) reportaron una concentración media de 2.86 partículas virales por litro de aire muestreado tanto en habitaciones como en pasillos de hospitales; Hu *et al.*, (2020) reportaron un rango de 1.11×10^0 a 1.12×10^1 partículas virales por litro de aire muestreado en áreas de cuidados intensivos y en salas de tomografía computarizada, asimismo, Lednicky *et al.*, (2020) reportaron hasta 94 copias de RNA L⁻¹ de aire en habitaciones de hospital; Liu *et al.*, (2020) reportaron una concentración máxima de alrededor de 40 partículas/m³ en el aire de hospitales y una concentración menor de 3 partículas L⁻¹ de aire en áreas públicas urbanas. Algunos estudios además reportaron la presencia del virus en aire de exteriores, como en filtros de aire muestreados en el norte de Italia (Setti *et al.*, 2020). Los resultados anteriores han sido reportados empleando diferentes técnicas de muestreo que implementan distintos materiales de colecta (como filtro de fibra de cuarzo, filtros de gelatina, y soluciones líquidas), diferentes tiempos de muestreo (desde unos minutos hasta 24 horas), diferentes flujos de muestreo (de 10 a 800 L/min) y diferente sensibilidad analítica. Y en muchos de estos trabajos, no son reportados aspectos importantes de los espacios interiores muestreados, como el volumen del área donde se realizó el muestreo y el número de cambios de aire durante el experimento no es descrito, pero posiblemente difiera entre las distintas investigaciones (Robotto *et al.*, 2021).

La falta de estandarización entre los diferentes métodos de muestreo puede explicar en gran medida los resultados tan variables reportados durante el monitoreo de aire en áreas COVID durante los inicios de la pandemia. Además, debe ser resaltado que la variabilidad en las condiciones ambientales y de emisión pueden ocurrir tanto en espacios interiores como exteriores, lo cual impacta la certeza de las mediciones en diferentes sitios. Debido a esto, la heterogeneidad de los datos reportados demuestra la necesidad de desarrollar nuevos métodos estandarizados y robustos para muestrear y detectar SARS-CoV-2 en el aire (Robotto *et al.*, 2021). Métodos más

confiables permitirán el desarrollo de una disciplina como virología ambiental, de importancia estratégica en el monitoreo y prevención de futuras pandemias (Robotto *et al.*, 2021; Robotto *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022; Truyols-Vives *et al.*, 2022)

2.4. Metodologías Empleadas para el Monitoreo de Microorganismos en el aire

Para lograr un monitoreo efectivo de los microorganismos que se encuentran distribuidos en el aire, es necesario utilizar métodos para capturarlos, o muestrear, y posteriormente identificarlos, estas metodologías pueden ser clasificadas como métodos basados en cultivos y no basados en cultivos. En el caso de los virus, los métodos basados en cultivos requieren preservar la viabilidad de estos, lo cual llega a ser complicado debido a que estos organismos son parásitos obligados y requieren de un hospedero para ser propagados, este puede ser una célula animal o vegetal, dependiendo del virus, o una bacteria en el caso de los bacteriófagos (Cox *et al.*, 2020).

La mayoría de los virus de interés presentes en el aire son patógenos humanos, por lo que su cultivo es difícil, y requiere del establecimiento de un cultivo celular, o incluso, a veces no existe la metodología establecida para su cultivo. Por lo anterior, los métodos no basados en cultivos son ampliamente utilizados. Estos métodos emplean una serie de técnicas moleculares que facilitan la detección de virus en muestras de aire y otros ambientes. Esta forma de detección y cuantificación toma en cuenta todo el material genético disponible en la muestra (Cox *et al.*, 2020; Mbareche *et al.*, 2017).

La metodología de colecta de virus se selecciona con base a diferentes criterios, siendo el método de identificación del virus de suma importancia, pues dependiendo del método de muestreo utilizado, la partícula viral puede sufrir daños que dificultan su detección. Existen diversos equipos de colecta que operan bajo diferentes principios y la selección de un método sobre otro depende del alcance de la investigación, la necesidad de conservar la viabilidad del microorganismo, la naturaleza de este y el espacio a ser muestreado (Verreault *et al.*, 2008).

Las técnicas de muestreo para bioaerosoles pueden dividirse en dos: métodos pasivos y activos (Manibusan y Mainelis, 2022).

2.4.1. Métodos de Muestreo Pasivos

Los métodos pasivos son sencillos de usar y a menudo son empleados para estudios cualitativos y su principio de función es principalmente a través de la deposición (pasiva) de partículas en un medio de colecta (Manibusan y Mainelis, 2022) los mecanismos de colección incluyen intercepción, impactación, difusión y atracción electroestática.

2.4.2. Métodos de Muestreo Activos

Cuando el flujo de muestreo es bajo, la difusión es la manera principal de "atrapar" las partículas más pequeñas en muchos muestreadores activos (Delor y Amato, 2018), en general, el muestreo activo es un medio ventajoso de obtener datos cuantitativos de bioaerosoles. Los impactadores e *impingers* usan el mismo principio de impactación para colectar partículas, con diferencia que los últimos emplean un medio líquido para recolectar las partículas. Ambos tienen una eficiencia baja de colecta de partículas con un tamaño menor a 500 nm (Pan *et al.*, 2019). Los ciclones por su parte, utilizan la rotación de aire para generar fuerza centrífuga, lo cual desvía a las partículas del flujo de aire para que luego impacten la superficie del medio de colecta (Bhardwaj *et al.*, 2021). La filtración es otro método que es relativamente simple y de bajo costo. Sus mecanismos de colección incluyen intercepción, inercia, difusión y atracción electroestática (Bhardwaj *et al.*, 2021) las partículas en el aire son colectadas en un filtro mientras el aire fluye a través de los poros, el material del filtro debe ser elegido de acuerdo con el análisis subsecuente. Los filtros tienen una buena eficiencia de colección y muy buen desempeño al momento de muestrear virus.

La elección de un equipo de muestreo de bioaerosoles adecuado, depende principalmente de los objetivos de la investigación (Fahlgren *et al.*, 2011; Haig *et al.*, 2016), se debe destacar que otros factores durante el muestreo, como el flujo de muestreo, son importantes ya que afecta la eficiencia de colecta y la viabilidad del bioaerosol (Delort & Amato, 2018; Rahmani *et al.*, 2020). El escoger valores apropiados de flujo de muestreo puede ser retador en aquellos estudios que involucren actividad microbiana.

Cuando el método empleado para la detección no requiere de cultivo, es posible utilizar un rango más amplio de equipos, entre ellos, son muy utilizados los filtros y ciclones, los cuales son ampliamente utilizados debido a su simplicidad y efectividad al momento de coleccionar partículas de aerosoles de todos los tamaños (Cox *et al.*, 2020). Los equipos que operan bajo el principio de filtración coleccionan partículas de cierto tamaño, determinado por el poro del filtro, las cuáles se quedan atrapadas en el este; los filtros pueden ser de una variedad de materiales y después son eluidos o cultivados directamente sobre un medio nutritivo. Los impactadores funcionan separando las partículas de cierto tamaño, utilizando el principio de Stokes y flujos de aire (Mainelis, 2020), la ley de Stokes explica que las partículas más pequeñas pueden transportarse una mayor distancia cuando se encuentran en un medio, ya sea agua o aire, y esto se puede observar en la persistencia que tienen los virus en los bioaerosoles a comparación de otros agentes, como las bacterias, las cuáles son mucho mayores en tamaño (Pepper *et al.*, 2015).

2.4.3. Métodos de Cuantificación

Los métodos de cuantificación para bioaerosoles pueden dividirse en dos categorías generales: la toma de información física/biológica sin muestrear el aire y la que involucra la obtención de esta información posterior a un muestreo del aire (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Un muestreo eficiente del aire consiste en dos pasos: primero, las partículas virales deben ser coleccionadas directamente en líquidos o superficies sólidas; segundo, la identificación de las partículas virales, esto puede incluir técnicas tradicionales de microbiología, como cultivo en placa o cultivo celular, y/o técnicas de biología molecular que son utilizadas para detectar y/o cuantificar las partículas virales como distintas técnicas de PCR, que incluyen PCR con Transcripción Reversa (RT-PCR), para aquellos virus que su material genético es de RNA, o PCR Cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) e incluso inmunoensayos (Bhardwaj *et al.*, 2021). La qPCR es el estándar de oro para cuantificar virus en muestras clínicas y ambientales, y es el método más efectivo para detectar concentraciones bajas de virus. ya que se ha reportado que metodologías de RT-qPCR capaces de detectar entre cuatro y ocho copias de SARS-CoV-2 con un intervalo de confianza de 95% en 5 mL de preparado de RNA (Rahmani *et al.*, 2020). Las

técnicas de PCR más usadas para la detección de virus en el aire son las siguientes:

RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa): es la técnica empleada con mayor frecuencia para identificar virus de RNA. Esta técnica consiste en amplificar un fragmento de material genético viral utilizando el RNA como molde, para al final detectar o no la presencia de dicho virus. Permite el uso de RNA como molde ya que se retrotranscribe, obteniendo DNA complementario (cDNA) por acción de una transcriptasa inversa (Bio-Rad Laboratories, s/f).

RT-qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa): igual que la RT-PCR convencional, utiliza un extracto de RNA de interés, lo retro transcribe en DNA y después éste se amplifica. De esta manera se puede detectar el virus, la diferencia principal es que, con la PCR de tiempo real, se puede llevar un conteo de las copias producidas en cada ciclo del proceso y así estimar la carga viral presente (Jawerth, 2020). A diferencia de la PCR de punto final, donde el amplicón es detectado al final del análisis, en la PCR cuantitativa, la acumulación del producto amplificado es medida mientras la reacción progresa, en tiempo real, con la cuantificación del producto en cada ciclo. La detección de productos de PCR en tiempo real es posible debido a la inclusión de una molécula fluorescente reportera, que, en cada ciclo, conforme aumenta el número de copias del amplicón, aumenta también la fluorescencia y esta es medida por el equipo. La fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de amplicón producida en cada ciclo. Se pueden utilizar colorantes fluorescentes que se unen al DNA o secuencias de primers específicos etiquetados, llamados sondas, los cuáles cuentan con una fluoróforo en un extremo y un *quencher* en otro, el quencher absorbe la energía del fluoróforo y por lo tanto no produce fluorescencia cuando se encuentran ligados, pero una vez la sonda se une a un fragmento de DNA, el fluoróforo es liberado y fluoresce. Esta fluorescencia va aumentando con el número de copias que se forman en cada ciclo de la PCR (Sheng *et al.*, 2020). Los resultados de una qPCR pueden ser cualitativos: presencia o ausencia de secuencias o cuantitativos: número de copias de DNA (Bio-Rad Laboratories, s/f). Para obtener resultados cuantitativos, se usan concentraciones conocidas de microorganismos como templado para la PCR, y se a partir de los ciclos de amplificación de estos, se generan curvas estándar con las cuales se cuantifica el total de la concentración de microorganismos de una muestra desconocida. Este método ha sido usado previamente para detectar microorganismos de transmisión aérea en muestras ambientales (Wen *et al.*, 2009).

2.5. Estandarización de Métodos de Toma de Muestra de Aire

Para tomar una muestra para la detección de partículas virales, existen diferentes equipos: filtros, impactadores, *impingers*, ciclones, muestreadores electrostáticos, y muestreadores basados en condensación, cada uno con sus ventajas y desventajas. Para seleccionar un método u otro hay que tomar en cuenta diversos factores: el rango de tamaño de partículas, la velocidad de flujo, el tiempo de muestreo, la eficiencia de la colección física, portabilidad, preservación biológica y el rango de enriquecimiento, de acuerdo a los objetivos del análisis (Bhardwaj *et al.*, 2021).

El Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos (NIOSH, por sus siglas en inglés) desarrolló en 1998 un método para la toma de muestra de hongos y bacterias mesofílicas en el aire; también la Asociación Americana de Higiene Industrial (AIHA, por sus siglas en inglés) redactó en 2005 un manual para monitorear agentes biológicos en el ambiente. Sin embargo, hasta el momento aún no existe un método de muestreo específico para la determinación de virus en el aire en espacios de trabajo ni una guía o protocolo avalado por una autoridad que indique qué metodología utilizar al momento de tomar muestras de aire en espacios interiores (Rahmani *et al.*, 2020).

Por otra parte, existe información contradictoria con respecto al uso y eficiencia de los equipos empleados para muestrear aire, con reportes distintos de su tiempo de uso y el flujo de colecta (Robotto *et al.*, 2021). Por lo tanto, es necesario estandarizar protocolos para la detección de microorganismos en el aire y generar información confiable y repetible.

Estandarizar un método implica en desarrollar un instrumento que sistematice un proceso y su interpretación, es muy importante que este sea replicable en futuras aplicaciones. Robotto *et al.*, (2021) abordaron la importancia que tiene estandarizar en cada laboratorio, su propia metodología para el muestreo de aire de interiores; lo cuál puede ser complicado con la falta de estándares actualmente. Ellos lograron estandarizar un método para la detección de SARS-CoV-2 utilizando a un coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43) como subrogado, en el desarrollo del método realizaron el siguiente listado de los requerimientos mínimos que debe cumplir un método de muestreo dentro de un laboratorio: se debe muestrear un gran volumen de aire, considerando la dilución del microorganismo de interés en el medio; el método debe tener una eficiencia alta de

captura de aerosoles para fracciones más pequeñas que 1 μm ; debe preservar de la infectividad de la muestra, para permitir la replicación viral *in vitro*; las temperaturas no deben ser dañinas para el microorganismo en ninguna parte del proceso, incluyendo el transporte y almacenamiento; se debe asegurar una baja degradación del microorganismos de interés, evitar la re-aerosolización o pérdidas en las paredes o boquilla del muestreador; los límites de detección del método deben ser establecidos; uso de un medio óptimo para suspensión o captura del microorganismo de interés, y el pre-tratamiento de la muestra debe ser optimizado.

