



**Evaluación microbiológica de la calidad del aire en las áreas del Laboratorio de
Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1.**

Quishpe Nasimba, Jean Pierre

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

10 de agosto del 2021

Reporte urkund



Document Information

Analyzed document	Urkund_Titulación_Quishpe_Jean_Pierre.pdf (D111185039)
Submitted	8/11/2021 10:48:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISE
R

Firmado digitalmente
por ALMA ROSEL
KOCH KAISER
DN: cn=ALMA
ROSEL KOCH
KAISER, o=EC
c=SECURITY DATA
S.A. 2.00=ENTIDAD
DE CERTIFICACION
DE INFORMACION
Motivo: Estoy
aprobando este
documento
Ubicación:
Fecha: 2021-08-12
12:15:05.00

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

C. C. 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, **"Evaluación microbiológica de la calidad del aire en las áreas del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1."** fue realizado por el señor **Quishpe Nasimba, Jean Pierre** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de agosto de 2021

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISE
R

Firmado digitalmente
por ALMA ROSEL
KOCH KAISER
DN: cn=ALMA
ROSEL KOCH
KAISER, o=EC
o=SECURITY DATA
S.A. 2, ou=ENTIDAD
DE CERTIFICACION
DE INFORMACION
Motivo: Estoy
aprobando este
documento
Ubicación:
Fecha: 2021-08-12
12:19:05:00

.....
Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

C. C. 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Responsabilidad de autoría

Yo, **Quishpe Nasimba, Jean Pierre**, con cédula de ciudadanía n° **1721796702**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación microbiológica de la calidad del aire en las áreas del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1."** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de agosto de 2021

Firma

.....
Quishpe Nasimba, Jean Pierre

C.C.: 1721796702



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Autorización de publicación

Yo, **Quishpe Nasimba, Jean Pierre**, con cédula de ciudadanía n°**1721796702**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Evaluación microbiológica de la calidad del aire en las áreas del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1."** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de agosto de 2021

Firma

.....
Quishpe Nasimba, Jean Pierre

C.C.: 1721796702

Dedicatoria

A mi **Dios** omnipotente, omnisciente,
omnipresente, por sus bendiciones y no dejarme nunca.

A mi **amada**:

Madre, Martha Cecilia Nasimba por su abnegada labor e
inefable apoyo para conmigo.

Abuelita, Valentina Nasimba Sinailin por su
condescendencia, altruismo y eterno amor que me ha brindado.

Hermana, Tania Valentina Quishpe Nasimba por su
admiración y cariño fraterno.

A mi **padre** Luis Alfonso Quishpe Socasi, pese a su
temprana partida siempre estará en mi mente y corazón.

Finalmente, a mis queridas mascotas.

Jean Pierre Quishpe Nasimba

Agradecimientos

A mi Dios, mi madre, mi abuelita y mi hermana.

Al honorable Colegio Nacional Experimental Juan Pío Montúfar, por forjarme la dedicación académica, cimentar bases de conocimiento y encaminar un ciudadano y Señor al servicio de la patria y sociedad, "*Lege et Surge* es el lema que inspira la jornada a la cima anhelante".

A la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE por brindarme una de las mejores experiencias de vida. A sus ilustres docentes por el gran aporte profesional que contribuyeron a mi formación académica técnico - científica.

A las profesionales del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades FF.AA. N°1, por nutrirme con su experiencia en el desarrollo las prácticas preprofesionales y la tesis.

A mis compañeros y amigos junto con los cuales compartí el transcurso de la carrera universitaria y actividades extracurriculares.

Jean Pierre Quishpe Nasimba

Índice de contenido

<i>Reporte urkund</i>	2
<i>Certificación</i>	3
<i>Responsabilidad de autoría</i>	4
<i>Autorización de publicación</i>	5
<i>Dedicatoria</i>	6
<i>Agradecimientos</i>	7
<i>Índice de contenido</i>	8
<i>Índice de Tablas</i>	12
<i>Índice de Figuras</i>	14
<i>Resumen</i>	15
<i>Abstract</i>	16
<i>Capítulo I</i>	17
Introducción	17
Justificación	18
Objetivo de investigación	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	20
Hipótesis nula	20

Hipótesis alternativa	20
<i>Capítulo II</i>	21
Marco Teórico	21
Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1. (H.E-1)	21
La calidad del aire interior IAQ (Indoor Air Quality)	21
Salud y Bienestar	22
La “nube microbiana” humana en el ambiente	23
La microaeroflora, bioaerosoles y sus efectos biológicos	23
Fuentes comunes de bioaerosoles	25
Los bioaerosoles en el entorno hospitalario	25
El desafío de la supervivencia microbiana en el aire	27
Correlación entre la contaminación microbiana de superficies y el aire	28
Mecanismos de control de bioaerosoles.....	29
Naturaleza multifase del aerosol.....	30
Robert Heinrich Hermann Koch	33
El método o técnica de sedimentación de Koch.....	34
Ventajas del método de Koch	35
Desventajas del método de Koch	36
Vasily Leonidovich Omeliansky (В.Л. Омелянского).....	36
Parámetros referenciales para evaluar el grado o nivel de contaminación microbiológica del aire.....	37
<i>Capítulo III</i>	48

	10
Materiales y Métodos	48
Características del área de estudio.....	48
Indumentaria para el muestreo	50
Condiciones ambientales del lugar de muestreo.....	50
Plan de muestreo	51
Técnica de muestreo.....	52
Variable de estudio.....	52
Puntos de muestreo y características de su selección.....	52
Dimensiones del lugar de muestreo.....	57
Número de puntos de muestreo.....	57
Momento del muestreo.....	58
Periodo de muestreo y número de muestras.....	59
Tiempo de exposición de las placas de Petri	59
Preparación de los medios de cultivo	60
Cuantificación, número total microbiano o recuento microbiano total.....	62
Fórmula o regla de Vasily Leonidovich Omelyansky	64
Limitaciones de la fórmula o ecuación de cálculo Omeliana.....	66
Caracterización e identificación microbiana	66
<i>Capítulo IV</i>	68
Resultados.....	68
Microorganismos recolectados de muestras de aire	68

	11
Recálculo de Omeliansky en volumen de aire.....	70
Recuento microbiano total de UFC por m ³ de aire	71
Expresión de la tasa de incidencia de contaminación microbiana del aire	73
Grado o nivel de contaminación microbiológica del aire	74
Microaeroflora identificada en los ambientes interiores	76
<i>Capítulo V</i>	81
Discusión	81
<i>Capítulo VI</i>	86
Conclusiones	86
Recomendaciones	86
Bibliografía.....	88
Anexos.....	108

Índice de Tablas

Tabla 1 La velocidad de sedimentación de los aerosoles.....	32
Tabla 2 Naturaleza multifase del aerosol microbiano.....	32
Tabla 3 Documentos de normas ISO para salas blancas	38
Tabla 4 Categorías de limpieza en el aire para las salas blancas y zonas limpias, ISO 14644	39
Tabla 5 Clasificación de sala limpia de acuerdo con la Norma Federal 209	40
Tabla 6 Clasificación de salas limpias y dispositivos de aire limpio según GMP EU	41
Tabla 7 Equivalencias ISO 14644-1, grado GMP y Estándar Federal 209.....	41
Tabla 8 Límites microbiológicos recomendados según la EU GMP Anexo 1. ^a	42
Tabla 9 Tasas de recuperación de contaminación inicial sugeridas en entornos asépticos	43
Tabla 10 Clasificaciones de aire ^a y límites para la biocontaminación en el aire	45
Tabla 11 Categoría de contaminación de microorganismos en el aire según EUR 14988 EN..	46
Tabla 12 Normativa española y estándares del grado de contaminación del aire	47
Tabla 13 Descripción de las áreas que conforman el Laboratorio de Microbiología HE-1	49
Tabla 14 Reporte de las condiciones ambientales durante la recolección de muestras.....	51
Tabla 15 Ubicaciones de muestreo en función del área de una sala blanca, ISO 14644-1.....	53
Tabla 16 Dimensiones de las áreas target del Laboratorio de Microbiología HE-1	57
Tabla 17 Número de puntos de muestreo en función del tamaño de cada habitáculo.	58
Tabla 18 Número de UFC de bacterias obtenidas en cada día de muestreo por habitación.....	68
Tabla 19 Número de UFC de hongos obtenidas en cada día de muestreo por habitación	69

Tabla 20	Número de microorganismos totales expresados en UFC / 4 horas o UFC / plato. ...	69
Tabla 21	Cálculo del número de bacterias y hongos por m ³ según la regla de V.L Omeliansky	70
Tabla 22	Número total microbiano o recuento microbiano total de UFC por m ³ de aire	72
Tabla 23	Tasa de incidencia de contaminación microbiana.....	74
Tabla 24	Referenciación de microorganismos totales con la GMP de la UE y la FDA.	75
Tabla 25	Grado o nivel de contaminación microbiana del aire interior estudiado.	76
Tabla 26	Microorganismos identificados en el laboratorio microbiológico.....	77