2.6. Equipos de Toma de Muestra de Aire

Para determinar la probabilidad de transmisión de enfermedades a través del aire, se deben conducir estudios epidemiológicos y de bioaerosoles, para esto es necesario emplear muestreadores de aire, los cuáles pueden operar bajo diferentes principios, siendo los más comunes los impactadores y filtros (Cox *et al.*, 2020; Mainelis, 2020; Verreault *et al.*, 2008).

Los impactadores son un tipo de muestreador que consiste en una bomba aspiradora, con una boquilla que tiene adaptado ya sea un filtro o una placa de agar, la bomba forma el vacío y aspira el aire a una velocidad establecida por el usuario y las partículas de interés se impactan con el filtro o disco. Estos muestreadores son utilizados ampliamente para bioaerosoles de gran tamaño, como bacterias y hongos, la eficiencia de colección para estas partículas es alta y estos dispositivos son relativamente fáciles de manejar. El tamaño mínimo de partícula para un impactador es de 0.2–0.3 μm , el cuál es suficiente para muestrear una partícula bacteriana, pero insuficiente para una partícula viral. Los impactadores con una boquilla de diámetro más pequeño permiten una mayor aceleración lo que facilita la colecta de partículas más pequeñas. Las partículas de bioaerosoles son sometidas a impacto mecánico con los platos de colección, lo cual puede afectar su integridad y por lo tanto su detección. Por ejemplo, la integridad de un virus puede ser dañada por la alta fuerza de corte y deshidratación durante el impacto (Bhardwaj *et al.*, 2021).

La filtración es un método común para identificar y cuantificar microorganismos en el aire. Los filtros más comúnmente utilizados son de gelatina, los cuales pueden disolverse fácilmente en un medio de cultivo o permiten una transición gentil de gas a líquido después de haber capturado al

virus. Sin embargo, se recomienda filtrar por un período breve si se están usando filtros de gelatina para prevenir deshidratación (Bhardwaj *et al.*, 2021; Verreault *et al.*, 2008).

Los filtros más generalmente utilizados son los PTFE y gelatina, su eficiencia de colecta llega a ser del 96% (Fisher *et al.*, 2012; Gendron *et al.*, 2010; Lin y Marr, 2017; Robotto, Quaglino, *et al.*, 2021; Rüggeberg *et al.*, 2021). El muestreador de aire MD8 (Sartorius) con una membrana de gelatina con un tamaño de poro de 3 μM , ha sido exitosamente utilizado para MERS-CoV y SARS-CoV (Kim *et al.*, 2016). El tamaño de poro indicado de los filtros de gelatina no representa correctamente el tamaño de partícula colectable para el filtro, esto es debido a que la captura de aerosoles es llevada a cabo por factores físicos, como el movimiento Browniano, inercia de impacto, difusión, intercepción y atracciones electrostáticas y los filtros de gelatina son afectados por condiciones ambientales como la humedad relativa (Rahmani *et al.*, 2020).

2.6.1. Toma de Muestra con Filtro de Gelatina

La efectividad de distintos equipos que funcionan con diferentes principios de captura de partículas en el aire ha sido comparada; Abeykoon *et al.*, (2022) compararon la efectividad de tres muestreadores de aire: AirPort MD8, un filtro de gelatina; BioSampler, un *impinger*; y Coriolis Micro, un ciclón, para la recuperación de *Coxiella burnetii* la cual fue aerosolizada en una cámara aerobiológica. La cuantificación se realizó mediante qPCR. El equipo AirPort MD8 fue el único que pudo recuperar muestras en concentraciones cuantificables, con un porcentaje de recuperación entre 11-6-43.6%, mientras que los otros dispositivos alcanzaron un porcentaje de recuperación entre 0-15.4%, sin embargo, fue el de resultados más variables entre las réplicas. Los autores concluyeron que el MD8 tiene las mejores características para su uso en campo debido a que es sencillo de utilizar, no requiere equipo auxiliar ni fuente de energía externa. El mecanismo de filtración de aire del MD8 ha demostrado colectar DNA en mayores concentraciones que otros muestreadores en distintos contextos. Los criterios que tomaron en cuenta para la comparación de los muestreadores fueron los siguientes: la habilidad de detectar altas y bajas concentraciones de *C. burnetii* (eficacia); el tiempo y duración del muestreo; y Las propiedades de los muestreadores, incluyendo facilidad de manejo y operación en campo; así como la facilidad de limpieza y

desinfección del equipo (Abeykoon *et al.*, 2022).

En 1992, Jaschhof, reportó por primera vez la recuperación de partículas virales, Influenza Virus A, en el área pediátrica de pacientes con afecciones respiratorias, donde reportó una capacidad de retención del virus del 99.9%, utilizando un flujo 120 L/min x durante 15 minutos, en este trabajo no se reportó la HR ni la temperatura de las instalaciones. Asimismo, el mismo grupo de investigación evaluó la eficiencia del muestreador en diferentes condiciones de HR (50-55% y 85-89%) a un flujo alto de colecta (135 L/min) utilizando el bacteriófago T1 como subrogado y no reportaron señales de daño mecánico al virus al menos durante los primeros 15 min de colecta (Jaschhof, 1992a). En otro trabajo compararon la eficiencia del equipo con otros dos muestreadores, llegando a la conclusión de que el equipo MD8 mostraba una consistencia más confiable de colecta, siendo capaz de detectar hasta 1×10^2 UFP/m³ en un período de muestreo de 5 min en un volumen de 337.5 L.

En 2015 se reportó en Corea del Sur el brote más grande de Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS, por sus siglas en inglés) con 185 casos confirmados y 36 muertes reportadas (19%); Kim *et al.* (2016) detectaron la presencia del virus del Síndrome Respiratorio de Medio Oriente, MERS-CoV dentro de hospitales. Tomaron muestras de aire y de superficies e hicieron detección a través de RT-qPCR y cultivo. Para la toma de muestra de aire, emplearon el equipo Airport MD8 con un flujo de 50 L/min durante 20 min, con un total de 7 muestras obtenidas, las cuáles fueron empleadas para la detección de MERS-CoV por RT-qPCR directamente del filtro obtenido y por RT-qPCR después de propagar la muestra obtenida en cultivo celular. Todas las muestras que fueron recolectadas, fueron identificadas como positivas para MERS-CoV directamente con RT-qPCR, mientras que las que pasaron por cultivo celular previamente, 4 fueron positivas y 3 negativas. Los autores concluyeron que sus resultados generados aportan evidencia de la transmisión de MERS-CoV a través del aire.

Como se puede observar es necesaria la estandarización de un método de toma de muestra de virus en el aire para homogeneizar resultados, sin embargo, el uso de virus patógenos posee un riesgo para los operadores y el ambiente. Por lo cual, para este tipo de estudios se propone el uso de organismos subrogados que sirvan como modelo biológico con resultados extrapolables a los virus de interés.

2.7. Empleo de Bacteriófagos como Subrogados

Trabajar con patógenos en un laboratorio es una tarea laboriosa, ya que es necesario asegurar la protección tanto del laboratorista como evitar una posible contaminación, esto se logra utilizando equipo de protección personal, así como con equipos y protocolos que evitan la liberación del patógeno al medio ambiente, pero dado a que no todos los laboratorios cuentan con estos equipos o con el personal entrenado para manejar patógenos, se han buscado alternativas, como el uso de subrogados (Christensen *et al.*, 2022; Sinclair *et al.*, 2012).

Los subrogados son organismos, partículas o sustancias que pueden ser utilizadas para estudiar la respuesta o comportamiento de un organismo patógeno en un ambiente específico. La seguridad es el mayor beneficio de utilizar organismos no patógenos como subrogados. Otro punto clave para su uso es la habilidad para cultivar estos organismos de manera sencilla. Los subrogados son una parte esencial para la progresión de la microbiología ambiental como ciencia y para la investigación de varios campos, como prevención de bioterrorismo, calidad del agua, salud ocupacional, control de enfermedades infecciosas, etc. (Sinclair *et al.*, 2012).

Para el uso de un subrogado se deben de considerar una serie de atributos: los atributos prácticos, únicos del entorno experimental, los atributos biológicos intrínsecos del microorganismo y los atributos ambientales únicos al ambiente extrínseco del microorganismo, en el Cuadro 2 se muestra una lista completa de algunos de los atributos que deben ser considerados al momento de elegir un organismo subrogado, haciendo énfasis en que es importante definir inicialmente el propósito o la aplicación del estudio, antes de elegir al subrogado para decidir cuáles son los atributos más prioritarios (Sinclair *et al.*, 2012).

Cuadro 2. Atributos que se deben considerar al momento de elegir un subrogado (Sinclair *et al.*, 2012)

Atributos prácticos	Atributos biológicos	Atributos ambientales
<ul style="list-style-type: none"> ● Seguridad ● Disponibilidad en grandes cantidades ● Automatización ● Rapidez de detección ● Viabilidad del ensayo ● Validación ● Común en el ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> ● Morfología funcional ● Similaridad genética o taxonómica ● Hidrofobicidad ● Resistencia ● Estabilidad genética ● Tratamiento previo 	<ul style="list-style-type: none"> ● Temperatura ● pH ● Humedad relativa ● Radiación UV ● Contenido orgánico ● Requerimientos nutritivos ● Formación de biopelículas ● Naturaleza de propagación

Los bacteriófagos son percibidos como buenos modelos de estudio para otros virus de transmisión aérea debido a que son seguros de usar y su uso no requiere de medidas de bioseguridad especiales debido a su naturaleza de parásitos de bacterias obligados, algunos de ellos muestran estructuras similares a aquellas de virus de humanos y animales, y producirlos en grandes cantidades es relativamente sencillo (Turgeon *et al.*, 2014).

2.7.1. Bacteriófago MS2

Uno de los bacteriófagos más empleados como subrogado es el *Escherichia* fago MS2, conocido comúnmente como fago MS2, este se ha utilizado ampliamente en matrices como agua (Lin y Marr, 2017; Sala-Comorera *et al.*, 2021; Sinclair *et al.*, 2012) y aire (Christensen *et al.*, 2022; Turgeon *et al.*, 2014; Zuo *et al.*, 2013), asimismo, se ha utilizado como subrogado de virus patógenos de transmisión aérea, incluyendo a SARS-CoV-2, para evaluar la eficiencia de metodologías de toma de muestra de aire (Appert *et al.*, 2012; Gendron *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2016; Turgeon *et al.*, 2014; Zuo *et al.*, 2013). Zuo *et al.*, (2013) realizaron un estudio dónde compararon los efectos de la aerosolización y muestreo en la infectividad de 5 bacteriófagos sin

cola, Φ 6, Φ X174, PM2, PR772, MS2 y 2 virus patógenos, Influenza virus A H1N1 y el virus de la enfermedad de Newcastle, donde el bacteriófago MS2 fue el más resistente a la aerosolización y al muestreo y conservó su infectividad después de ser sometido a estos. Aun así, la detección a través de métodos moleculares, fue 10 veces más eficiente que la detección a través de conteo en placa.

El Fago MS2 es un bacteriófago de una sola hebra de RNA, sin envoltura con forma icosaédrica, parte de la familia *Fiersviridae*, el fago MS2 infecta *Escherichia coli* a través del pili-F al cuál se liga a través de la proteína de maduración que tiene en su cápside (de-Martín-Garrido *et al.*, 2020). Generalmente el fago MS2 es utilizado como indicador en el manejo de aguas residuales, utilizándose como un modelo general de virus, su tamaño va de 23 a 28 nm. Su morfología y tamaño están cercanamente relacionados con los de la familia *Picornaviridae* que incluye a varios virus que son patógenos para humanos, incluyendo el Poliovirus. El fago ha sido utilizado como modelo para determinar métodos de cuantificación de RNA; para estudios funcionales y estructurales, así como una herramienta de detección (Appert *et al.*, 2012; Dietrich *et al.*, 2020; Gendron *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2016; Pearce-Walker *et al.*, 2020; Sala-Comorera *et al.*, 2021; Turgeon *et al.*, 2014; Verreault *et al.*, 2015).

El fago MS2 se ha usado en diferentes estudios relacionados con la identificación y cuantificación de virus en el aire. Para lograr la reproducibilidad de metodologías entre experimentos es importante caracterizar y validar completamente todos los parámetros de una exposición a aerosoles. La humedad relativa de una habitación puede afectar la aerosolización del patógeno y el tamaño de la partícula puede determinar en qué parte del tracto respiratorio va a depositarse el microorganismo, lo cual afecta dramáticamente la patogénesis y la virulencia (Bowling *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020; Verreault *et al.*, 2015; Zuo *et al.*, 2013)

Gendron *et al.*, (2010) utilizaron al fago MS2 como subrogado de virus de RNA en el aire para comparar la eficiencia de diferentes filtros para muestrear el aire. Observaron que el 80% de los virus perdía un 60% de infectividad durante el proceso de ser muestreado. La infectividad se midió al momento 0, a las 4, 8 y 12 horas de muestreo, donde el tiempo de muestreo no fue un factor en la pérdida de infectividad, sino el método de muestreo y sugirieron que el uso de PCR aumenta la sensibilidad de la detección de virus en muestras de aire. También llegaron a la conclusión que la selección del filtro dependerá del tipo de virus a muestrear y el método utilizado para cuantificar las partículas virales.

Zargar *et al.*, (2022) aerosolizaron el fago MS2 como modelo de virus sin envoltura para evaluar la efectividad de dos purificadores de aire, concluyeron que la implementación de fagos como subrogados de virus patógenos en el aire, es una alternativa económica y segura al empleo de virus patógenos para la evaluación e implementación de metodologías del estudio de virus en el aire.

Por otra parte, Lin *et al.*, (2020) estudiaron los efectos de la HR, temperatura, pH, sal y proteínas en la supervivencia del fago MS2, encontrando que el factor que más afectaba su supervivencia en superficies después de ser aerosolizado era la HR, dónde se observó la menor viabilidad a una HR de 55% y resultó ser más alta a 20% y 80%. También se observó que, si en el medio se encuentra proteína, la supervivencia del virus a una HR alta, aumenta.

Además de ser utilizado como un subrogado para virus de transmisión aérea en general, el fago MS2 fue utilizado como subrogado de SARS-CoV-2 en diferentes estudios. Zulauf *et al.*, (2020) evaluaron la eficiencia del empleo de microondas para desinfectar cubrebocas KN-95, empleando al bacteriófago MS2 como subrogado de SARS-CoV-2, también Zargar *et al.*, (2022) emplearon el bacteriófago MS2 para evaluar la eficiencia de diferentes dispositivos de descontaminación de aire para eliminar virus, incluyendo a SARS-CoV-2.

(Anderson y Boehm, 2021) estudiaron la transmisión del bacteriófago MS2 a través del contacto mano-superficies, usándolo como un subrogado para SARS-CoV-2 y determinaron que se espera un 22% de transmisión de virus de una superficie contaminada a las manos, también sus resultados sugieren que virus sin envoltura, como es el caso del fago MS2 son transferidos más eficientemente que virus que sí presentan envoltura, concluyendo que los fomites pueden ser una fuente importante en la dispersión de virus patógenos sin envoltura.

3. HIPÓTESIS

La mayor eficiencia de colecta de virus se obtiene dentro de los rangos de flujo 20–28 L/min en un periodo de 10–20 min con una eficiencia de colecta del inóculo inicial mayor al 10%.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estandarizar un procedimiento de toma de muestra de partículas virales en aire utilizando al bacteriófago MS2 como subrogado en un ambiente de interior simulado.

4.2. Objetivos Específicos

Identificar las mejores condiciones para toma de muestra en ambientes simulados de interiores bajo los factores flujo de aire, tiempo de muestreo y concentración del inóculo utilizando el equipo de muestreo de aire MD8 Airport.

Identificar la relación entre las partículas virales detectadas a través de la metodología, con las partículas virales aerosolizadas en un ambiente simulado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cámara Aerobiológica

El experimento se desarrolló en una cámara aerobiológica que simula un espacio interior (Figura 1), con un volumen de 11,230 L (11.23 m³). Dentro de la cámara se generaron bioaerosoles con un tamaño de partícula de 5–50 µm con el nebulizador en frío DC20+ (VectorFog) al cuál se le agregaron 300 mL de la solución de bacteriófagos en tres concentraciones (1x10⁶, 1x10⁹ y 1x10¹² copias genómicas L⁻¹, (gc L⁻¹, por sus siglas en inglés)). La temperatura y la humedad relativa fueron registradas durante la duración del experimento empleando un equipo de captura de información automático (Hobo MX 1101) en intervalos de 30 s.

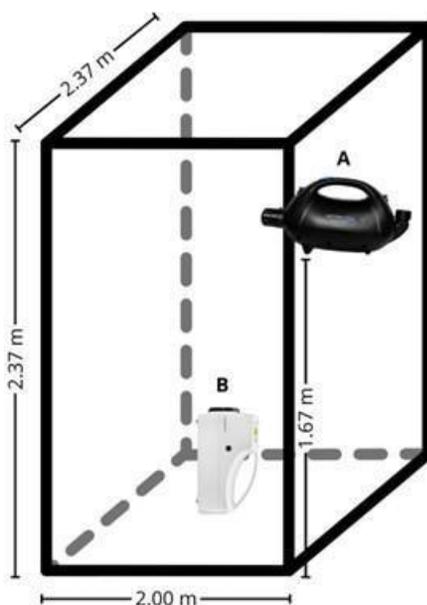


Figura 1. Representación de la cámara aerobiológica donde se llevaron a cabo las corridas experimentales. El nebulizador en frío DC20+ (VectorFog) (A) se colocó a una altura de 1.67 m con solamente la boquilla dentro de la cámara. El equipo de toma de muestra MD8 Airport (Sartorius) (B) se colocó en el centro de la cámara en posición vertical.

5.1.1. Limpieza y Desinfección de la Cámara

La cámara se limpió y desinfectó entre cada toma de muestra; las paredes, techo y filtros de aire fueron sanitizados con etanol al 70%, mientras que al piso se le aplicó una solución de cloro 1,000 ppm, y se colocó un purificador de aire comercial a máxima velocidad durante 15 min. Para la toma de muestra, se ingresó a la cámara con equipo de protección personal utilizado únicamente para este propósito, previamente sanitizado con etanol al 70%.

5.2. Preparación del Inóculo

5.2.1. Propagación del Bacteriófago MS2

Para la propagación del bacteriófago MS2, se utilizó la bacteria hospedera *Escherichia coli* ATCC 15597 la cual se incubó en Caldo Soya Trypticaseína (TSB, por sus siglas en inglés), durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, la propagación del fago se realizó con el método de agar de doble capa, en Agar Soya Trypticaseína (TSA, por sus siglas en inglés) y agar suave TSB con 0.5% de agarosa preparado de la siguiente manera: en un tubo de agar suave derretido se añadió 1 mL de la bacteria hospedera y 100 µL de fago, después de una agitación suave, el contenido del tubo se vertió sobre la superficie del agar, asegurándose de cubrir toda la superficie de la placa. Una vez solidificado el agar, se incubó a 37 °C por 24 h.

5.3. Preparación de la Curva Estándar para qPCR

Para llevar a cabo una qPCR con el fin de conocer el número exacto de copias genómicas es necesario tener un estándar de cuantificación que tenga una concentración conocida. A partir de

ellas se hace una curva estándar basada en la fluorescencia emitida por las diferentes concentraciones de las diluciones. Los valores de fluorescencia (medidas en RFU, Unidades Relativas de Fluorescencia) que emiten las muestras positivas y el ciclo de amplificación en el que fueron detectadas, su concentración es estimada comparando con la fluorescencia y ciclos de amplificación de las diluciones de la curva estándar. Para llevar a cabo este experimento se preparó el estándar de cuantificación empleando una metodología de clonación molecular en la que se insertó, en el plásmido TOPO 2.1, el fragmento usado en la identificación del bacteriófago MS2 (160 pb) por PCR en bacterias *E. coli* One Shot® Mach1™ - T1R quimiocompetentes. La cantidad exacta de copias genómicas μL^{-1} de reacción se determinó correlacionando los pesos moleculares del plásmido junto más el inserto de DNA y la concentración de DNA en la reacción, esto se explica más detalladamente en la sección de cálculo de número de copias de este trabajo.

5.3.1. Preparación de Bacterias Quimiocompetentes

Para efectuar la reacción de clonación, es necesario que las células a transformar sean competentes, es decir, que posean la capacidad de incorporar DNA exógeno del ambiente. Esta competencia se puede inducir mediante un tratamiento de soluciones de sales, Cloruro de Magnesio (MgCl_2) y Cloruro de Calcio (CaCl_2), conocido como quimiocompetencia. Por lo tanto, se prepararon células de *E. coli* One Shot® Mach1™ - T1^R con una solución de CaCl_2 para inducir su quimiocompetencia. Para esto se agregaron 100 μL de medio Luria-Bertani (LB) en un vial de *E. coli*, que posteriormente se extendió en una placa de agar LB e incubó a 37 °C durante toda la noche. Una vez activadas las células, se procedió a la producción de biomasa; se tomó una colonia y se incubó en 5 mL de medio LB líquido a 37 °C durante toda la noche con agitación de 220 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se transfirió todo el volumen a 100 mL de medio LB líquido, incubando a 37 °C con agitación de 220 rpm, midiendo la absorbancia hasta alcanzar una OD_{600} de 0.4. Las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher) cada 30 minutos en el programa de *Cell Culture* usando celdillas de plástico, tomó 2.5 h llegar a la absorbancia deseada.

Una vez alcanzada la absorbancia necesaria, el medio de cultivo se enfrió en hielo

(aproximadamente a 4 °C) durante 30 min; a partir de esta etapa, las células deben permanecer frías. El cultivo se transfirió a tubos para centrifuga de 50 mL, previamente enfriados, y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió, con agitación suave, en 10 mL de MgCl₂ 100 mM frío. La solución homogeneizada se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 25 mL CaCl₂ 100 mM frío; una vez resuspendidas las células se agregaron 25 mL adicionales de la solución de CaCl₂ y se incubaron en hielo durante al menos 20 min. Posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 1 mL de CaCl₂ 85 mM con 15% de glicerol, frío. La suspensión se distribuyó en alícuotas de 20 µL, listas para su uso inmediato, o para ser almacenadas a -80 °C. Se debe tomar en cuenta que es posible que las células puedan perder su competencia mientras más tiempo permanecen en almacenamiento.

5.3.2. Ligación del Vector de Clonación

La ligación se realizó a partir de una reacción de 50 µL de productos de PCR del fragmento de DNA molde, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, se mezclaron 4 µL de producto de PCR, 1 µL de solución salina, 1 µL de vector TOPO® y agua hasta lograr un volumen final de 6 µL. La reacción se homogeneizó gentilmente y se incubó a temperatura ambiente (22 – 23 °C) durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, la reacción se colocó en un baño de hielo.

5.3.3. Transformación de las Células Competentes

Para la transformación de células competentes One Shot® Mach1™ – T1^R se empleó 1 vial de células competentes y 3 placas con medio selectivo (Agar LB con 50 µg/mL de ampicilina). Un vial de medio super óptimo con represor catabólico (SOC, por sus siglas en inglés) se atemperó a temperatura ambiente. Las placas con agar fueron adicionadas con 40 µL de X-gal 40 mg/mL en

dimetilformamida, manteniéndose a 37 °C hasta su utilización.

Se agregaron 5 µL de la reacción TOPO® Cloning a un vial de *E. coli* químicamente competente y se mezcló gentilmente; posteriormente, se incubó en hielo durante 20 min, después se sometió a choque térmico a 42 °C en un thermoblock, sin agitación, durante 2 min. Inmediatamente después, los tubos se transfirieron a hielo y se agregaron 250 µL de medio SOC a temperatura ambiente. La reacción se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 h. El total de la reacción de cada transformación se extendió en placas de medio selectivo (LB con 50 µg/mL ampicilina) precalentadas (37 °C), estas se incubaron a 37 °C hasta observar colonias, seleccionando las colonias azul claro o blancas.

5.3.4. Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) empleando 5 mL de medio LB inoculados con *E. coli* transformada siguiendo las instrucciones del proveedor, se centrifugó a 12,000 g durante 1 min. El pellet se resuspendió con 250 µL de buffer R3 con RNAasa, incluido en el kit, posteriormente 250 µL de buffer L7 y se mezcló por inversión. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la solución se precipitó añadiendo 300 µL de buffer N4 y se homogeneizó por inversión para posteriormente vortexear a 12,000 g durante 10 min. El sobrenadante se añadió en una columna y se centrifugó a 12,000 g durante 1 min, el filtrado se descartó y se agregaron 700 µL de buffer W9 adicionado con etanol a la columna la cual se centrifugó a 12,000 g durante 1 min, posteriormente se descartó la solución filtrada. A la columna se agregaron 75 µL de buffer TE a 65 °C y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. La reacción fue centrifugada a 12,000 g durante 2 min, se descartó la columna y se conservó el DNA plasmídico.

5.3.5. Cálculo del Número de Copias del Plásmido

Para conocer el número de copias genómicas por μL , se cuantificó la concentración en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Este valor, junto con el tamaño del amplicón y del plásmido en pares de bases (pb) fueron sustituidos en la siguiente fórmula (Applied Biosystems, 2003):

$$\frac{\text{No. moléculas del plásmido}}{\text{concentración del plásmido}} = \frac{\text{g/molécula}}{\text{g}/\mu\text{L}} \quad \text{Ec. (1)}$$

5.4. Cuantificación del Bacteriófago MS2

Para la cuantificación del bacteriófago MS2 se realizó una curva estándar de los plásmidos obtenidos en la reacción de clonación a concentraciones de 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 y 1×10^1 copias genómicas por μL ($\text{gc } \mu\text{L}^{-1}$, por sus siglas en inglés) en la solución aerosolizada y recuperada. Para la detección del fago MS2 aerosolizado se emplearon los primers sentido 5'-GTCCATACCTTAGATGCGTTAGC-3 (Pos:1261–1284) y antisentido (5'-CCGTTAGCGAAGTTGCTTGG-3 (Pos: 1401–1420), así como la sonda 5-/56-FAM/ACGTCGCCAGTTCCGCCATTGTTCG/3BH (Pos: 1367–1391), con un tamaño de amplicón esperado de 160 pb (Gendron *et al.*, 2010). La amplificación se realizó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad Laboratories) con una mezcla de reacción compuesta de la siguiente manera: 12.5 μL del buffer Maxima Probe qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) 0.1 μM de cada primer, 0.2 μM de la sonda TaqMan, ~500 ng de cDNA y el resto se aforó con agua libre de nucleasas para un volumen final de 25 μL . La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: pre tratamiento de 50 °C durante 2 min, desnaturalización a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 seg y alineación a 60 °C por 30 seg y extensión a 72 °C durante 30 seg, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.5. Aerosolización del Inóculo

Los inóculos para aplicar en la cámara aerobiológica fueron preparados en concentraciones de 1×10^6 , 1×10^9 y 1×10^{12} gc L⁻¹ para simular cargas bajas, medias y altas que pueden ser expulsadas durante un evento de tos (Riediker & Tsai, 2020). La solución se preparó a partir de un stock del bacteriófago MS2 en una suspensión de buffer de sulfato de magnesio y cloruro de sodio (SM), preparado de la siguiente manera: 5.8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄ y 50 mL de Tris-Cl 1M, aforando hasta 1 L con agua destilada. La aplicación del inóculo se realizó con el nebulizador en frío DC20+ (VectorFog), con un tamaño de partícula de 5–50 µm y un flujo de 25 mL/min.

5.6. Toma de Muestra de Aire

La toma de muestra de aire se hizo después de la inoculación de la cámara utilizando el equipo MD8 Airport (Sartorius) siguiendo las recomendaciones del fabricante utilizando tres flujos de entrada de aire (20, 30 y 50 L/min) así como tres tiempos de toma de muestra (5, 15 y 25 min) se hicieron combinaciones de flujo y tiempo de muestreo como se muestra en el Cuadro 3.