Índice de Figuras

Figura 1 Salas limpias y ambientes controlados, relación de tamaños en micrones.....	30
Figura 2 ¿Por qué la preocupación por las partículas?	31
Figura 3 Correlación aproximada entre el número de partículas y UFC en el aire.	44
Figura 4 Ubicación geográfica del lugar de estudio	48
Figura 6 Esquema del método envolvente o sobre “Метод конверта”.....	55
Figura 7 Observación microscópica de microorganismos	67
Figura 8 Número de UFC de bacterias y hongos recolectados por m ³ de aire.....	71
Figura 9 Número total microbiano por m ³ de aire	72
Figura 10 Comparación de resultados obtenidos en UFC / plato vs UFC / m ³ totales	73
Figura 11 Observación macroscópica de UFC de bacterias y hongos recolectados.....	77
Figura 12 Observación microscópica de colonias bacterianas recolectadas	78
Figura 13 Observación microscópica de hongos recolectados	78
Figura 14 Observación microscópica de hongos recolectados	79
Figura 15 Observación microscópica de hongos recolectados	79
Figura 16 Observación microscópica de hongos recolectados	80

Resumen

El análisis microbiológico del aire se lleva a cabo para estudiar las condiciones del ambiente y la calidad del aire interior. El presente estudio observacional implica la recuperación de bioaerosoles como bacterias y hongos del ambiente aéreo de las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 (H.E-1). Para la evaluación microbiológica del aire se estructuró un programa o plan de control de monitoreo ambiental. Se utilizó el método pasivo o método de placa de sedimentación de Koch con medios de cultivo agar tripticasa de soja y agar dextrosa Sabouraud, las placas de Petri se expusieron durante 4 horas y para el recuento microbiano total en volumen de aire (UFC / m³) se empleó la fórmula de Omeliansky. El recuento microbiano total fue sumamente mayor en el área de trabajo y el área de limpieza con 764 UFC / m³ y 201 UFC / m³ respectivamente. El grado o nivel de contaminación microbiana en ciertas áreas del laboratorio no cumplen con las normas internacionales ya que exceden los límites de contaminación aceptables. Se identificaron bacterias como *Bacillus* spp. y estafilococos coagulasa negativos, además, seis géneros de hongos incluidos mohos y levaduras. Una vez conocidos los resultados del estudio se desencadenó una serie de medidas correctivas cuyo objetivo fue disminuir la concentración de microorganismos y la prevención de infecciones transmitidas por el aire.

Palabras clave:

- **BIOAEROSOL**
- **CALIDAD DEL AIRE INTERIOR**
- **MONITOREO AMBIENTAL**
- **MÉTODO DE SEDIMENTACIÓN DE KOCH**
- **FÓRMULA DE OMELIANSKY**

Abstract

The microbiological analysis of the air is carried out to study environmental conditions and indoor air quality. The present observational study involves the recovery of bioaerosols such as bacteria and fungi from the air environment of the facilities of the Microbiology Laboratory of the Hospital of Specialties of the Armed Forces N°1 (H.E-1). For the microbiological evaluation of the air, an environmental monitoring control program or plan was structured. The passive method or Koch's sedimentation plate method was used with culture media trypticase soy agar and Sabouraud dextrose agar, the Petri dishes were exposed for 4 hours and for total microbial air volume count (CFU / m³) Omeliansky's formula was used. The total microbial count was vastly higher in the work area and the cleaning area with 764 CFU / m³ and 201 CFU / m³ respectively. The degree or level of microbial contamination in certain areas of the laboratory does not meet international standards as they exceed acceptable contamination limits. Bacteria were identified as *Bacillus* spp. and coagulate-negative staphylococci, in addition, six genus of fungi including molds and yeasts. Once the results of the study were known, a series of corrective measures were triggered, the aim of which was to reduce the concentration of microorganisms and prevent airborne infections.

Keywords:

- **BIOAEROSOL**
- **INDOOR AIR QUALITY**
- **ENVIRONMENTAL MONITORING**
- **KOCH SEDIMENTATION METHOD**
- **OMELIANSKY FORMULA**

Capítulo I

Introducción

La biotecnología roja es una rama de la biotecnología moderna que se ocupa de la salud humana, se ha convertido en una parte muy importante de la investigación, diagnóstico, terapia génica y los ensayos clínicos (Steiner, 2020). De la misma manera, la microbiología se investiga activamente y el campo avanza continuamente. Los laboratorios microbiológicos son lugares destinados para el trabajo práctico de científicos y técnicos profesionales (Nayeem, 2016). El Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 es imprescindible en la atención de los pacientes al detectar los microorganismos responsables de infecciones asociadas a la atención médica.

La calidad microbiológica del aire es un criterio que debe tenerse en cuenta cuando los lugares de trabajo en interiores están diseñados para proporcionar un entorno seguro (Hayleeyesus & Manaye, 2014). Las interacciones de microorganismos con el material particulado permiten comprender mejor el papel de las partículas de bioaerosol como un reservorio potencial de patógenos en el entorno hospitalario (Brusina et al., 2020).

La evaluación del aire se lleva a cabo mediante la determinación del número total microbiano de aire (Boiko, 2016). El número total de gérmenes en el aire, aunque de carácter muy global, permite apreciar las condiciones sanitarias de una habitación, que influyen en las transmisiones de infecciones difundidas por el aire (Cernei et al., 2013).

La pandemia del COVID-19 demuestra la necesidad de generalizar el conocimiento moderno sobre el mecanismo aerogénico de transmisión de patógenos (Brusina et al., 2020). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 60% de personas con COVID-19 requieren algún tipo de hospitalización (WHO, 2020). Así, la relevancia del presente estudio en un hospital es sumamente oportuna, dada la ubicua situación de la pandemia actual.

El propósito de investigación de este trabajo es determinar el nivel de microorganismos del ambiente aéreo y correlacionar los resultados de medición con valores estándar aceptados para establecer el grado o nivel de contaminación microbiana del aire, a través, de las siguientes tareas: estructurar un método de muestreo de aire mediante el análisis teórico de literatura, cuantificar el recuento microbiano total e identificar los microorganismos aislados.

Justificación

La mayor parte de nuestra vida la pasamos en interiores, por lo tanto, la contaminación del aire interior por bioaerosoles puede presentar un mayor riesgo para la salud humana que la exposición a los contaminantes atmosféricos del aire externo (Karwowska, 2002). Los seres humanos pasan hasta el 80% de su vida dentro del lugar de trabajo o en sus propios hogares donde las bacterias, hongos, polen, virus y ácaros son fuentes potenciales de contaminación biológica del aire (Badea et al., 2015). Además, una persona inhala en promedio alrededor de 6 - 10 L / min y necesita 15 m³ de aire por día, por lo tanto, es fundamental que se estudie y evalúe el aire interior (Dang et al., 2020).

La calidad del aire interior IAQ (Indoor Air Quality) incide en la comodidad, la salud y el bienestar de los ocupantes de una edificación, por ejemplo, los efectos sobre la salud son: infecciones, reacciones tóxicas y reacciones alérgicas (Bragoszewska & Biedron, 2018). Además, al examinar el aire de los hospitales, se determinan microorganismos oportunistas que pueden causar infecciones nosocomiales (UTP, 2011). El resurgimiento del interés en el problema de garantizar la seguridad epidemiológica del aire se debe a: epidemias de infecciones respiratorias por coronavirus (SARS, MERS), COVID 19 pandémico (SARS-CoV-2); epidemias de influenza y tuberculosis; o la propagación mundial de bacterias multirresistentes (Brusina et al., 2020).

El aire es un medio de dispersión de una variedad de microorganismos, el interés en la calidad del aire en laboratorios de microbiología se debe a que existen varios riesgos biológicos (Romero et al., 2016). Particularmente, el laboratorio de un hospital es una de las áreas de trabajo contaminadas con una variedad de peligros biológicos (Luksamijarulkul et al., 2014). Cabe señalar que los hospitales y los laboratorios de microbiología son los dos ambientes interiores con quizás el mayor potencial para la aerosolización de microorganismos patógenos (Pepper & Gerba, 2015).

En lo referente a investigaciones de la calidad del aire interior en un laboratorio del Hospital de Especialidades FF.AA. N°1, el presente estudio es novedoso ya que no se conocen estudios de este tipo en el área, constituyéndose éste, como el primer estudio que evalúa la calidad microbiológica del aire interior en el laboratorio microbiológico de un nosocomio.

Objetivo de investigación

Objetivo general

- Evaluar microbiológicamente la calidad del aire en las áreas del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1.

Objetivos específicos

- Estructurar un plan de control ambiental de investigación para evaluar la calidad microbiológica del aire mediante la técnica de sedimentación de Koch.
- Cuantificar el recuento microbiano total en 1 m³ de aire mediante la fórmula de Omeliansky y determinar el grado o nivel de contaminación del aire.
- Identificar bacterias y hongos recuperados del ambiente aéreo de las áreas que conforman el Laboratorio de Microbiología H.E-1.

Hipótesis**Hipótesis nula**

H_0 : No existen bacterias y hongos que afectan la calidad microbiológica del aire en los ambientes del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1.

Hipótesis alternativa

H_1 : Existen bacterias y hongos que afectan la calidad microbiológica del aire en los ambientes del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1.

Capítulo II

Marco Teórico

Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1. (H.E-1)

El Hospital de Especialidades FF.AA. N°1, conocido como Hospital Militar, es un hospital de tercer nivel fundado en 1918 y referente a nivel nacional, su actual edificio está ubicado en el centro norte de Quito, fue construido en el año 1997 y en el 2019 contaba con aproximadamente 200 camas y 164 ambientes (González, 2019), ha consolidado la docencia e investigación manteniendo convenios con las principales universidades del Ecuador para estudios de pregrado, preposgrado y posgrado (H.E-1, 2015). Desde 2016 cuenta con la revista digital Biomedical Journal / Revista Biomédica para difundir estudios científicos en ciencias biomédicas (H.E-1, 2016).

El Hospital H.E-1 pertenece al Sistema de Salud de las Fuerzas Armadas, brinda atención de salud a la comunidad militar dentro de la Red Pública Integral de Salud (H.E-1, 2018) y como hospital de especialidades se categoriza dentro del tercer nivel de atención, donde se resuelven problemas de salud de alta complejidad con tecnología de punta, infraestructura adecuada y talento humano especializado (MSP, 2018).

El Laboratorio de Microbiología del Hospital de Especialidades FF.AA. N°1 ha logrado obtener la calificación máxima en el control externo dirigido a todos los laboratorios de Microbiología a nivel nacional por el ente rector de enfermedades infectocontagiosas (González, 2019).

La calidad del aire interior IAQ (Indoor Air Quality)

El aire interior es la vía dominante para la exposición a contaminantes transportados por el aire, dado que las personas pasan la mayor parte del tiempo en interiores (Weekes et al.,

2020). La calidad del aire interior (IAQ) es un término que se refiere a la calidad del aire dentro de los edificios y puede verse afectada por factores como los contaminantes microbianos (Heitzmann, 2015). La IAQ ha recibido una mayor atención de la comunidad científica para mejorar la comodidad, la salud y el bienestar de los ocupantes de un edificio (Cincinelli & Martellini, 2017).

La contaminación del aire en interiores es un problema porque las personas inhalan de 6 a 10 litros de aire por minuto, lo que equivale a 15.000 litros de aire por día (Bragoszewska, 2019). Con cada respiración, inhalamos no solo el oxígeno que sustenta la vida, sino también contaminantes inmersos en el aire. La mala calidad del aire interior puede afectar a las personas y, en general, a la salud pública y la productividad nacional (Stetzenbach et al., 2004).

Salud y Bienestar

El objetivo 3 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda de Desarrollo Sostenible 2030 menciona que los estados deben prestar una atención especial para garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos (FIRS, 2017). El bienestar depende de muchos factores, entre los que se encuentra el factor de calidad del aire. Por lo tanto, se debe saber qué respiramos realmente (Vlasenko, 2017).

La calidad del aire interior es un tema de preocupación pública (Ilies et al., 2018), en los países desarrollados, alrededor del 80% del tiempo se pasa en interiores (Ferguson et al., 2020). Por ende, los problemas relacionados con la IAQ son un riesgo para la salud humana y considerable cuestión de salud pública asociado con alergias y enfermedades respiratorias (Caldeira et al., 2012). Es así que este estudio es una herramienta útil para exhortar estrategias de control ambiental adecuadas para minimizar los efectos adversos sobre la salud de los agentes biológicos presentes en el aire de interiores.

La “nube microbiana” humana en el ambiente

El microbioma humano contribuye a la concentración de genomas bacterianos en el aire interior (Hospodsky et al., 2012). Las bacterias asociadas a los seres humanos se dispersan por contacto en superficies, emisión de bioaerosoles por el aliento, ropa, piel, cabello, y resuspensión del polvo interior. Los seres humanos emiten aproximadamente 1 millón de partículas mayores a 0,5 µm de diámetro por hora y muchas de estas probablemente contienen bacterias (Meadow et al., 2015). Así, las personas que viven en interiores son una fuente relevante de contaminación microbiológica tanto del aire (Bhangar et al., 2015) como de superficies (Murray & Durner, 2020). Los estudios demuestran de manera concluyente que operadores en entornos controlados, incluso cuando se visten cuidadosa y correctamente, eliminan continuamente microorganismos al medio ambiente (USP(1116), 2012).

En promedio, una persona libera al hablar, 800 partículas por minuto, cuando estornuda, hasta 40.000 (Yakimenko, 2014) y una persona enferma a veces incluso más (Ataniyazov, 2012). La pandemia reciente COVID-19 relacionada con el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) destaca la necesidad de comprender la dinámica de las gotitas creadas al toser y estornudar, una tos produce aproximadamente 3,000 gotas y un estornudo 40,000 (Dhand & Li, 2020). La transmisión del SARS-CoV-2 a través del aire por gotitas o bioaerosoles causa la enfermedad COVID-19 (Delikhoon et al., 2021). También, el brote pandémico de gripe debido al virus de la influenza A H1N1 generó conciencia sobre los bioaerosoles en 2009 (B. Lee, 2011).

La microaeroflora, bioaerosoles y sus efectos biológicos

La microflora del aire se puede dividir en "permanente" o microorganismos resistentes a la luz y al secado; y “variables”, aquellos que, al entrar en el aire, mueren bajo la influencia de estos factores desfavorables (Bulat, 2019). La aeromicrobiología estudia el material biológico

en el aire o en la atmósfera (Pepper & Gerba, 2015). En sí, la microflora del aire es muy diversa e incluye cientos de especies, pero las bacterias saprofitas, esporógenas y formadoras de pigmentos prevalecen (Yaroslava, 2021).

La parte biológica de la atmósfera se llama bioaerosol, es decir, todas las partículas, moléculas y compuestos en el aire provenientes de organismos vivos, como bacterias, virus, hongos (mohos y levaduras), protozoos y moléculas biológicamente activas como toxinas o antígenos (Morgane, 2006), incluido endotoxinas; además, en el aire interior es posible encontrar alérgenos, un grupo de agentes causantes de una reacción mediada por la inmunoglobulina IgE específica en humanos (Moldoveanu, 2015). Las partículas de origen biológico transportadas por el aire o bioaerosoles incluyen fragmentos de DNA (Ambrose et al., 2015), también se los define como aerosoles con trazas biológicas (Pumkayo & Iwahashi, 2020). Los bioaerosoles incluso abarcan organismos como archaeas o microalgas (Santl et al., 2020). Conviene resaltar que los virus no son organismos vivos (Forterre, 2020).

Las bacterias y hongos en el aire son factores de potenciales efectos infecciosos, alérgicos e inmunotóxicos; los mohos tienen el potencial de causar efectos sobre la salud como dolores de cabeza, dificultad para respirar, irritación de la piel y agravamiento de los síntomas del asma (Karwowska, 2002). Los hongos contaminantes son especialmente peligrosos porque producen micotoxinas y alérgenos (Koszalkowska et al., 2014).

El síndrome del edificio enfermo (SBS) es un conjunto de síntomas relacionados a la reducción de la comodidad o la salud debido al entorno atmosférico interior (Mølhave, 1989), entre los síntomas están: irritación ocular y de piel, dolor de cabeza, somnolencia, estrés, náuseas, sequedad de garganta, tos, secreción nasal, entre otros (Vesitara & Surahman, 2019). Los factores relacionados con el SBS son: aerodispersoides (fibras, polvo) y bioaerosoles (bacterias, hongos, virus), entre otros (Schirmer et al., 2011).

Fuentes comunes de bioaerosoles

Las actividades humanas como hablar, estornudar, toser, caminar y lavarse pueden producir polvo biológico en el aire o bioaerosoles. Las bacterias y los hongos también provienen de fuentes externas, como el suelo o las plantas, que se transportan al interior como polvo por el viento (Dang et al., 2020). Asimismo, los microorganismos ingresan al aire con el epitelio exfoliante de la piel, a partir de alimentos, heces o con el polvo de objetos contaminados (ropa, mantas, etc.) (Laushkin & Punchenko, 2019). Las fuentes de aerosoles también pueden incluir el sistema de ventilación, procedimientos de limpieza o desinfección (Salustiano et al., 2003). La vía aeromicrobiológica describe tres procesos; lanzamiento de bioaerosoles al aire, transporte posterior por difusión y dispersión, y su deposición (Pepper & Gerba, 2015).