Una vez terminado el proceso de toma de muestra se removió el filtro de gelatina y se hidrató en 5 mL de agua libre de nucleasas en un tubo cónico de 50 mL, el tubo se centrifugó a 3,000 g durante 1 min y posteriormente se incubó a 37 °C en un baño húmedo por 10 min para homogeneizar el contenido. La extracción de RNA viral se realizó con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo las modificaciones propuestas por Gendron *et al.*, (2010). A partir de 280 µL de muestra con una doble elución de 40 µL cada una.

Para realizar la retrotranscripción se emplearon 15 µL del RNA obtenido con el kit iScript™ Adv cDNA (BioRad), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para ello, se añadieron 1 µL de R-Transcriptasa y 4 µL de buffer iScript Supermix 5X, la reacción se incubó a 46 °C durante 20 min y se desnaturalizó la enzima R-Transcriptasa a 98 °C durante 1 min.

5.7. Cálculo de la Recuperación Viral

Para calcular la recuperación se usó el método de recuperación relativa propuesto por Gendron *et al.*, (2010), dividiendo la carga viral (copias por L) entre la concentración de fagos aerosolizados (multiplicando volumen aerosolizado por la concentración en la solución, y posteriormente dividiéndolo entre el volumen de la cámara y multiplicando el resultado por el volumen muestreado).

$$\left(\frac{\text{carga viral}}{\text{concentración de fagos}} \right) \div \text{volumen aerosolizado} \quad \text{Ec. (2)}$$

5.8. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Un diseño experimental factorial 2^k con tres factores fue empleado, el cual se muestra en el Cuadro 3, con tres factores, que corresponden al flujo y tiempo de muestreo, y la concentración del inóculo aerosolizado, cada factor cuenta con dos niveles, uno alto y uno bajo más un punto central, los cuales se detallan en el Cuadro 4. Las corridas experimentales fueron realizadas al azar.

Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para generar un modelo que predice la concentración de virus en el ambiente correlacionándolo con la concentración de virus cuantificados a través de qPCR, en el software Minitab v. 2019.

Cuadro 3. Diseño experimental de la toma de muestra.

A	B	C
-1	-1	-1
1	-1	-1
-1	1	-1
1	1	-1
-1	-1	1
1	-1	1
-1	1	1
1	1	1
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Donde A, B y C equivalen a flujo, tiempo de muestreo y concentración de inóculo aerosolizado, respectivamente, el valor más alto es representado con +1, el más bajo con -1 y el valor central con 0.

En el Cuadro 4 se representan los factores implicados en el experimento, junto con sus niveles:

Cuadro 4. Acotaciones del diseño experimental.

Factores				
N	A: Flujo	B: Tiempo	C: Concentración	
I	+1	50 L/min	25 min	1×10^{12} gc L ⁻¹
V	0	30 L/min	15 min	1×10^9 gc L ⁻¹
E	-1	20 L/min	5 min	1×10^6 gc L ⁻¹
L				
E				
S				

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Preparación del Inóculo y Título Viral

Inicialmente, para el desarrollo de los experimentos de esta investigación se llevó a cabo la propagación del subrogado con la finalidad de preparar tres concentraciones de virus que posteriormente fueron aerosolizadas. Para esto, se realizó la inoculación del fago MS2 ATCC 15597-B1 con su bacteria hospedera *E. coli* ATCC 15597, en agar doble capa (Figura 2). Para la cuantificación del título viral, se hicieron un total de 10 diluciones relativas seriadas, diluyendo 100 μL de stock de fago en 900 μL de buffer SM. Después de una incubación a 37 °C durante toda la noche se observó el crecimiento de césped bacteriano y la formación de placas de lisis por lo que se procedió a la cuantificación de unidades formadoras de placa (UFP).

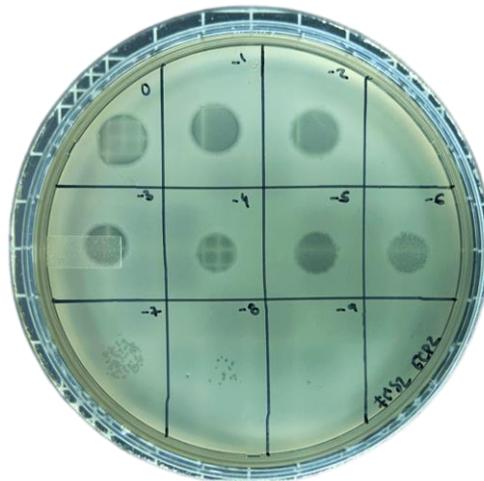


Figura 2. Diluciones del título viral del bacteriófago MS2. Cada cuadrante representa una dilución seriada de un logaritmo a partir del stock original del bacteriófago, se observa la formación de placas de lisis después de una incubación a 37 °C durante ~ 18 h. La cuantificación se realizó en la dilución relativa 1×10^{-8} donde se observan las placas de lisis aisladas.

Antes de proceder con la cuantificación de copias genómicas se realizó una estimación cuantitativa

de la concentración de bacteriófagos por mL del stock preparado. Para esto se determinó el título viral usando la ecuación 3. El conteo de placas se hizo en la dilución 1×10^{-8} , promediando un total de 5 placas bien aisladas.

$$\frac{(\# \text{ de placas}) (\text{recíproco de la dilución})}{\text{mL de fago inoculado}} = \frac{(5 \text{ placas}) (1 \times 10^8)}{(0.005 \text{ mL})} = \frac{1 \times 10^{11} \text{ UFP}}{\text{mL}} \quad \text{Ec. (3)}$$

Para este trabajo se partió de una concentración total del bacteriófago que de 1×10^{11} UFP/mL, a partir de la cual se prepararon las diluciones de trabajo una vez cuantificada por qPCR.

6.2. Construcción del Estándar de Cuantificación

Para obtener un estándar de cuantificación que se empleó posteriormente en qPCR se transformaron células de *E. coli* One Shot® Mach1™ - T1^R a las cuáles se les insertó el vector TOPO 2.1 ligado al amplicón de interés usado para identificar el fago MS2 obtenido a través de una reacción de PCR. Una vez hecha la reacción de transformación, se extendieron tres reacciones con diferentes diluciones de la ligación, una sin diluir, una diluida 1:10 y otra diluida 1:100, así como un control positivo proporcionado en el kit, el cual contiene el vector pUC19 empleado para determinar la eficiencia de la transformación. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se observó crecimiento en todas las placas, observándose mayor crecimiento en la placa dónde se inoculó la reacción sin diluir (Figura 3). Las colonias transformadas con el vector de interés son de color azul claro o blancas, debido a que el reactivo X-Gal se usa para detectar la inserción de DNA extraño en la región lacZ de un DNA plasmídico, lo que resulta en la pérdida de actividad de β-galactosidasa, por lo que las células bacterianas que retienen la β-galactosidasa activa dan lugar a colonias azul oscuro, ya que metabolizan la galactosa en el X-Gal (Ninfa & Ballou, 1998). Una vez obtenidas y visualizadas las células transformadas en placas de agar, se seleccionaron las colonias de color más claro y más aisladas de cada caja, tomando un total de 6

colonias. Cada colonia se punzó con un picadientes previamente esterilizado y se hizo una estría en un cuadrante de una placa con medio LB sólido adicionado con ampicilina y X-Gal (Figura 4); el picadientes con el resto de colonia se inoculó en un tubo con 5 mL medio LB adicionado con ampicilina (50 µg/mL) y se dejó crecer toda la noche. A los tubos dónde se observó crecimiento se les hizo extracción de DNA con Quick Extract™ (Biosearch Technologies) y se verificó la presencia del fragmento de interés a través de PCR en tiempo real. Una vez verificado que las células estaban transformadas correctamente, se procedió a hacer extracción de DNA plasmídico. Para la extracción de DNA plasmídico se seleccionaron las células bacterianas del cuadrante 2 que se muestra en la Figura 4. Estas se aislaron en una placa de LB con ampicilina, para su conservación; asimismo, se realizaron alícuotas para su conservación en ultracongelación (-80 °C) en glicerol 20%. Para hacer la extracción de DNA plasmídico, se tomó una colonia la cual se inoculó en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina, la cual se incubó toda la noche a 37 °C.

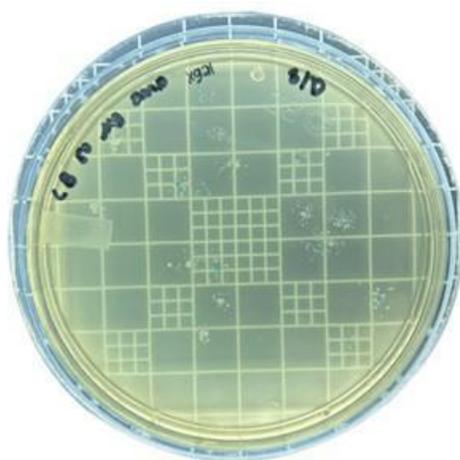


Figura 3. Placa con *E. coli* Mach1™ - T1^R transformadas, las colonias blancas o azul pálido son las colonias transformadas con el plásmido e inserto ligados.

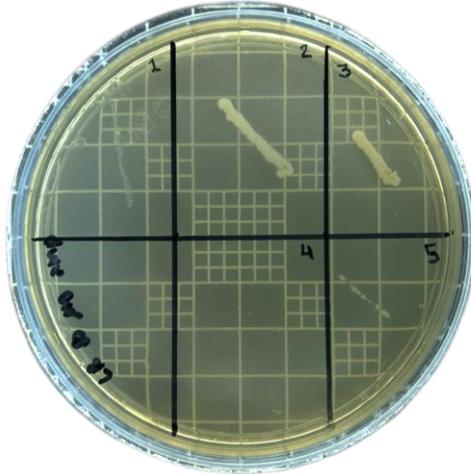


Figura 4. Placa con *E. coli* Mach1™ - T1^R sembrada y estriada. Se seleccionaron las colonias presuntamente transformadas, las cuáles se enumeraron y punzaron con un picadientes para posteriormente estriar en medio LB, incubando a 37 °C durante 18 h.

Posteriormente, se realizó la cuantificación absoluta del DNA plasmídico utilizando la fórmula descrita en la sección de materiales y métodos. Para esto se obtuvo el peso total en Daltons del plásmido ligado (4,091 pb), con un peso de 2,700,060 g/mol, el cual se dividió entre el número de Avogadro (6.022×10^{23}). Para obtener el número de moléculas, este valor se multiplicó por la concentración de DNA plasmídico ($13.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), que dividida entre el número de moléculas cuantifica el número preciso de moléculas por reacción, el cual fue 2.92×10^9 copias genómicas μL^{-1} . A partir de esta concentración, se hicieron diluciones seriadas de 1×10^7 hasta $1 \times 10^4 \text{ gc } \mu\text{L}^{-1}$, para la qPCR, con la finalidad de conocer las concentraciones virales aerosolizadas en un ambiente de oficina simulado, y que se pueden recuperar con la metodología de recuperación de aire.

Además, se determinó la concentración en $\text{gc } \mu\text{L}^{-1}$ del stock obtenido del fago MS2, descrito en la sección 6.1. Se realizó una cuantificación por qPCR con una curva estándar empleando diluciones seriadas de DNA plasmídico por triplicado, dando como resultado una concentración de $1 \times 10^8 \text{ gc } \mu\text{L}^{-1}$, que transformada a $\text{gc } \text{L}^{-1}$ es de 1×10^{13} . Comparando los resultados de la cuantificación del título viral del bacteriófago, la cual transformada a $\text{PFU } \text{L}^{-1}$ es de $1 \times 10^{14} \text{ PFU } \text{L}^{-1}$ la diferencia entre ambas cuantificaciones es de 1 logaritmo de la concentración determinada por qPCR, esto corresponde con la teoría de que cada PFU corresponde a 1 bacteriófago, pero debido a la naturaleza semi-cuantitativa de determinación del título viral, las unidades PFU pueden sobreestimar la concentración de partículas virales, debido a que una PFU puede estar originada por más de un bacteriófago.

6.3. Aerosolización

Para este procedimiento, las soluciones a aerosolizar fueron preparadas a partir de del control inicial del fago con una concentración de 1×10^{13} gc L⁻¹, se hicieron 3 diluciones con las siguientes concentraciones 1×10^6 , 1×10^9 y 1×10^{12} de gc L⁻¹, las cuales se prepararon con buffer SM a temperatura ambiente y se usaron inmediatamente. Estas preparaciones fueron aerosolizadas en la cámara para inocular el virus en el ambiente. Para cada corrida experimental, 300 mL de la disolución fueron cargados en el nebulizador y se generó aerosol durante 10 min. El volumen de aerosol generado fue cuantificado restando el volumen remanente en el equipo después de aerosolizar; para conocer el total de fagos aerosolizados, se multiplicó el volumen del aerosol (L) generado por el stock de fagos (gc L⁻¹) y se dividió entre el volumen total de la cámara (11,230 L), lo cual se ejemplifica en la ecuación 4.

$$\frac{(\text{Volumen de aerosol generado}) \times (\text{concentración de fagos})}{(\text{Volumen total de la cámara})} = \frac{(L) (gc/L)}{(L)} \quad \text{Ec. (4)}$$

La temperatura registrada durante todo el proceso fue de 24 ± 2 °C y la humedad relativa (HR) registrada fue de $84 \pm 6\%$. En la Figura 5 se observa una gráfica donde se representan la temperatura (°C) en color azul y la humedad relativa en color naranja, los días que corresponden al muestreo son el 13 y 14 de Julio, que se observan en la gráfica por la diferencia de temperatura y HR en comparación con otros días.