V.L Omelyansky señala que la mayor parte de los microbios del aire pertenecen a especies inofensivas, sin embargo, el aire de hospitales, escuelas, fábricas, y similares locales donde se congregan mucha gente representan un peligro constante para los demás (Goncharova & Moskovkin, 2007).

Los bioaerosoles en el entorno hospitalario

El ambiente del aire interior de un hospital puede colocar a pacientes en mayor riesgo que el medio ambiente exterior ya que los espacios cerrados confinan aerosoles con riesgo de infecciones nosocomiales (Ekhaise et al., 2010). La contaminación aerogénica es causada por agentes patógenos provenientes de los pacientes o portadores sanos de la flora nasal / faríngea, cavidad oral y / o secreción bronquial, de la piel y del tracto digestivo (Cernei et al., 2013).

Los bioaerosoles en el entorno hospitalario se forman al hablar, toser, estornudar, ventilación manual antes de intubación, ventilación mecánica, desbridamiento del árbol

traqueobronquial, traqueotomía, oxigenoterapia de alto flujo, BiPAP, broncoscopía, instalación de sonda nasogástrica, succión de fluidos biológicos, compresión torácica, sistemas de ventilación, uso de duchas, descarga de agua en el inodoro, recolección de esputo, manejo de instrumentos de alta energía enfriados con agua, nebulización, entre otros (Brusina et al., 2020).

Los microorganismos sanitarios indicadores, muestran el estado sanitario del aire, son liberados por animales incluido los humanos y exhiben propiedades patógenas, por ejemplo, representantes de la familia *Streptococcaceae* o *Micrococcaceae* (Lytvyn, 2016). Los agentes patógenos como estreptococos hemolíticos son indicadores de contaminación del aire con la flora nasal / faríngea y oral. Los estafilococos están presentes tanto en las vías respiratorias superiores como en la superficie de la piel humana, los gérmenes del grupo de los coliformes se traducen en un alto grado de insalubridad del aire (Cernei et al., 2013). Los enterococos son bacterias comensales presentes en la microbiota humana, sin embargo, pueden comportarse como agentes infecciosos en pacientes inmunodeprimidos (Silva G. , 2017).

Staphylococcus aureus puede resistir a la desecación y sobrevivir durante meses en el medio ambiente ya que Nunes (2005), encontró un cultivo multirresistente de *Staphylococcus aureus* proveniente del muestreo de aire de una unidad de cuidados intensivos (UCI) estrechamente relacionado con un cultivo aislado de un paciente de la misma UCI, por lo que se infirió que tal bacteria se pudo haber diseminado por el aire. Además, Pasquarella et al. (2000) menciona que se ha demostrado que los recuentos bacterianos obtenidos del lavado de heridas y las placas de sedimentación en la herida estaban estrechamente correlacionados. Esto demuestra claramente que una herida expuesta es esencialmente el equivalente a una placa de sedimentación.

En consecuencia, el complejo entorno hospitalario requiere una atención especial para garantizar una calidad del aire interior saludable y un sistema de control eficiente para proteger

a los pacientes y al personal sanitario contra posibles infecciones adquiridas en el hospital y enfermedades profesionales (Prathab & Lalitha, 2012).

El desafío de la supervivencia microbiana en el aire

Existen muchos microorganismos en el aire, pero no es su hábitat, porque allí se secan, mueren bajo la influencia del sol, cambios de temperatura, falta de nutrientes, pero los más estables pueden sobrevivir durante mucho tiempo en el aire (Spiryakov , 2018), estos incluyen bacterias formadoras de esporas, hongos y los protozoos formadores de quistes que tienen mecanismos específicos que los protegen de entornos gaseosos (Pepper & Gerba, 2015).

El aire es un entorno desfavorable para la vida de los microorganismos ya que hay muy pocas sustancias orgánicas y humedad, por lo que la microflora del aire no es constante (Plekhanov, 2012), además, como no encuentran alimento o se someten al secado, la mayoría muere. Se sabe que las bacterias Gram negativas reaccionan desfavorablemente al estrés por desecación, en contraste, las bacterias Gram positivas son más tolerantes (Pepper & Gerba, 2015). Sin embargo, una estancia relativamente corta de microbios en el aire es suficiente para provocar la transmisión de bacterias y virus patógenos de pacientes sanos y provocar epidemias generalizadas de enfermedades como la gripe (Ataniyazov, 2012).

En el verano el aire está más contaminado por el ingreso de microbios en grandes cantidades junto con partículas de polvo del suelo (Manchenkova et al., 2021). En contraste, las temperaturas más bajas se asocian con un incremento de bacterias, las lluvias estimulan la diversidad bacteriana y la humedad favorece a la supervivencia de las bacterias en el aire. Una sola gota de lluvia puede generar más de 100 gotas de bioaerosol de menos de 10 μm (Ruiz et al., 2020). La sedimentación de esporas y el crecimiento de la concentración de microorganismos viables también se ven facilitados por un aumento de la humedad relativa del

aire, ya que la masa de las partículas aumenta debido a la hinchazón y la precipitación es más rápida (Popikhina, 2013).

La humedad relativa está inversamente relacionada con la temperatura del aire (Tichy et al., 2017). Las condiciones interiores óptimas de un hospital requieren de la implementación tanto de la temperatura deseada como de un nivel de humedad relativa entre el 40 y 60 por ciento para reducir la transmisión e infectividad de patógenos del aire (Condair, 2017). La EPA (Environmental Protection Agency) recomienda que los niveles de humedad relativa en los hogares se mantengan por debajo del 60 %, e idealmente entre 30 % y 50 %, para prevenir el crecimiento de moho (Dannemiller et al., 2016).

Los microorganismos tienen tres requisitos básicos para su crecimiento, una fuente de alimento, temperatura y humedad; por lo que, el monitoreo ambiental de microbios mediante el uso de medios sólidos de cultivo crea condiciones favorables para apoyar su crecimiento óptimo y formar colonias visibles (Hassel, 2020).

Correlación entre la contaminación microbiana de superficies y el aire

La resuspensión del polvo sedimentado, como sucede al caminar, es una fuente de microorganismos que anteriormente estaban en el aire, se asentaron en una superficie y luego volvieron a entrar en el aire. Se estima que el polvo resuspendido constituye hasta el 60% del total de partículas en el aire interior (Prussin & Marr, 2015). El polvo del suelo recoge los microorganismos transportados por el aire por asentamiento natural y, por lo tanto, puede reflejar el nivel y composición microbiana del aire interior (Guo et al., 2020). Es decir, la contaminación del aire está estrechamente relacionada con el grado de contaminación de las superficies y objetos, que a menudo están contaminados con la misma flora microbiana (Ilies et al., 2018; Dumitrache et al., 2016).

Mecanismos de control de bioaerosoles

El comportamiento dinámico de un aerosol está influenciado por varios factores: físicos (movimiento browniano, gradiente eléctrico, radiación electromagnética, campo gravitacional, densidad de partículas, gradientes térmicos, humedad y ventilación) y biológicos (nutrientes y compuestos antimicrobianos) (Pasquarella et al., 2000). El número de colonias que crecen en un plato de Petri por el método de sedimentación está influenciado en gran parte por el movimiento Browniano que evita la sedimentación de esporas de pequeños hongos como *Penicillium* y *Aspergillus* (Popikhina, 2013).

Con el fin de prevenir o reducir los efectos adversos para la salud de los bioaerosoles es esencial un mecanismo de control inmediato que incluya la inactivación, eliminación o recolección en lugares específicos (Ghosh et al., 2015). Los bioaerosoles se comportan físicamente de manera idéntica a las partículas no biológicas del mismo tamaño y composición aerodinámica, por lo que se pueden aplicar los mismos sistemas de control (Damit, 2013).

Los mecanismos utilizados para controlar los bioaerosoles incluyen ventilación, filtración (HEPA), ozonización, tratamiento UV (ultravioleta), aislamiento físico (presión positiva o negativa) (Pepper & Gerba, 2015), tratamiento térmico (calor húmedo o seco), fotocátalisis de TiO_2 inducida por irradiación UV o emisión de iones (B. Lee, 2011).