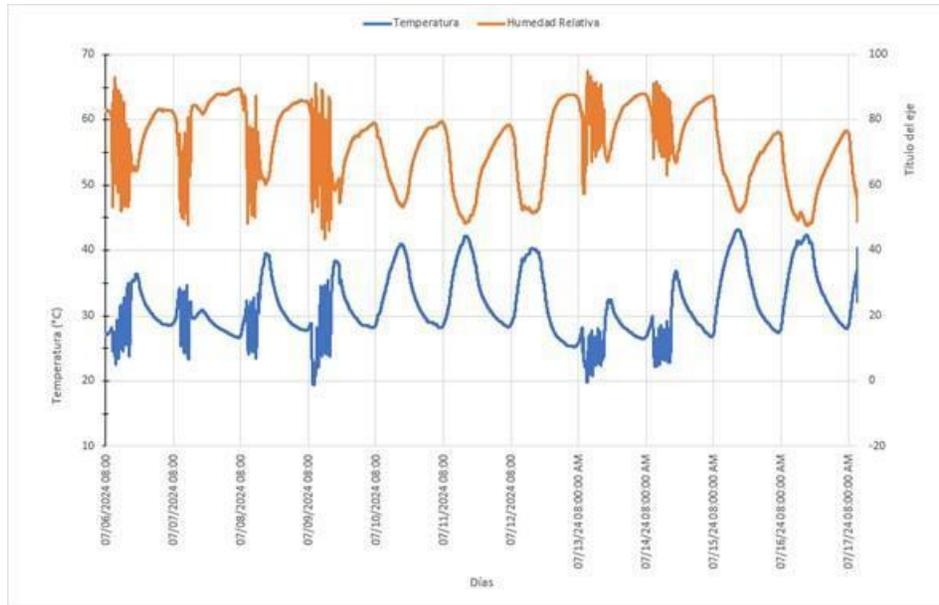


Figura 5. Registro de temperatura y humedad relativa en la cámara aerobiológica

La temperatura que se mantuvo durante el experimento es similar a temperaturas usadas en otros experimentos. Tal es el caso de Zargar *et al.*, (2022) donde se hace uso de una cámara aerobiológica que simula un espacio interior (25,000 L) en la cual aerosolizaron dos bacteriófagos, incluido el MS2; Los resultados indican que a una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de $50 \pm 5\%$ el bacteriófago MS2 puede permanecer suspendido en el aire más de 2 h sin disminuir su concentración más 1 logaritmo por cada mil litros de aire muestreado, sin embargo, en nuestro trabajo la diferencia de humedad relativa pudo ser la causa de una precipitación más rápida. Por su parte, Lin *et al.*, (2020) reportan que la viabilidad del bacteriófago MS2 en relación a la HR tiene un comportamiento en forma de U ya que es más estable en HR menores a 40% o cercanas a 100% y que su viabilidad disminuye drásticamente en HR intermedias.

6.4. Extracción de RNA Viral

Para la extracción de RNA viral se empleó el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). La extracción se realizó tanto con las modificaciones propuestas por Gendron *et al.*, (2010), como con las instrucciones dadas por el fabricante donde se probaron dos concentraciones de muestra

iniciales y dos eluciones finales (Cuadro 5), mayores concentraciones de RNA obtenidas están delimitadas por un rectángulo dentro de la misma tabla.

Cuadro 5. Condiciones de extracción de RNA, donde las variables fueron la cantidad de muestra inicial y la elución final.

	Cantidad inicial de muestra	Elución final	Concentración total de RNA
FMS2A	140 μL	1 x 60 μL	5.3 ng μL^{-1}
FMS2B	140 μL	2 x 40 μL	5.2 ng μL^{-1}
FMS2C	280 μL	1 x 60 μL	12.4 ng μL^{-1}
FMS2D	280 μL	2 x 40 μL	14 ng μL^{-1}

Los resultados indicaron que la mayor concentración de RNA fue extraída utilizando la metodología modificada, con un total máximo de 14 ng μL^{-1} , a comparación de 5.3 ng μL^{-1} obtenidos con la metodología sin modificaciones (Cuadro 5). Una prueba de Tukey fue usada para corroborar que las diferencias son significativas (Cuadro 6).

Cuadro 6. ANOVA y prueba de Tukey de las condiciones extracción de RNA

	Valor P (90%)	Prueba de Tukey
Cantidad inicial	0.068	A y B
Elución final	0.540	A

De acuerdo al análisis estadístico, la cantidad inicial de muestra es significativa para obtener la mayor concentración total de RNA final, mientras que la elución final, no se considera estadísticamente significativa. Por lo tanto, se procedió a realizar la extracción utilizando la mayor cantidad inicial de muestra con doble elución final para maximizar la cantidad de RNA obtenido. Esto fue de relevancia para los siguientes pasos de la metodología debido a que se tomó la decisión de preparar mayor volumen de RNA viral sin perder la concentración del RNA.

6.5. Verificación del Tamaño de Producto de PCR

Para verificar el tamaño del amplicón con un tamaño esperado de 160 pb se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 2%, aplicando un voltaje de 70 V durante 80 min (Figura 6).

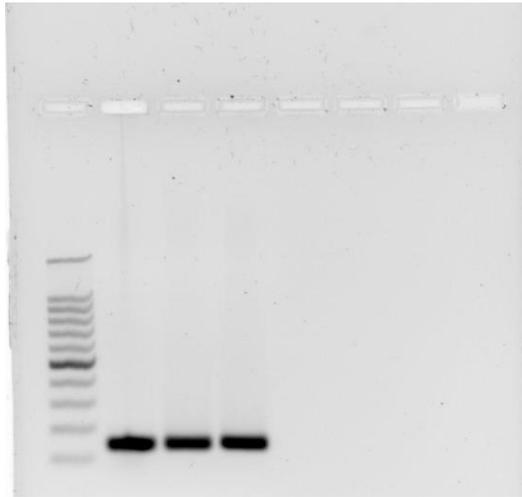


Figura 6. Visualización del gel de electroforesis (2% de agarosa), 70 V durante 80 min. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1,500 pb. En los siguientes carriles se cargó la muestra por triplicado donde se observa un amplicón de 160 pb.

6.6. Cuantificación con Curva Estándar

Las reacciones de qPCR se prepararon por triplicado, incluyendo controles de extracción, NTC, control de limpieza de la cámara aerobiológica y la curva estándar construida a partir del DNA plasmídico. En la Figura 7a se observan las curvas de amplificación generadas por el programa del termociclador, ImageLab (Bio-Rad) representadas en color morado, correspondientes a las concentraciones de DNA plasmídico 1×10^{13} gc L⁻¹ hasta 1×10^{10} gc L⁻¹. Los ciclos de amplificación de las muestras se representan en las curvas de color naranja.

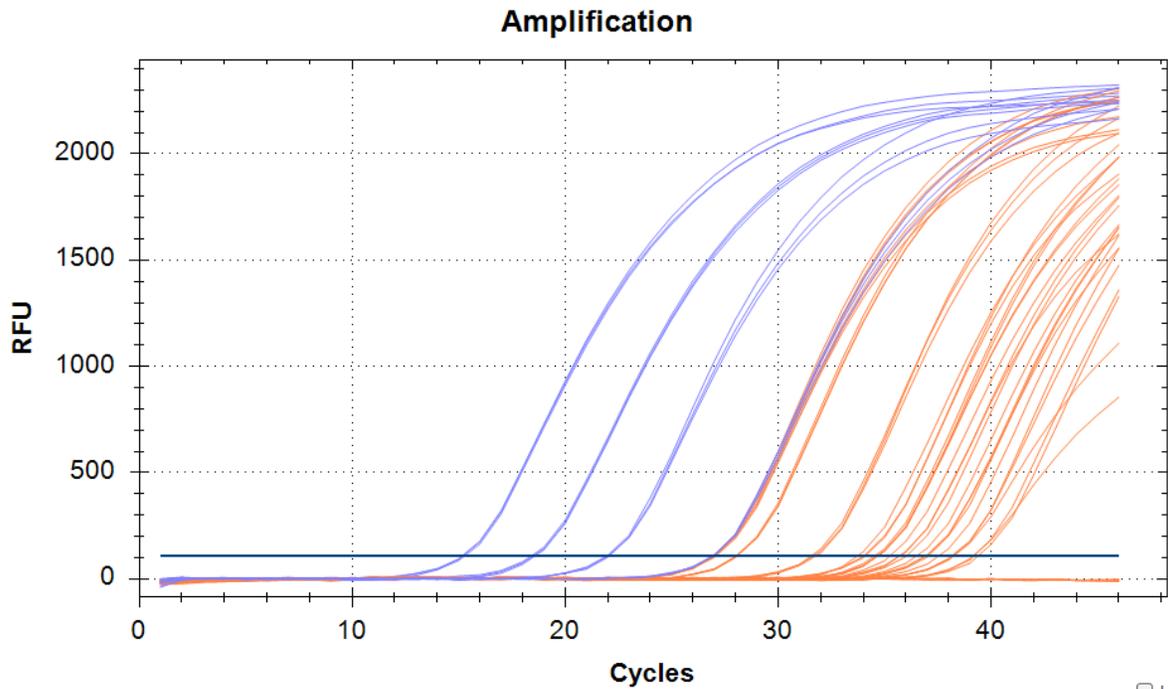


Figura 7. Ciclos de amplificación de qPCR. Las curvas moradas son los estándares de cuantificación que van de la concentración 1×10^{13} gc L^{-1} hasta 1×10^{10} gc L^{-1} , entre cada logaritmo hay una diferencia de 3.32 ciclos de amplificación. Las curvas naranjas son las muestras. En el eje vertical está representada la fluorescencia medida por el equipo y en el eje horizontal se encuentran los ciclos de amplificación.

Como se muestra en la figura 8, la eficiencia de amplificación fue del 81.3% y una R^2 de 0.990.

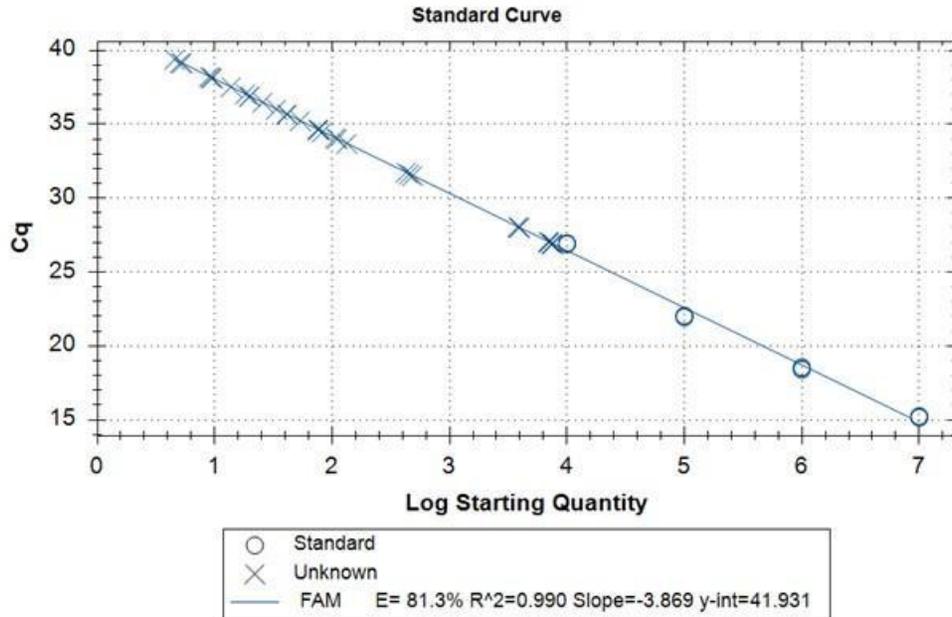


Figura 8. Curva estándar para la cuantificación del bacteriófago MS2 recuperado en el aire. Las marcas en forma de X en la recta son las muestras y los círculos son las diluciones del estándar de cuantificación. En el eje vertical están los ciclos de amplificación y en el eje horizontal la concentración de $gc \mu L^{-1}$ expresada en logaritmos.

6.7. Recuperación Relativa

La recuperación relativa es la relación de la carga viral presente en el ambiente y la cuantificación absoluta del fago recuperado, esta es una medición no absoluta que varía dependiendo de la concentración ambiental del microorganismo de interés.

En la Figura 8 se presentan en el eje vertical tanto las mediciones de las concentraciones de bacteriófagos aerosolizados en el ambiente y se comparan con la cuantificación absoluta realizada por qPCR, ambas se presentan en $gc L^{-1}$. En el eje horizontal, se separaron las diferentes corridas experimentales; en orden descendente están primero las concentraciones que se aerosolizaron, los flujos de muestreo que van el orden de mayor a menor y, por último, los tiempos de muestreo. Las concentraciones que fueron aerosolizadas están representadas en barras color morado y las cuantificadas se encuentran en color naranja.

En este trabajo se observó que cuando el fago se encuentra en una concentración baja en el ambiente, se recuperó y cuantificó por qPCR en el mismo factor logarítmico que el aerosolizado,

e incluso se cuantificó en cantidades mayores en algunos casos, esto no significa que se haya recuperado una mayor cantidad de virus que la que se aerosolizó, la metodología empleada funciona bajo un principio de concentración que toma cierta cantidad de aire a través de una corriente generada y lo concentra en un filtro de gelatina, el que posteriormente fue eluído en un volumen pequeño de agua. Para ejemplificar, si se tomó una muestra de un volumen de 100 L, todos los virus distribuidos en ese volumen son concentrados en 5 mL de agua libres de nucleasas, como se indica en la metodología, y a partir de ese concentrado, se hace la cuantificación.

En el punto central que es la concentración 1×10^9 gc L⁻¹, fue replicado 4 veces, por eso los flujos y tiempos de muestreo son los mismos en todas las mediciones. En este punto central se observa que las mediciones fueron más homogéneas, tanto en la cantidad de fagos en el ambiente como en los cuantificados a través de la metodología de toma de muestra y de cuantificación por qPCR, esto se debe a que el flujo y tiempo de muestreo para todos fue el mismo, entonces no se observa esa variabilidad, como se puede corroborar por el tamaño de las barras del error estándar. La recuperación en todas las corridas experimentales para esta concentración se encuentra en el factor logarítmico de 1×10^7 gc L⁻¹.