La técnica de filtración de aire particulado de alta eficiencia (HEPA) se utiliza eficazmente para reducir los bioaerosoles en laboratorios y hospitales (J. Lee et al., 2019), son filtros que tienen una eficiencia mínima de recolección de partículas del 99.97 % de partículas mayores a $0.3 \mu\text{m}$ (Sublett et al., 2010), funcionan mecánicamente para forzar (usando un ventilador) el aire a través de una malla especial (Psenka, 2015), deben seguir procedimientos de limpieza y mantenimiento de lo contrario pueden generar una falsa sensación de seguridad ya que su rendimiento disminuye debido a la carga del filtro (WHO, 2021). Además, deben

someterse a una prueba de fugas de filtros de acuerdo con la norma ISO 14644-3 en un intervalo recomendado de cada seis meses (WHO, 2011).

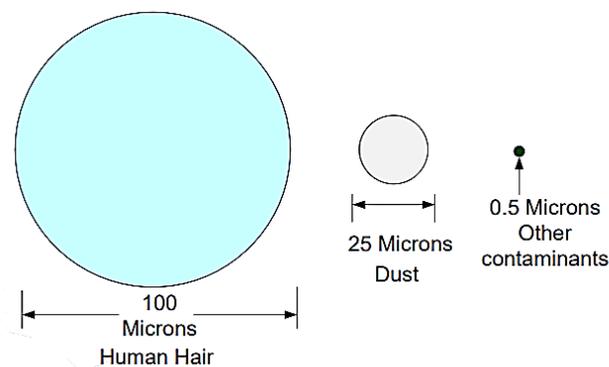
Los sistemas de ventilación proporcionan una dilución de los contaminantes microbiológicos generados en los espacios ocupados (Ponsoni & Gonçalves, 2010). Para evaluar el funcionamiento de la ventilación, también se lleva a cabo un estudio microbiológico de aire (UTP, 2011).

Naturaleza multifase del aerosol

El tamaño de los contaminantes y las partículas generalmente se describe en micrones; una micra es una millonésima parte de un metro, un cabello humano tiene aproximadamente 75–100 micrones de diámetro (Figura 1). Una partícula de 0.5 micrones (200 veces más pequeña que el cabello humano) puede causar un mayor desastre en una sala blanca o limpia (Bhatia, 2015).

Figura 1

Salas limpias y ambientes controlados, relación de tamaños en micrones

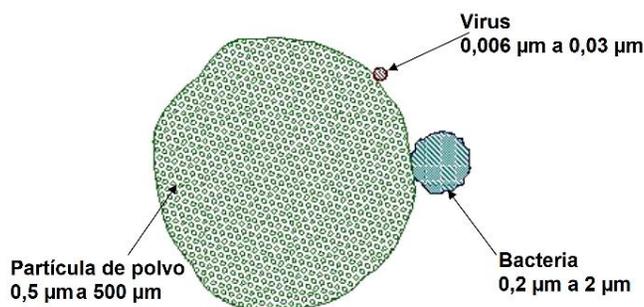


Nota: Comparación de diámetros entre cabello humano, polvo y otros contaminantes (Manfredi, 2009).

Los microorganismos secretados en el aire están en estado de aerosol, un sistema coloidal que consiste en aire y gotitas de líquido con microorganismos encerrados en ellas o partículas sólidas más pequeñas que los contienen (Yakimenko, 2014). Si bien los microorganismos transportados por el aire no flotan libremente ni son células individuales, con frecuencia se asocian con partículas de 10 a 20 μm (USP(1116), 2012). El principio detrás de las placas de sedimentación es que la mayoría de los microorganismos en el aire están asociados con partículas (Figura 2) (Sandle, 2015).

Figura 2

¿Por qué la preocupación por las partículas?



Nota: El polvo es el transporte de las bacterias. Relación entre el tamaño típico del polvo, de las bacterias y los virus (Jara, 2018).

El tamaño de las partículas es la característica más importante de los aerosoles, el aerosol se clasifica en gota gruesa (251–400 μm), gota pequeña (101–250 μm), dispersión baja (26–100 μm), dispersión media (6–25 μm) y dispersión alta (0.5–5 μm) (Brusina et al., 2020).

La ley de Stokes se usa para calcular la tasa de caída de partículas a través de un medio de dispersión, como aire o agua (Tabla 1). Por lo tanto, las partículas más pequeñas permanecen suspendidas más tiempo lo que se traduce en un mayor riesgo de exposición, además, los virus pueden persistir como bioaerosol durante más tiempo que las bacterias (Pepper & Gerba, 2015).

Tabla 1

La velocidad de sedimentación de los aerosoles

Diámetro μm	Velocidad de caída cm / s
1	0.003
2	0.012
3	0.027
5	0.076
10	0.305
20	1.17
30	2.7
40	5.5
50	7.6
100	30.5
500	760.0

Nota: La velocidad de sedimentación de los aerosoles depende de su tamaño (Ivanchenko, 2011) (suposición esférica con densidad = 1 y temperatura = 25 °C) (Pasquarella et al., 2000).

Existen tres formas principales de aerosol microbiano y sus características (Tabla 2) (Laushkin & Punchenko, 2019; Ataniyazov, 2012; Yaroslava, 2021).

Tabla 2

Naturaleza multifase del aerosol microbiano

Forma de aerosol	Descripción	Diámetro de partícula	Desplazamiento / sedimentación
Gotas grandes / Fase nuclear grande	Células rodeadas por una membrana acuosa. Microbios poco resistentes a influencias externas, pueden persistir, porque hay una cantidad suficiente de humedad dentro de la gota necesaria para preservar su viabilidad	> 100 μm	0,03 a 0,3 m / s (30 cm / s) Se depositan rápidamente, propagación y estancia en el aire corta, se asientan en 5 a 20 minutos.
Gotas finas / Fase nuclear fina	Partículas de la primera fase se evaporan o secan y consiste en células que solo han retenido parcialmente moléculas de agua unidas en su superficie y agua libre en el interior celular, manteniendo su viabilidad microbiana	1 a 5 μm	0.3 mm / s (0.03 cm / s) Se mantienen en el aire mayor tiempo y se mueven fácilmente por las corrientes de aire.

Fase de polvo	Se depositan posteriormente en los objetos circundantes, se secan y se convierten en el llamado polvo bacteriano. El tamaño de partículas de polvo depende del tamaño de las partículas con las que se combinan los microorganismos	1 a 100 μm	0,3 m / min a 0,3 m / s (30 cm / s) Fácilmente arrastrados por corrientes de aire. Sobreviven solo microorganismos particularmente resistentes.
---------------	---	-----------------------	--

Robert Heinrich Hermann Koch

R. Koch (1843 - 1910) fue un médico nacido en Prusia, es mejor conocido por su descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, contribuyó con varias investigaciones en interés de la salud pública (Schultz, 2011) y la bacteriología (Lakhtakia, 2014). Los postulados de Koch son un conjunto de observaciones y requisitos experimentales destinados a demostrar que un organismo en particular causa una enfermedad infecciosa particular (Berman, 2018). Desde la época en que Louis Pasteur (1822-1895) usó por primera vez un medio nutritivo líquido expuesto al aire demostrando que el aire está vivo con microorganismos, refutando la generación espontánea (Gillen & Sherwin, 2008) y Robert Koch usó placas de sedimentación para medir la contaminación microbiana del aire en interiores, la microbiología del aire ha crecido a pasos agigantados (Sharma & Sabharwal, 2015). Richard Julius Petri (1852 - 1921) fue un microbiólogo alemán asistente de R. Koch, propuso colocar en un plato de cultivo una tapa de vidrio un poco más grande en lugar de una campana que se utilizaba, naciendo la placa de Petri, ésta tapa podía permanecer puesta todo el tiempo, permitía observar las colonias y limitar la contaminación (Mortlock, 2017).

Walther Hesse (1846 - 1911) tenía un interés principal en la calidad del aire y ayudó a Koch en el estudio de la contaminación microbiana del aire en el laboratorio; tuvo importantes problemas técnicos al intentar analizar los recuentos microbianos debido a la licuefacción de la gelatina (usado como medio sólido) a causa de la temperatura y las bacterias (Hesse, 1992). La esposa de Hesse, Fanny Hesse (1850 - 1934) introdujo el uso de agar en lugar de gelatina

como medio firme y estable para cultivar bacterias (Bonnet et al., 2020). Entonces, Koch tenía todas las herramientas para su 'técnica del plato' para cultivar bacterias (Blevis & Bronze, 2009), fue pionero en el uso de medios de cultivo sólidos y desarrolló técnicas de cultivo puros para aislar especies individuales (Chanderraj & Dickson, 2018). El uso por Koch de este medio nutritivo en placas de Petri sigue siendo un estándar en la actualidad (Strong, 2008).

El método o técnica de sedimentación de Koch

La forma más sencilla de evaluar la población microbiana viable del aire es exponer placas de Petri que contienen un medio nutritivo sólido y proseguir a la incubación, de hecho, este método fue utilizado en 1881 por Koch. Efectivamente, el método propuesto por R. Koch consiste en la capacidad de los microorganismos bajo la influencia de la gravedad y el movimiento del aire (junto con partículas de polvo y aerosol) para asentarse en la superficie del medio nutriente en placas de Petri abiertas (Borisovich, 2018). Es un método microbiológico cuantitativo de investigación del aire (Boiko, 2016) y se basa en la precipitación natural de microorganismos bajo la influencia de la fuerza de gravedad (Grechaninova et al., 2016). El procedimiento implica dejar abierta la caja Petri con un medio solidificado, se incuba, se cuenta el número de colonias crecidas y se recalcula por 1 m³ de aire (Plekhanov, 2012).

El método se utiliza para evaluar la limpieza general del aire en las fábricas farmacéuticas, en las áreas de procesamiento de alimentos o en salas de hospital (Whittet et al., 1965). El método de sedimentación hoy en día es uno de los controles establecidos por las normas GMP (Good Manufacturing Practice) para monitorear los procesos realizados en ambientes limpios de grado A (Rodríguez et al., 2017). Las placas de sedimentación suelen consistir en placas de Petri de 9 cm de diámetro llenas con 20 a 30 ml de un medio de cultivo como agar triptona soja (TSA) (Sandle, 2015) o agar digerido de caseína de soja (USP(1116), 2012).

Hay algunas formas básicas de tomar muestras del aire para su uso en métodos de cultivo: método de sedimentación de Koch o muestreo pasivo, métodos de impacto o muestreo activo (Kasdekar et al., 2016) y método de filtración y centrifugación (Shiksha, 2012). Cuando se sigue un protocolo estricto, los resultados del muestreo activo y pasivo se pueden correlacionar (Napoli et al., 2012). El método estático o sedimentación pasiva se basa en dejar las placas abiertas durante un tiempo determinado (SAMPSP, 2016) o muestreo fijo (Morgane, 2006), de esta forma, los microorganismos o partículas portadoras de bacterias se asientan o depositan directamente en el medio de cultivo (Haas et al., 2017).

Este método todavía se utiliza ampliamente como una forma sencilla y económica de evaluar cualitativamente los entornos durante tiempos de exposición prolongados, puede ser particularmente útil en áreas críticas donde el muestreo activo podría ser intrusivo y un peligro para una operación aséptica (USP(1116), 2012). Según las buenas prácticas de la OMS, para laboratorios de microbiología farmacéutica, las placas de sedimentación se pueden usar para el monitoreo ambiental en el laboratorio, estableciendo límites de alerta y acción (RedPARF, 2013).

Ventajas del método de Koch

Las ventajas del método de Koch son su velocidad de obtención de resultado y la capacidad de identificar del 30 al 60% de los microbios (Spiryakov , 2018), es el método más antiguo, muy utilizado por su sencillez y disponibilidad (Borisovich, 2018), asimismo, no requiere instrumentación costosa, es rápido y simple, así como puede dar una buena aproximación de la concentración de bacterias y hongos (Badea et al., 2015). El método bien estandarizado, ofrece resultados comparativos interesantes sobre la variación relativa de la contaminación entre diferentes puntos de una habitación (Kouame, 2016). Las placas de sedimentación son estériles, económicas y fácilmente disponibles, sus resultados son

reproducibles, comparables y fiables, también permiten la evaluación de la contaminación de la superficie que se deposita desde el aire (Pasquarella et al., 2000).

Desventajas del método de Koch

Las desventajas del método de Koch son: considerado no cuantitativo, la recogida se ve influida por la atmósfera adyacente, tamaño y forma de las partículas (Pasquarella et al., 2000). Es decir, su confiabilidad se ve afectada por el tamaño de la partícula y el movimiento del aire circundante (Awad & Mawla, 2012). Además, solo se depositan fracciones gruesas de aerosol sobre la superficie del medio; a menudo, las colonias no se forman a partir de una sola célula, sino de una acumulación de microbios y solo una parte de la microflora del aire crece en los medios nutritivos utilizados (Borisovich, 2018). El método no es del todo exacto, es impreciso, pero permite comparar los datos de un estudio entre sí (Spiryakov, 2018).

Desafortunadamente, las placas de sedimentación se utilizan de formas muy diferentes en: diámetros de platos, tiempos de exposición, medios nutritivos, temperaturas o tiempos de incubación, que dificultan la comparación de los datos obtenidos por diferentes operadores. El primer intento de estandarizar el método en la década de 1970 fue fabricado por Fisher mediante un esquema 1/1/1 (Pasquarella et al., 2000).

Vasily Leonidovich Omeliansky (В.Л. Омелянского)

V. L. Omelyansky (1867-1928) fue un microbiólogo académico soviético, estudiante de Vinogradsky, graduado de la Universidad de San Petersburgo y autor de varios trabajos fundamentales (Kolotilova, 2013), señaló las características de los microorganismos como: alta especificidad de acción y sensibilidad excepcional (Popov, 2016). Para el muestreo microbiológico ambiental se utiliza el método de sedimentación sugerido por Omeliansky (Borrego et al., 2012). Cuando se utiliza la técnica de sedimentación, la concentración de microorganismos se calcula con la fórmula de Omeliansky, pero, se necesita más investigación

bajo diferentes condiciones de muestreo (Awad & Mawla, 2012). Los recálculos de acuerdo con la fórmula de V.L. Omelyansky, permiten determinar aproximadamente la cantidad de microorganismos en 1 m³ de aire (Laushkin & Puchenko, 2019).

Las placas de Petri tienen longevidad, se han mantenido casi sin modificaciones (Mortlock, 2017), las reglas para preparar placas de Petri, el método de sedimentación de Koch, y la fórmula de Omelyansky no han sufrido cambios especiales a lo largo del tiempo. Estos métodos han sido utilizados por más de una generación de científicos y no tienen más desarrollo, solo métodos más progresivos pueden venir en su lugar (Vlasenko, 2017).

Parámetros referenciales para evaluar el grado o nivel de contaminación microbiológica del aire.

Hay una falta de normas y directrices globales para valorar la calidad del aire (Bragoszewska & Biedron, 2018). En la actualidad, no existen estándares ni directrices para evaluar la calidad microbiológica del aire interior, cada país tiene regulaciones y recomendaciones individuales (Moldoveanu, 2015).

El análisis de la aeromicroflora permite caracterizar el potencial del ambiente, así como la calidad de la limpieza, desinfección, ventilación, entre otros (Cernei et al., 2013). El monitoreo de aire se define como el uso de instrumentos de lectura directa con datos en tiempo real, mientras tanto, el muestreo de aire se define como aquellas técnicas de muestreo que no proporcionan resultados inmediatos (SOP, 2008). La monitorización de ambientes controlados se efectúa aplicando un programa de control ambiental, este consta de; puntos de muestreo, método de muestreo, plan de muestreo, definición de límites y plan de acción (Botet, 2006).

Una sala limpia se define como una sala en la que se controla la concentración de partículas en el aire para minimizar la introducción, generación y retención de partículas dentro de la habitación, y en la que otros parámetros, como la temperatura, la humedad y la presión,

se controlan según sea necesario (Thomas, 2006; Chaudhari & Sarje, 2015). Una sala limpia o zona limpia es simplemente un área que está limpia en términos de conteos de partículas (ISO14644) y conteos microbianos (ISO14698) (Sandle, 2010).

La norma ISO 14698 establece los principios y la metodología de un sistema formal de control de biocontaminación para su evaluación y control en salas blancas o limpias (cleanrooms) y ambientes controlados, en sus anexos A y B menciona una orientación para determinar la biocontaminación y validar las muestras de aire (ISO-14698, 2003). Sin embargo, no se menciona en ninguna guía de GMP de la EU (Unión Europea), ni ofrece detalles de cómo realizar el monitoreo ambiental, por lo que no sido ampliamente adoptada como su hermana la ISO 14644 (Tabla 3) (Sandle, 2013). La biocontaminación es potencialmente mortal en entornos que no están clasificados como salas blancas, como quirófanos, unidades de cuidados intensivos y salas de aislamiento en hospitales. Estos ahora se consideran entornos controlados limpios en la nueva norma europea EN 17141 (Murray & Durner, 2020). En biotecnología y medicina, las salas blancas se utilizan cuando es necesario garantizar un entorno libre de bacterias, virus u otros patógenos (Bhatia, 2015).

Tabla 3

Documentos de normas ISO para salas blancas

Documento ISO	Título
ISO 14644-1	Clasificación de la limpieza del aire
ISO 14644-2	Pruebas de cumplimiento en salas blancas
ISO 14644-3	Métodos para evaluar y medir salas blancas y entornos controlados asociados
ISO 14644-4	Diseño y construcción de salas blancas
ISO 14644-5	Operaciones de sala limpia
ISO 14644-6	Términos, definiciones y unidades
ISO 14644-7	Dispositivos limpios mejorados
ISO 14644-8	Contaminación molecular
ISO 14698-1	Biocontaminación: Principios generales de control
ISO 14698-2	Biocontaminación: evaluación e interpretación de datos
ISO 14698-3	Biocontaminación: metodología para medir la eficiencia de la limpieza de superficies

Nota: Documentos de las normas ISO para salas blancas o limpias (TUI, 2012).