En la concentración más alta, la cual fue de 1×10^{12} gc L⁻¹, se observó una mayor diferencia entre la cantidad de virus aerosolizados y los recuperados. La recuperación total se encontró por lo general en un factor de 1×10^9 gc L⁻¹, sin embargo, en la corrida con la combinación del flujo más bajo (20 L/min) y el tiempo de muestreo más alto (25 min), la recuperación fue de un factor de 1×10^8 , disminuyendo 1 logaritmo en contraste con las demás combinaciones de flujo y tiempo de muestreo.

En total se estimó que la eficiencia de recuperación total es del $80 \pm 26\%$, esta cantidad es equiparable con la reportada por Truyols-Vives *et al.* (2022), el cual es el porcentaje de recuperación de partículas virales más alto reportado empleando el equipo MD8 (Sartorius); Gendron *et al.* (2010) reportaron una eficiencia de recuperación de partículas de fago MS2 empleando filtros de politetrafluoroetileno y policarbonato del $100 \pm 39\%$ y del $132 \pm 68\%$, respectivamente, en contraste, el estudio realizado por ellos se hizo en una cámara aerobiológica sellada herméticamente en la que se generaron 400 L de aerosol, por lo que el flujo y tiempo de muestreo pudo haber sido suficiente para lograr detectar todos los fagos que se encontraban distribuidos en un área con mayor alcance para el equipo de muestreo.

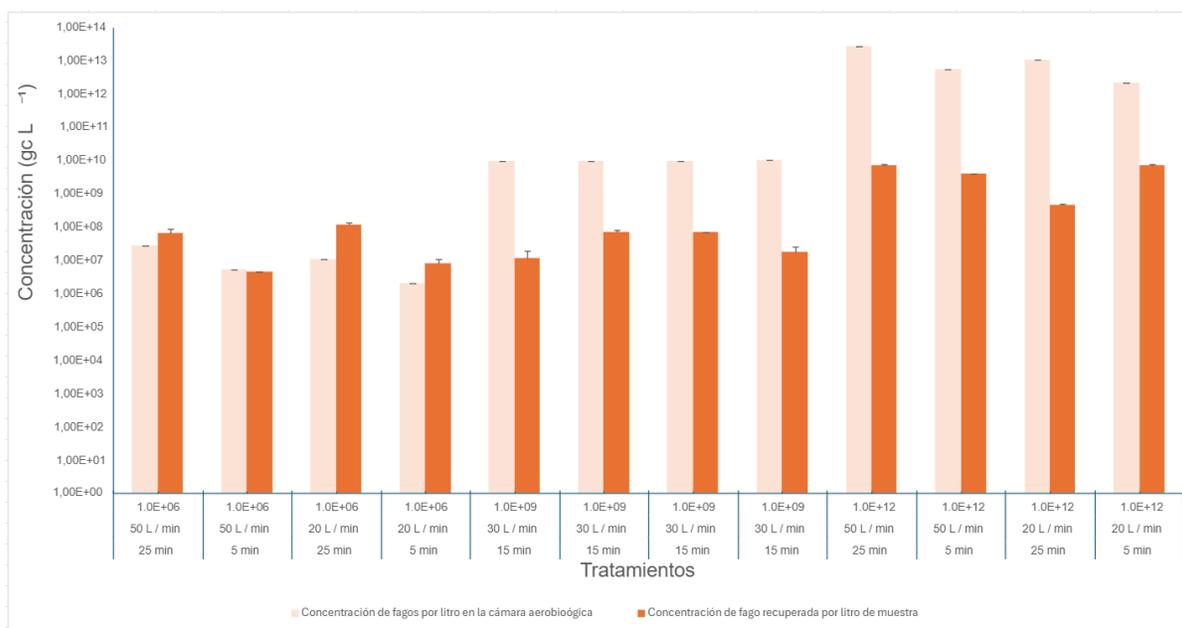


Figura 9. Relación de la concentración (gc L^{-1}) de fagos aerosolizados y fagos recuperados bajo diferentes condiciones de toma de muestra con el equipo MD8 Airport.

En la Figura 9 se presenta la recuperación relativa para las concentraciones aerosolizadas más altas y más bajas. Todas las unidades fueron transformadas a logaritmos base 10 (\log_{10}) para facilitar su interpretación. En el eje vertical de la Figura 9 se representa la recuperación relativa y en el eje horizontal están representados los flujos y tiempos de muestreo.

La recuperación relativa de la concentración aerosolizada más baja ($1 \times 10^6 \text{ gc L}^{-1}$) tuvo un comportamiento similar en las diferentes combinaciones de flujo y tiempo de muestreo. En este caso, el flujo de muestreo más bajo es en general más eficiente, con recuperaciones relativas de 0.58 y 1.04 $\log_{10} \text{ gc L}^{-1}$, obtenidas a los 5 y 25 min de muestreo, respectivamente. En la toma de muestra utilizando un flujo de 50 L/min, se observaron recuperaciones relativas de -0.067 y 0.39 $\log_{10} \text{ gc L}^{-1}$ para los tiempos de 5 y 25 min, respectivamente. En general, el flujo de muestreo más bajo (20 L/min) combinado con un tiempo de muestreo alto, de 25 min, fue más eficiente para la recuperación del bacteriófago MS2 en el aire, cuando este se encuentra en una concentración ambiental de $1 \times 10^6 \text{ gc L}^{-1}$. Los resultados son equiparables con lo publicado por Truyols-Vives *et al.*, (2022), quienes también reportaron una mayor eficiencia de cuantificación al usar flujos bajos de muestreo para recuperar SARS-CoV-2 del aire de una habitación de hospital utilizando un *impinger* BioSampler (SKC) con un flujo de 12.5 L/min, logrando detectar 28.4 ± 6.1 copias

genómicas por cada 1,000 L muestreados.

En contraste, en la concentración alta hubo una diferencia de casi $2 \log_{10}$ en la recuperación relativa obtenida en la toma de muestra con el flujo de 20 L/min, con respecto al tiempo de 5 min y de 25 min, donde se observa una mayor recuperación relativa en el tiempo más corto. Para el flujo de muestreo de 50 L/min, se encontró una diferencia de $0.414 \log_{10}$ entre la recuperación durante los dos tiempos de muestreo, este comportamiento es contrario al observado durante la toma de muestra con una concentración de fagos de 1×10^6 gc L⁻¹ en el ambiente. Estos resultados no se alinean con lo reportado por Truyols-Vives *et al.* (2022), sin embargo, estos autores también mencionan que los flujos bajos son empleados para recuperar virus en el ambiente y la concentración utilizada en esta parte del experimento no se suele encontrar bajo circunstancias normales, ya que se ha reportado concentraciones ambientales de virus de 1×10^2 a 1×10^4 partículas L⁻¹ (Prussin *et al.*, 2015).

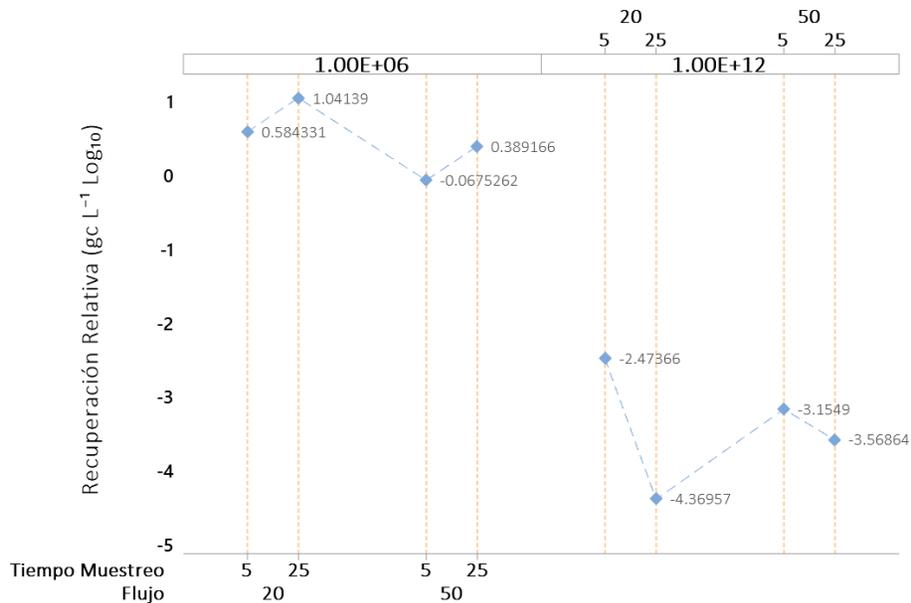


Figura 10. Recuperación relativa del bacteriófago MS2, obtenida a partir de la división de la concentración de fagos en el ambiente entre la concentración cuantificada a través de qPCR (eje vertical) en el eje horizontal se agrupan las diferentes combinaciones de flujo y tiempo de muestreo.

En general se observó que la recuperación relativa es inversamente proporcional a la concentración

ambiental del virus. Estos resultados son consistentes con los resultados presentados por Gendron *et al.*, (2010), quienes aerosolizaron una concentración conocida del bacteriófago MS2 de 1.1×10^7 gc L⁻¹ y lograron cuantificar por qPCR $6.2\text{--}8.3 \times 10^5$ copias L⁻¹, después de recuperar muestras de aire empleando filtros de policarbonato y politetrafluoroetileno, con una relación de recuperación relativa menor de $-1 \log_{10} \log_1$ gc L⁻¹. En el caso de este estudio, se emplearon 2 concentraciones del bacteriófago, una baja, de 1×10^6 y una alta de 1×10^{12} gc L⁻¹, logrando una cuantificación absoluta de 4.57×10^6 a 1.17×10^8 de gc L⁻¹ en la concentración aerosolizada más baja; y una cuantificación de 4.57×10^8 a 7.37×10^9 en la concentración más alta. Las concentraciones cuantificadas por qPCR variaron en función del tiempo y flujo empleados para tomar la muestra, en la Figura 9 se muestra la recuperación relativa y cómo varió de acuerdo a la concentración inicial y a los diferentes niveles de tratamientos.

El Análisis de Varianza (ANOVA) fue aplicado para comparar el aporte de las diferentes variables en el modelo, este tuvo un ajuste de 94.4%. Las variables comparadas fueron la concentración inicial del inóculo aerosolizado, el flujo de muestreo y el tiempo de muestreo, para esto se tomaron los puntos con réplicas de tratamientos que corresponden a los niveles más bajos y altos. La concentración inicial fue la variable con mayor significancia en el modelo, esto es de esperarse debido a la alta concentración de copias genómicas que se utilizaron y la diferencia entre la concentración más alta y más baja, la siguiente variable con más significancia fue la combinación de flujo y tiempo de muestreo (Figura 10), donde se observa que hay una menor recuperación relativa de virus a un flujo alto de muestreo, siendo el flujo bajo más eficiente en la recuperación, sin embargo, esta eficiencia disminuye con el tiempo de muestreo, esto se puede deber a que los filtros de gelatina se pueden saturar de humedad o romper dependiendo de la humedad relativa del sitio dónde se está haciendo el muestreo (Lin *et al.*, 2020).

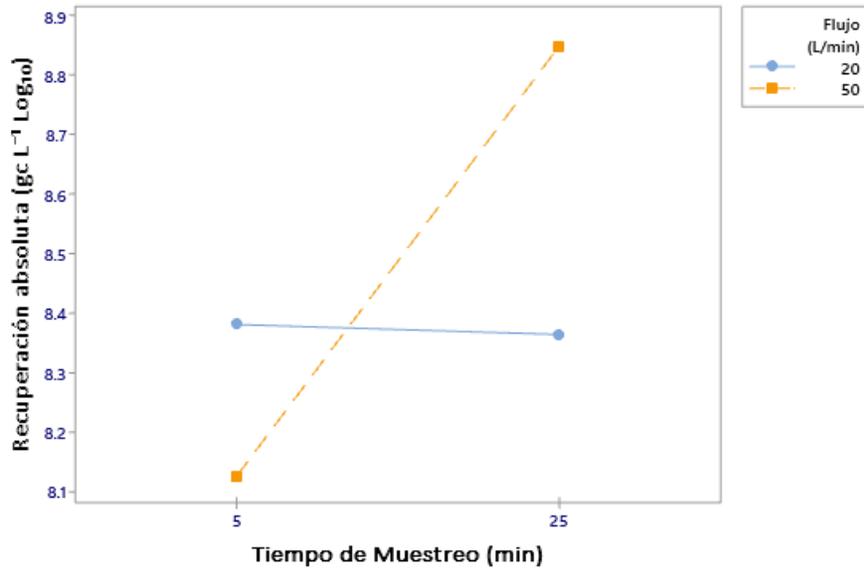


Figura 11. Interacción entre variables de flujo de muestreo y tiempo de muestreo

6.7.1. Análisis de Regresión Lineal

Un modelo de regresión lineal simple resultó adecuado para relacionar los fagos aerosolizados que se encuentran en el ambiente con los fagos detectados con una R^2 de 81.37% y R^2 ajustada de 80.53, y una pendiente de 2.266 (un valor p de 0.000). Lo anterior se interpreta que por cada incremento de 1 logaritmo en la concentración de fagos recuperados hay un incremento de 2.266 logaritmos en la concentración de fagos que fue aerosolizada. En el Cuadro 7 se muestran los términos usados en la ecuación y el valor de cada uno. A partir de la ecuación de regresión lineal (Ecuación 5) se puede estimar la concentración de bacteriófagos en el ambiente con una R^2 del 100%. Un análisis de predicción de los fagos en el ambiente contra los fagos recuperados, usando el modelo de regresión estimada se muestra en el Cuadro 8, así como en la Figura 12. El modelo tuvo una precisión del 60.46% al momento de estimar las concentraciones aerosolizadas en el ambiente para la concentración de 1×10^6 gc L⁻¹, mientras que esta precisión aumentó a un 97.88% para la concentración de 1×10^{12} gc L⁻¹.

$$\text{Concentración estimada de virus} = -12.22 + 2.266 (\text{Log virus cuantificados}) \quad \text{Ec. (5)}$$

Cuadro 7. Ecuación de regresión lineal

Término	Coficiente	Coficiente SE	Valor P
Constante	-12.22	1.97	0
LogRec	2.266	0.231	0