Las salas blancas y los entornos controlados asociados proporcionan el control de la contaminación del aire o superficies a niveles apropiados para realizar actividades sensibles a la contaminación, como la protección de la integridad de productos o procesos en industrias como la aeroespacial, microelectrónica, farmacéutica, dispositivos médicos, salud y alimentos. La norma ISO 14644 permite clasificar (clase ISO 1 a ISO 9) una sala blanca o zona limpia de acuerdo a la limpieza del aire en función de la cantidad de partículas de ciertos tamaños por m³ de aire de acuerdo a un método estándar (Tabla 4). Los contadores de partículas de dispersión de luz en el aire (LSAPC) se utilizan comúnmente para realizar la clasificación de limpieza del aire (ISO 14644-1, 2015). Para el proceso de clasificación de una sala blanca o limpia, la EN / ISO 14644-1 define: el número mínimo de ubicaciones de muestra, el tamaño de la muestra (volumen) y los medios para evaluar los datos (LWS, 2008). La clasificación de una sala limpia ayuda a establecer niveles de control (USP<1116), 2012).

Tabla 4

Categorías de limpieza en el aire para las salas blancas y zonas limpias, ISO 14644

ISO Clase	≥ 0.1 μm	≥ 0.2 μm	≥ 0.3 μm	≥ 0.5 μm	≥ 1.0 μm	≥ 5.0 μm
Clase ISO 1	10	2				
Clase ISO 2	100	24	10	4		
Clase ISO 3	1,000	237	102	35	8	
Clase ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83	
Clase ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
Clase ISO 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
Clase ISO 7				352,000	83,200	2,930
Clase ISO 8				3,520,000	832,000	29,300
Clase ISO 9				35,200,000	8,320,000	293,000

Nota: Límites máximos de concentración para las partículas por m³ de aire en función de su cantidad y tamaño para salas blancas y entornos controlados asociados (Ingelyt, 2015).

Una sala limpia ISO 1 tiene los niveles más bajos de contaminación, en contraste, una ISO 9 tiene el nivel más alto permitido. Para dar una perspectiva, el aire exterior en un entorno urbano típico puede contener hasta 35.000.000 de partículas por metro cúbico, de 0,5 μm o más de diámetro, esto corresponde a una sala limpia ISO clase 9 (Bhatia, 2015).

El estándar federal 209 (FS209E) contiene seis clases (clase 1 a 100000), la sala limpia "más limpia" se conoce como clase 1 y la sala limpia "más sucia" es una clase 100,000 (Tabla 5) (TUI, 2012), fue descontinuado en 2001 y reemplazado por la norma ISO (Ingelyt, 2015). El número de clase en el FS209E se refería al número máximo de partículas de 0,5 μm permitidas en un ft^3 de aire. En una clase ISO 5 significa que hay menos de 3520 partículas de 0,5 μm de tamaño por m^3 , lo que equivale a 100 partículas (clase 100) por ft^3 del FS209E (Tabla 7) (Bhatia, 2015).

Tabla 5

Clasificación de sala limpia de acuerdo con la Norma Federal 209

Clase	0.1 μm	0.2 μm	0.3 μm	0.5 μm	5 μm
1	35	7	3	1	
10	350	75	30	10	
100	3500	750	300	100	
1,000				1,000	7
10,000				10,000	70
100,000				100,000	700

Nota: Máximo número de partículas en el aire (partículas por ft^3 de aire) para salas limpias según el Estándar Federal 209 (Bhatia, 2015).

El Anexo 1 de las GMP de la EU (Buenas prácticas de fabricación o manufactura de la Unión Europea "EU GMP") y la guía de la FDA orientan globalmente y detallan los controles requeridos para la fabricación de productos farmacéuticos, ya que se necesitan requisitos

especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiológica por partículas y pirógenos de los productos estériles (Sandle, 2020). De acuerdo con la guía EU GMP, las salas blancas se clasifican en cuatro grados (A - D) conforme a la clase de limpieza ISO 14644 que cumplen (Tabla 6) (Halton, 2021). La OMS también define grados de limpieza recomendados para salas blancas como en la fabricación de vacunas (WHO, 2012), las directrices de la UE y la OMS se basan en los mismos principios y difieren en ciertos detalles (Feldmann & Müller, 2012).

Tabla 6

Clasificación de salas limpias y dispositivos de aire limpio según GMP EU

Grado	En reposo		En funcionamiento	
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Sin definir	Sin definir

Nota: La clasificación se realiza según la GMP EU en función de la norma ISO 14644-1.

Número máximo de partículas de tamaño igual o superior al indicado en la tabla permitido por m³ (GMP, 2009).

Tabla 7

Equivalencias ISO 14644-1, grado GMP y Estándar Federal 209

GMP (UE)	ISO 14644-1 (Internacional)	Estándar Federal 209 (EEUU)	
		209D (imperial)	209E (métrico)
-	Clase ISO 1	-	-
-	Clase ISO 2	-	-
-	Clase ISO 3	Clase 1	M 1.5
-	Clase ISO 4	Clase 10	M 2.5
Grado A / B	Clase ISO 5	Clase 100	M 3.5
-	Clase ISO 6	Clase 1000	M 4.5
Grado C	Clase ISO 7	Clase 10000	M 5.5
Grado D	Clase ISO 8	Clase 100000	M 6.5
-	Clase ISO 9	-	-

Nota: Equivalencias ISO 14644-1: 2015 y su grado GMP y Estándar Federal, para la clasificación de salas blancas o limpias (Ingelyt, 2015; Bhatia, 2015; TUI, 2012).

Para controlar la limpieza microbiológica de los grados A - D en operación, se deben monitorear las áreas limpias. Cuando se realizan operaciones asépticas, la monitorización debe ser frecuente utilizando métodos como placas de sedimentación, muestreo volumétrico de aire y superficie (hisopos, placas de contacto). Además, deben establecerse niveles de detección de contaminación microbiana con el fin de establecer límites de alerta y acción (WHO, 2011).

Los valores recomendados para la carga microbiana de la sala limpia en funcionamiento se muestran en la Tabla 8 (GMP, 2017; GMP, 2009). Se ha realizado un cambio en el límite de grado A de GMP de la UE; que cambia de 1 UFC a "sin crecimiento" (Sandle, 2020).

Tabla 8

Límites microbiológicos recomendados según la EU GMP Anexo 1.^a

Grado	Muestra de aire (UFC / m³)	Platos de sedimentación (diámetro 90 mm) (UFC / 4 horas)^b	Placas de contacto (diámetro 55 mm) (UFC / placa)
A**	<1	<1	<1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

Nota: Límites recomendados y expresados en unidades formadoras de colonias (UFC) para cada grado para el monitoreo microbiológico de la contaminación microbiana del aire de salas limpias en operación. a) Estos son valores medios. b) Las placas de sedimentación individuales pueden exponerse durante menos de cuatro horas. Cuando las placas de sedimentación estén expuestas durante menos de cuatro horas, se deben seguir utilizando los límites de la tabla. Deben exponerse durante operaciones críticas. ** Cabe señalar que para el grado A, el

resultado esperado debería ser 0 UFC recuperadas; cualquier recuperación de 1 UFC o más debe resultar en una investigación.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) <1116> para el control microbiológico y monitoreo de entornos de procesamiento aséptico sugiere la medición de la contaminación microbiana basada en tasas de recuperación de contaminación en lugar de la enumeración convencional de unidades formadoras de colonias UFC (Sutton, 2012), esto permitiría tener un enfoque armonizado por parte de las autoridades estadounidenses, europeas y japonesas para evitar la disparidad de valores para los límites microbianos (PDA, 2015).

La USP considera la frecuencia con la que se detecta la contaminación en lugar de números absolutos de UFC detectados en una sola muestra. Además, una UFC no es una enumeración directa de los microorganismos presentes, ya que puede haberse originado a partir de un grupo de organismos. Dentro de la zona crítica ISO 5, con los métodos actuales deberían poder alcanzarse tasas de recuperación de contaminación del aire y de la superficie del 1 % o menos (Tabla 9). La tasa de incidentes es la tasa a la que se encuentra que las muestras ambientales contienen contaminación microbiana. Por ejemplo, una tasa de incidentes del 1 % significaría que solo el 1 % de las muestras tomadas tienen alguna contaminación independientemente del número de colonias. Es decir, el 99 % de las muestras tomadas están completamente libres de contaminación (USP(1116), 2012).