Donde la Constante son los fagos encontrados en el ambiente; LogRec representa los fagos recuperados, y SE se refiere a la Desviación Estándar

Cuadro 8. Relación de partículas aerosolizadas en la cámara aerobiológica con las concentraciones estimadas a recuperar obtenidas al aplicar la ecuación de regresión lineal a partir de las mediciones obtenidas por qPCR. Todas las cantidades se expresan en \log_{10}

A partir de un inóculo de 1×10^6 gc L^{-1}		A partir de un inóculo de 1×10^{12} gc L^{-1}	
Concentración Aerosolizada	Concentración Estimada	Concentración Aerosolizada	Concentración Estimada
6.65992	2.8714	8.68664	7.4639
8.1271	6.196	9.5955	9.5234
7.92012	5.727	9.87967	10.1673
6.98182	3.6008	9.87679	10.1608
6.65992	2.8714	8.65992	7.4034
8.04532	6.0107	9.59439	9.5209
7.88195	5.6405	9.84942	10.0988
6.97081	3.5759	9.87448	10.1556
6.65992	2.8714	8.63144	7.3389
8.02938	5.9746	9.58206	9.493
7.61805	5.0425	9.84198	10.0819
6.71012	2.9851	9.85126	10.103

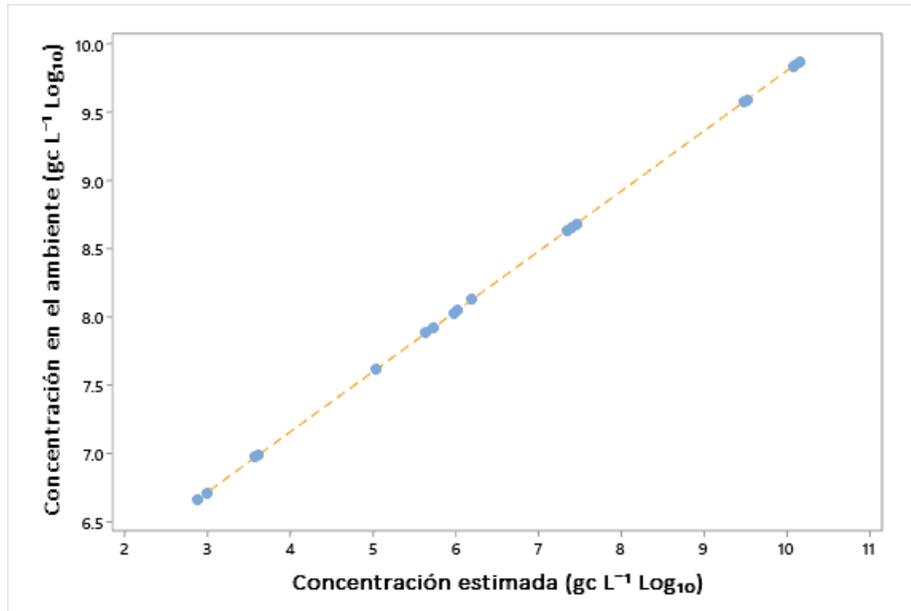


Figura 12. Correlación de la concentración real de fagos en el ambiente (eje vertical), con la concentración estimada de fagos en el ambiente (eje horizontal).

El estudio de los microorganismos en el aire representa un reto importante en todos los campos de la salud humana, ambiental y la industria alimentaria, debido a la gran variedad metodologías para identificar y cuantificar a los microorganismos de interés en el aire. Debido a que recientemente se ha enfatizado en la estandarización del monitoreo microbiológico del aire, en este trabajo se propuso un monitoreo cuantitativo, el cual incluye una metodología de toma de muestra activa (Huang *et al.*, 2024), permitiendo en un tiempo corto, tomar un volumen grande de muestra. Esto es una característica muy importante cuando se monitorea la calidad microbiológica en espacios interiores, particularmente si consideramos que estos se encuentran habitados y es necesario tomar las muestras de manera eficiente. Esto acoplado a una identificación y cuantificación mediante técnicas de biología molecular, en este caso qPCR, permite una identificación rápida de virus potencialmente peligrosos, así como determinar su concentración en el ambiente.

7. CONCLUSIONES

El empleo de filtro de gelatina, acoplado a qPCR con sonda y utilizando plásmidos transformados como estándar de cuantificación demostró ser un método muy sensible, detectando cantidades tan bajas del bacteriófago MS2 como 1×10^6 gc L⁻¹, y un porcentaje de recuperación del $80 \pm 26\%$.

Un flujo de muestreo de 20 L/min probó ser eficiente para la recuperación y cuantificación del bacteriófago MS2 en una concentración de 1×10^6 gc L⁻¹, presentando una eficiencia de recuperación relativa de $1.04 \log_{10}$, la más alta obtenida en todos los tratamientos aplicados

La recuperación y cuantificación en los tratamientos con la concentración aerosolizada de 1×10^{12} gc L⁻¹ de bacteriófago MS2, fue en la que se obtuvieron recuperaciones relativas más bajas. Se observó que el tratamiento con la combinación de flujo de muestreo de 20 L/min y durante 5 min, generó la mejor recuperación relativa ($-2.47 \log_{10}$ gc L⁻¹) en este grupo.

A partir de la información obtenida se pueden tomar decisiones con respecto a medidas de seguridad como mejorar la ventilación del área muestreada, definir un límite de personas que pueden estar en un espacio determinado, así como identificar puntos críticos de control de la calidad microbiológica en la producción de alimentos para evitar contaminaciones a través de la ruta aeromicrobiológica.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación son un precedente para facilitar el estudio de la ruta aeromicrobiológica como una de las principales formas de transmisión de patógenos en el aire, sería interesante incluir concentraciones más bajas en la ecuación de regresión lineal para aumentar el rango de predicción del modelo.

En espacios más grandes, puede que sea necesario tomar muestra en diferentes puntos, los resultados obtenidos en este trabajo son comparables solamente con espacios interiores de dimensiones similares.

Es importante que antes de emplear una metodología con la que no se ha trabajado, realizar experimentos preliminares para conocer la mejor manera de usar el equipo e interpretar los datos y así plantear la mejor estrategia metodológica para el fin que se esté realizando el monitoreo del aire.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abeykoon, A. M. H., Poon, M., Firestone, S. M., Stevenson, M. A., Wiethoelter, A. K., & Vincent, G. A. (2022). Performance Evaluation and Validation of Air Samplers To Detect Aerosolized *Coxiella burnetii*. *Microbiology Spectrum*, *10*(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00655-22>
- Alsved, M., Bourouiba, L., Duchaine, C., Löndahl, J., Marr, L. C., Parker, S. T., Prussin, A. J., & Thomas, R. J. (2020). Natural sources and experimental generation of bioaerosols: Challenges and perspectives. *Aerosol Science and Technology*, *54*(5), 547–571. <https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1682509>
- Anderson, C. E., & Boehm, A. B. (2021). Transfer Rate of Enveloped and Nonenveloped Viruses between Fingerpads and Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(22). <https://doi.org/10.1128/AEM.01215-21>
- Appert, J., Raynor, P. C., Abin, M., Chander, Y., Guarino, H., Goyal, S. M., Zuo, Z., Ge, S., & Kuehn, T. H. (2012). Influence of suspending liquid, impactor type, and substrate on size-selective sampling of MS2 and adenovirus aerosols. *Aerosol Science and Technology*, *46*(3), 249–257. <https://doi.org/10.1080/02786826.2011.619224>
- Bao, L., Gao, H., Deng, W., Lv, Q., Yu, H., Liu, M., Yu, P., Liu, J., Qu, Y., Gong, S., Lin, K., Qi, F., Xu, Y., Li, F., Xiao, C., Xue, J., Song, Z., Xiang, Z., Wang, G., ... Qin, C. (2020). Transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 via close contact and respiratory droplets among human angiotensin-converting enzyme 2 mice. *Journal of Infectious Diseases*, *222*(4), 551–555. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa281>
- Bhardwaj, J., Hong, S., Jang, J., Han, C. H., Lee, J., & Jang, J. (2021). Recent advancements in the measurement of pathogenic airborne viruses. *Journal of Hazardous Materials*, *420*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126574>
- Bio-Rad Laboratories. (s/f). *What is Real-Time PCR (qPCR)?* | *Bio-Rad*. Recuperado el 28 de mayo de 2024, de <https://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/what-real-time-pcr-qcr?ID=LUSO4W8UU>
- Blair, R. V., Vaccari, M., Doyle-Meyers, L. A., Roy, C. J., Russell, K., Fahlberg, M., Monjure, C. J., Beddingfield, B., Plante, K. S., Plante, J. A., Weaver, S. C., Qin, X., Midkiff, C. C., Lehmicke, G., Golden, N., Threton, B., Penney, T., Allers, C., Barnes, M. B., ... Rappaport, J. (2020). “*ARDS and Cytokine Storm in SARS-CoV-2 Infected Caribbean Vervets*” *1 2 1*. *985871*, 6569. <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.157933>
- Borges, J. T., Yuri, L., Nakada, K., Guedes Maniero, M., & Guimarães, J. R. (2021). *SARS-CoV-2: A systematic review of indoor air sampling for virus detection*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13001-w>/Published
- Bowling, J. D., O'malley, K. J., Klimstra, W. B., Hartman, A. L., & Reed, D. S. (2019). *A Vibrating Mesh Nebulizer as an Alternative to the Collision Three-Jet Nebulizer for Infectious Disease Aerobiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM>
- Buonanno, G., Robotto, A., Brizio, E., Morawska, L., Civra, A., Corino, F., Lembo, D., Ficco, G., & Stabile, L. (2022). Link between SARS-CoV-2 emissions and airborne concentrations:

Closing the gap in understanding. *Journal of Hazardous Materials*, 428. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128279>

- Cheng, V. C. C., Wong, S. C., Chen, J. H. K., Yip, C. C. Y., Chuang, V. W. M., Tsang, O. T. Y., Sridhar, S., Chan, J. F. W., Ho, P. L., & Yuen, K. Y. (2020). Escalating infection control response to the rapidly evolving epidemiology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) due to SARS-CoV-2 in Hong Kong. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 41(5), 493–498. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.58>
- Chia, P. Y., Coleman, K. K., Tan, Y. K., Ong, S. W. X., Gum, M., Lau, S. K., Lim, X. F., Lim, A. S., Sutjipto, S., Lee, P. H., Son, T. T., Young, B. E., Milton, D. K., Gray, G. C., Schuster, S., Barkham, T., De, P. P., Vasoo, S., Chan, M., ... Moses, D. (2020). Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16670-2>
- Chirca, I. (2019). The hospital environment and its microbial burden: Challenges and solutions. *Future Microbiology*, 14(12), 1007–1010. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0140>
- Christensen, B., Kesavan, M., Rule, A., & Kesavan, J. (2022). *Analysis of Generation and Sampling Methods for MS2 Virus Aerosols*.
- CONAHCYT. (2023). *COVID-19 Tablero México*. COVID - 19 Tablero México. <https://datos.covid-19.conacyt.mx/index.php>
- Cox, J., Mbareche, H., Lindsley, W. G., & Duchaine, C. (2020). Field sampling of indoor bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*, 54(5), 572–584. <https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1688759>
- de Martín Garrido, N., Crone, M. A., Ramlaul, K., Simpson, P. A., Freemont, P. S., & Aylett, C. H. S. (2020). Bacteriophage MS2 displays unreported capsid variability assembling T = 4 and mixed capsids. *Molecular Microbiology*, 113(1), 143–152. <https://doi.org/10.1111/mmi.14406>
- Dietrich, W. L., Bennett, J. S., Jones, B. W., & Hosni, M. H. (2020). *Morbidity and Mortality Weekly Report Laboratory Modeling of SARS-CoV-2 Exposure Reduction Through Physically Distanced Seating in Aircraft Cabins Using Bacteriophage Aerosol-November 2020*. <https://www.sae.org/publications/technical-papers/content/2021-01-0036/>
- Faridi, S., Niazi, S., Sadeghi, K., Naddafi, K., Yavarian, J., Shamsipour, M., Jandaghi, N. Z. S., Sadeghniaat, K., Nabizadeh, R., Yunesian, M., Momeniha, F., Mokamel, A., Hassanvand, M. S., & MokhtariAzad, T. (2020). A field indoor air measurement of SARS-CoV-2 in the patient rooms of the largest hospital in Iran. *Science of the Total Environment*, 725. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138401>
- Fisher, E. M., Richardson, A. W., Harpest, S. D., Hofacre, K. C., & Shaffer, R. E. (2012). Reaerosolization of MS2 bacteriophage from an N95 filtering facepiece respirator by simulated coughing. *Annals of Occupational Hygiene*, 56(3), 315–325. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mer101>
- Fröhlich-Nowoisky, J., Kampf, C. J., Weber, B., Huffman, J. A., Pöhlker, C., Andreae, M. O., Lang-Yona, N., Burrows, S. M., Gunthe, S. S., Elbert, W., Su, H., Hoor, P., Thines, E., Hoffmann, T., Després, V. R., & Pöschl, U. (2016). Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. *Atmospheric Research*, 182, 346–376.

<https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2016.07.018>

- Gendron, L., Verreault, D., Veillette, M., Moineau, S., & Duchaine, C. (2010). Evaluation of filters for the sampling and quantification of RNA phage aerosols. *Aerosol Science and Technology*, *44*(10), 893–901. <https://doi.org/10.1080/02786826.2010.501351>
- Griffin, D. W., Garrison, V. H., Herman, J. R., & Shinn, E. A. (2001). African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health. En *Aerobiologia* (Vol. 17, pp. 203–213). <http://toms.gsfc.nasa.gov>
- Guzman, M. I. (2021). An overview of the effect of bioaerosol size in coronavirus disease 2019 transmission. *International Journal of Health Planning and Management*, *36*(2), 257–266. <https://doi.org/10.1002/hpm.3095>
- Hancková, M., & Betáková, T. (2022). Pandemics of the 21st century: The risk factor for obese people. *Viruses*, *14*(1). <https://doi.org/10.3390/v14010025>
- Hayleeyesus, S. F., & Manaye, A. M. (2014). Microbiological quality of indoor air in University libraries. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*, S312–S317. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C807>
- Hu, J., Lei, C., Chen, Z., Liu, W., Hu, X., Pei, R., Su, Z., Deng, F., Huang, Y., Sun, X., Cao, J., & Guan, W. (2020). Distribution of airborne SARS-CoV-2 and possible aerosol transmission in Wuhan hospitals, China. *National Science Review*, *7*(12), 1865–1867. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa250>
- Huang, Z., Yu, X., Liu, Q., Maki, T., Alam, K., Wang, Y., Xue, F., Tang, S., Du, P., Dong, Q., Wang, D., & Huang, J. (2024). Bioaerosols in the atmosphere: A comprehensive review on detection methods, concentration and influencing factors. *Science of the Total Environment*, *912*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168818>
- Hussain, H. H., Ibraheem, N. T., Al-Rubaey, N. K. F., Radhi, M. M., Hindi, N. K. K., & AL-Jubori, R. H. K. (2022). A review of airborne contaminated microorganisms associated with human diseases. *Medical Journal of Babylon*, *19*(2), 115–122. https://doi.org/10.4103/MJBL.MJBL_20_22
- Ijaz, M. K., Zargar, B., Wright, K. E., Rubino, J. R., & Sattar, S. A. (2016). Generic aspects of the airborne spread of human pathogens indoors and emerging air decontamination technologies. *American Journal of Infection Control*, *44*(9), S109–S120. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.008>
- Jaschhof, H. (1992a). *Collecting Airborne Viruses and Phages Using the Gelatin Membrane Filter Method*.
- Jaschhof, H. (1992b). *Collection using a Membrane Filter at a High Air Sampling Rate*.
- Jawerth, N. (2020, julio 16). *How is the COVID-19 virus detected using real time RT-PCR?* [Text]. International Atomic Energy Agency; IAEA. <https://www.iaea.org/bulletin/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>
- Jiang, X., Pan, M., Hering, S. V., Lednicky, J. A., Wu, C. Y., & Fan, Z. H. (2016). Use of RNA amplification and electrophoresis for studying virus aerosol collection efficiency and their comparison with plaque assays. *Electrophoresis*, *37*(19), 2574–2580. <https://doi.org/10.1002/elps.201600141>

- Jimenez, J. L., Marr, L. C., Randall, K., Ewing, E. T., Tufekci, Z., Greenhalgh, T., Tellier, R., Tang, J. W., Li, Y., Morawska, L., Mesiano-Crookston, J., Fisman, D., Hegarty, O., Dancer, S. J., Bluysen, P. M., Buonanno, G., Loomans, M. G. L. C., Bahnfleth, W. P., Yao, M., ... Prather, K. A. (2022). What were the historical reasons for the resistance to recognizing airborne transmission during the COVID-19 pandemic? *Indoor Air*, 32(8). <https://doi.org/10.1111/ina.13070>
- Karimzadeh, S., Bhopal, R., & Nguyen Tien, H. (2021). Erratum: Review of infective dose, routes of transmission and outcome of COVID-19 caused by the SARS-COV-2: Comparison with other respiratory viruses (*Journal of Physical Chemistry* (2021) 149 (E96) DOI: 10.1017/S0950268821000790). *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268821001084>
- Kausar, A., Arif, J. M., Profile, S., Alanazi, S., & Alzapni, Y. (2016). *Assessment of microbial load in indoor environment of university and hospitals of hail, ksas*. <https://www.researchgate.net/publication/309768154>
- Kim, S. H., Chang, S. Y., Sung, M., Park, J. H., Kim, H. B., Lee, H., Choi, J. P., Choi, W. S., & Min, J. Y. (2016). Extensive Viable Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus Contamination in Air and Surrounding Environment in MERS Isolation Wards. *Clinical Infectious Diseases*, 63(3), 363–369. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw239>
- Lednicky, J. A., Lauzard, M., Fan, Z. H., Jutla, A., Tilly, T. B., Gangwar, M., Usmani, M., Shankar, S. N., Mohamed, K., Eiguren-Fernandez, A., Stephenson, C. J., Alam, M. M., Elbadry, M. A., Loeb, J. C., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Cherabuddi, K., Morris, J. G., & Wu, C. Y. (2020). Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 100, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.025>
- Lin, K., & Marr, L. C. (2017). Aerosolization of Ebola Virus Surrogates in Wastewater Systems. *Environmental Science and Technology*, 51(5), 2669–2675. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04846>
- Lin, K., Schulte, C. R., & Marr, L. C. (2020). Survival of MS2 and Φ6 viruses in droplets as a function of relative humidity, pH, and salt, protein, and surfactant concentrations. *PLoS ONE*, 15(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243505>
- Lindsley, W. G., Green, B. J., Blachere, F. M., Martin, S. B., Law, B. F., Jensen, P. A., & Schafer, M. P. (2017). *NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), 5th Edition Sampling and characterization of bioaerosols*.
- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., Sun, L., Duan, Y., Cai, J., Westerdahl, D., Liu, X., Xu, K., Ho, K. fai, Kan, H., Fu, Q., & Lan, K. (2020). Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*, 582(7813), 557–560. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2271-3>
- Mainelis, G. (2020). Bioaerosol sampling: Classical approaches, advances, and perspectives. *Aerosol Science and Technology*, 54(5), 496–519. <https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1671950>
- Manibusan, S., & Mainelis, G. (2022). *Passive Bioaerosol Samplers: A Complementary Tool for Bioaerosol Research. A Review*.

- Mbareche, H., Brisebois, E., Veillette, M., & Duchaine, C. (2017). Bioaerosol sampling and detection methods based on molecular approaches: No pain no gain. *Science of the Total Environment*, 599–600, 2095–2104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.076>
- Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., & Yampolskaya, O. (1994). The sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science*, 266(5188), 1202–1208. <https://doi.org/10.1126/science.7973702>
- Ninfa, A. J., & Ballou, D. P. (1998). *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*. Wiley.
- Ong, S. W. X., Tan, Y. K., Chia, P. Y., Lee, T. H., Ng, O. T., Wong, M. S. Y., & Marimuthu, K. (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(16), 1610–1612. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3227>
- Pan, M., Lednicky, J. A., & Wu, C. Y. (2019). Collection, particle sizing and detection of airborne viruses. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1596–1611. <https://doi.org/10.1111/jam.14278>
- Pearce-Walker, J. I., Troup, D. J., Ives, R., Ikner, L. A., Rose, J. B., Kennedy, M. A., & Verhougstraete, M. P. (2020). Investigation of the effects of an ultraviolet germicidal irradiation system on concentrations of aerosolized surrogates for common veterinary pathogens. *American Journal of Veterinary Research*, 81(6), 506–513. <https://doi.org/10.2460/ajvr.81.6.506>
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (2015). *Environmental Microbiology* (Third Edition).
- Prussin, A. J., Garcia, E. B., & Marr, L. C. (2015). Total concentrations of virus and bacteria in indoor and outdoor air. *Environmental Science and Technology Letters*, 2(4), 84–88. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00050>
- Rahmani, A. R., Leili, M., Azarian, G., & Poormohammadi, A. (2020). Sampling and detection of corona viruses in air: A mini review. *Science of the Total Environment*, 740. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140207>
- Rai, S., Singh, D. K., & Kumar, A. (2021). Microbial, environmental and anthropogenic factors influencing the indoor microbiome of the built environment. *Journal of Basic Microbiology*, 61(4), 267–292. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000575>
- Riediker, M., & Tsai, D. H. (2020). Estimation of Viral Aerosol Emissions From Simulated Individuals With Asymptomatic to Moderate Coronavirus Disease 2019. *JAMA network open*, 3(7), e2013807. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.13807>
- Robotto, A., Civra, A., Quaglino, P., Polato, D., Brizio, E., & Lembo, D. (2021). SARS-CoV-2 airborne transmission: A validated sampling and analytical method. *Environmental Research*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111783>
- Robotto, A., Quaglino, P., Lembo, D., Morello, M., Brizio, E., Bardi, L., & Civra, A. (2021). SARS-CoV-2 an indoor/outdoor air samples: A methodological approach to have consistent and comparable results. *Environmental Research*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110847>
- Rüggeberg, T., Milosevic, A., Specht, P., Mayer, A., Frey, J., Petri-Fink, A., Burtscher, H., &

- Rothen-Rutishauser, B. (2021). A Versatile Filter Test System to Assess Removal Efficiency for Viruses in Aerosols. *Aerosol and Air Quality Research*, 21(12). <https://doi.org/10.4209/AAQR.210224>
- Sala-Comorera, L., Reynolds, L. J., Martin, N. A., O'Sullivan, J. J., Meijer, W. G., & Fletcher, N. F. (2021). Decay of infectious SARS-CoV-2 and surrogates in aquatic environments. *Water Research*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117090>
- Santarpia, J. L., Ratnesar-Shumate, S., & Haddrell, A. (2020). Laboratory study of bioaerosols: Traditional test systems, modern approaches, and environmental control. *Aerosol Science and Technology*, 54(5), 585–600. <https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1696452>
- Santurtún, A., & Shaman, J. (2023). Work accidents, climate change and COVID-19. *Science of the Total Environment*, 871. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162129>
- Sattar, S. A., Kibbee, R. J., Zargar, B., Wright, K. E., Rubino, J. R., & Ijaz, M. K. (2016). Decontamination of indoor air to reduce the risk of airborne infections: Studies on survival and inactivation of airborne pathogens using an aerobiology chamber. *American Journal of Infection Control*, 44(10), e177–e182. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.067>
- Setti, L., Passarini, F., De Gennaro, G., Barbieri, P., Perrone, M. G., Borelli, M., Palmisani, J., Di Gilio, A., Torboli, V., Fontana, F., Clemente, L., Pallavicini, A., Ruscio, M., Piscitelli, P., & Miani, A. (2020). SARS-Cov-2RNA found on particulate matter of Bergamo in Northern Italy: First evidence. *Environmental Research*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109754>
- Sheng, W., Geiger, J. H., & Borhan, B. (2020). Chapter Eighteen—No-wash live cell imaging with a photoswitchable near-infrared hCRBPII protein-fluorophore tag. En D. M. Chenoweth (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 639, pp. 389–411). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.058>
- Silva, P. G., Branco, P. T. B. S., Soares, R. R. G., Mesquita, J. R., & Sousa, S. I. V. (2022). SARS-CoV-2 air sampling: A systematic review on the methodologies for detection and infectivity. *Indoor Air*, 32(8). <https://doi.org/10.1111/ina.13083>
- Sinclair, R. G., Rose, J. B., Hashsham, S. A., Gerba, C. P., & Haase, C. N. (2012). Criteria for selection of surrogates used to study the sate and control of pathogens in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1969–1977. <https://doi.org/10.1128/AEM.06582-11>
- Tastassa, A. C., Sharaby, Y., & Lang-Yona, N. (2024). Aeromicrobiology: A global review of the cycling and relationships of bioaerosols with the atmosphere. *Science of the Total Environment*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168478>
- Trivedi, P. C., Pandey, S., & Bhadauria, S. (2015). *Text Book of Microbiology* (5th ed.).
- Truyols-Vives, J., Stiliyanov-Atanasov, K., Sala-Llinàs, E., Toledo-Pons, N., Baldoví, H. G., & Mercader-Barceló, J. (2022). Efficiency and sensitivity optimization of a protocol to quantify indoor airborne SARS-CoV-2 levels. *Journal of Hospital Infection*, 130, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.08.011>
- Turgeon, N., Toulouse, M.-J., Martel, B., Moineau, S., & Duchaine, C. (2014). Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies. *Applied and Environmental Microbiology*,

80(14), 4242–4250. <https://doi.org/10.1128/AEM.00767-14>

- US EPA, O. (2020, junio 17). *Indoor Air and Coronavirus (COVID-19)* [Collections and Lists]. <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/indoor-air-and-coronavirus-covid-19>
- Verreault, D., Marcoux-Voiselle, M., Turgeon, N., Moineau, S., & Duchaine, C. (2015). Resistance of aerosolized bacterial viruses to relative humidity and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7305–7311. <https://doi.org/10.1128/AEM.02484-15>
- Verreault, D., Moineau, S., & Duchaine, C. (2008). Methods for Sampling of Airborne Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *72*(3), 413–444. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00002-08>
- Wen, Z., Yu, L., Yang, W., Wang, J., Zhao, J., Li, N., Lu, J., & Li, J. (2009). Detection of viral aerosols by use of real-time quantitative PCR. *Aerobiologia*, *25*(2), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10453-009-9110-1>
- Whon, T. W., Kim, M.-S., Roh, S. W., Shin, N.-R., Lee, H.-W., & Bae, J.-W. (2012). Metagenomic Characterization of Airborne Viral DNA Diversity in the Near-Surface Atmosphere. *Journal of Virology*, *86*(15), 8221–8231. <https://doi.org/10.1128/jvi.00293-12>
- Yezli, S., & Otter, J. A. (2011). Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. *Food and Environmental Virology*, *3*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7>
- Zargar, B., Sattar, S. A., Kibbee, R., Rubino, J., & Khalid Ijaz, M. (2022). Direct and quantitative capture of viable bacteriophages from experimentally contaminated indoor air: A model for the study of airborne vertebrate viruses including SARS-CoV-2. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(2), 1489–1495. <https://doi.org/10.1111/jam.15262>
- Zulauf, K. E., Green, A. B., Nguyen Ba, A. N., Jagdish, T., Reif, D., Seeley, R., Dale, A., & Kirby, J. E. (2020). *Microwave-Generated Steam Decontamination of N95 Respirators Utilizing Universally Accessible Materials*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20076117>
- Zuo, Z., Kuehn, T. H., Verma, H., Kumar, S., Goyal, S. M., Appert, J., Raynor, P. C., Ge, S., & Pui, D. Y. H. (2013). Association of airborne virus infectivity and survivability with its carrier particle size. *Aerosol Science and Technology*, *47*(4), 373–382. <https://doi.org/10.1080/02786826.2012.754841>