Tabla 9

Tasas de recuperación de contaminación inicial sugeridas en entornos asépticos

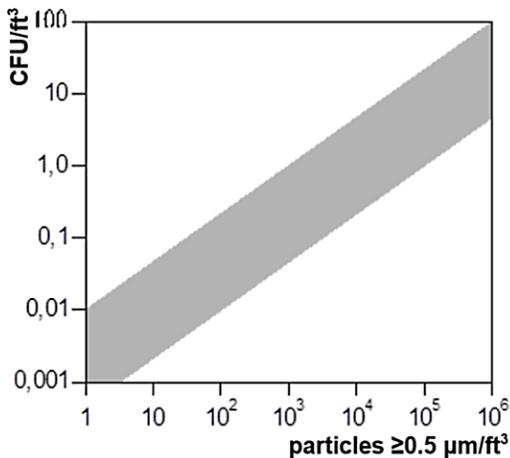
Clasificación de sala	muestra de aire activa (%)	Placa de sedimentación (9cm) exposición 4 h (%)	Placas de contacto (%)
Aislado (ISO 5 o mejor)	<0.1	<0.1	<0.1
ISO5	<1	<1	<1
ISO6	<3	<3	<3
ISO7	<5	<5	<5
ISO8	<10	<10	<10

Nota: Estas recomendaciones se aplican en entornos clasificados donde operadores se visten o usan batas asépticas. Debería ser necesaria una acción cuando la tasa de recuperación de la contaminación está por encima de estas recomendaciones durante un tiempo significativo.

El manual NHB 5340 de la NASA dice que aproximadamente 1 partícula de 1000 partículas $\geq 0.5 \mu\text{m}$ lleva 1 UFC. También, científicos suecos Bengt Lungquist y Berit Reinmüller demostraron que la proporción de partículas con tamaños $\geq 0.5 \mu\text{m}$ a la concentración de UFC es de aproximadamente 1500 ± 500 , es decir, similar a los números de la NASA (Figura 3). Pero, al compararlas con las normas de GMP de la UE, el límite para el grado A (ISO 5) es $3520 \text{ partículas} / \text{m}^3 \geq 0,5 \mu\text{m}$. Por lo tanto, se espera una concentración de microorganismos en el aire de $3520 / 1000 = 3,5 \text{ UFC} / \text{m}^3$. El límite ISO clase 4 para partículas es igual a $352 \text{ partículas} / \text{m}^3 \geq 0,5 \mu\text{m}$ y un número esperado de UFC es $352 / 1000 = 0,35 \text{ UFC} / \text{m}^3$ (Fedotov, 2019).

Figura 3

Correlación aproximada entre el número de partículas y UFC en el aire.



Nota: Correlación entre partículas del aire $\geq 0,5 \mu\text{m} / \text{ft}^3$ y UFC / ft^3 (Fedotov, 2019).

La Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU (FDA) para cumplir con la normativa de la calidad del aire en la fabricación de medicamentos y productos biológicos estériles mediante placas de sedimentación menciona niveles recomendados en áreas limpias y se muestran en la Tabla 10 (FDA, 2004).

Tabla 10

Clasificaciones de aire ^a y límites para la biocontaminación en el aire

Clasificación de áreas limpias (partículas de 0,5 µm / ft ³)	Designación ISO ^b	≥ 0,5 µm de partículas / m ³	Niveles de acción de las placas de sedimentación microbiológica ^{c, d} (diámetro 90 mm; UFC / 4 horas)
100	5	3,520	1 ^e
1000	6	35,200	3
10,000	7	352,000	5
100,000	8	3,520,000	50

Nota: a) Todas las clasificaciones se basan en datos medidos en la ubicación adyacente de los materiales / artículos expuestos durante períodos de actividad. b) Las designaciones ISO 14644-1 proporcionan valores uniformes de concentración de partículas para salas blancas en múltiples industrias. Una concentración de partículas ISO 5 es igual a la Clase 100 y aproximadamente equivale al Grado A de la UE. d) El uso adicional de placas de sedimentación es opcional. e) Las muestras de entornos de Clase 100 (ISO 5) normalmente no deben producir contaminantes microbiológicos.

La importancia de la IAQ también ha sido reconocida en Europa y ha sido identificada como un elemento importante dentro de la Acción Colaborativa Europea (ECA) (Tsakas et al., 2011). El reporte 12 para partículas biológicas en ambientes interiores, indica los límites recomendados de contaminación del aire interior por bacterias y hongos, de acuerdo con la EUR 14988 EN (Tabla 11) (ECA, 1993).

Tabla 11

Categoría de contaminación de microorganismos en el aire según EUR 14988 EN

Categoría de contaminación	Bacteria	Hongo
	UFC / m³ aire	UFC / m³ aire
Muy bajo	< 50	< 25
Bajo	50 – 100	25 – 100
Intermedio	100 – 500	100 – 500
Alto	500 – 2,000	500 – 2,000
Muy alto	> 2,000	> 2,000

Nota: Datos obtenidos por un muestreador Andersen para ambientes interiores no industriales. Se refiere al aire interior de casas privadas, lugares de trabajo no industriales y edificios públicos (excluidos los hospitales).

Las normativas aplicables de bioseguridad ambiental a hospitales son poco explícitas y tienen grandes lagunas. El concepto de área crítica o de alto riesgo alude a una situación basada en las características de los pacientes o actividades que se desarrollan, por otro lado, un ambiente controlado cuenta con instalaciones específicas para controlar biocontaminación y parámetros ambientales adecuados. Las normas estipuladas para la calidad del aire en ambientes hospitalarios por la Sociedad Andaluza de Medicina Preventiva y Salud Pública se indican en la Tabla 12 (SAMPSP, 2016).

Tabla 12

Normativa española y estándares del grado de contaminación del aire

Área hospitalaria	Biocontaminación del aire por flora aerobia mesófila UFC / m³	Resultado	Nivel de alerta UFC / m³	Nivel de acción UFC / m³
Zonas de muy alto riesgo ISO 5 e ISO 6, Clase A	< 10	Ambiente muy limpio	-	> 10
Zonas de alto riesgo ISO 7, Clase B	10 - 100	Ambiente limpio	11 - 100	> 100
Zonas de riesgo intermedio ISO 8, Clase C	100 - 200	Ambiente aceptable	101-200	> 200

Nota: Normativa de la Sociedad de Andalucía de Medicina Preventiva y Salud Pública para áreas hospitalarias y estándares microbiológicos de la contaminación del aire (SAMPSP, 2016). Los laboratorios hospitalarios (bioquímica y anatomía patológica) son considerados zonas de riesgo intermedio.

El nivel de acción es un nivel de alarma en el que, cuando se excede, requerirá intervención inmediata, investigación de la causa raíz y acciones correctivas. Mientras que, el nivel de alerta es un nivel de alarma definido para proporcionar una alerta temprana de una desviación de las condiciones normales. Este nivel debe usarse para prevenir condiciones de nivel de acción (Gottlieb, 2015).

Capítulo III

Materiales y Métodos

Características del área de estudio

El laboratorio de microbiología del Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1 es utilizado para el procesamiento, examinación y análisis de muestras biológicas de diferentes lugares del hospital. Se encuentra en el centro norte de la capital del Ecuador (Figura 4), en el segundo piso del edificio principal.

Figura 4

Ubicación geográfica del lugar de estudio



Nota: Ubicación satelital del Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas N°1 (HE-1), Av. Queseras del Medio 521 y Av. Gran Colombia, coordenadas geográficas 0°12'46.7"S 78°29'34.1"W.

El horario de atención del laboratorio es de lunes a domingo y el personal de limpieza realiza su trabajo diariamente en todas las habitaciones del lugar. La ventilación interior se da

por un sistema de climatización y extracción de aire. Los extractores ubicados en el cielo raso, extraen el aire y lo filtran, no usan filtros HEPA y el sistema expulsa el aire climatizado a través de difusores de aire, cabe señalar que no hay suministro de aire, es decir, se recircula el aire interno. El lugar dispone de ventilación natural a través de ventanillas semiabiertas. La importancia de ubicación de un filtro radica en el suministro de aire, mas no en los extractores, por ejemplo, si ingresa 100 ppm y los extractores filtran 30 ppm en el ambiente quedan 70 ppm, entonces se debe restringir el ingreso de partículas para que en lugar de 100 ppm ingresen 50 ppm, al extraer 30 ppm en el ambiente queda 20 ppm que puede ser permisible, por lo que el trabajo en sí no está en los extractores de aire más bien en el suministro.

El laboratorio está conformado por nueve habitáculos; oficina exterior, área administrativa (secretaría), área de preparación de medios, área de limpieza, área fría, área de trabajo (incluye subáreas de: diagnóstico, microscopía y tinción no delimitadas), área Vitek2, área de biología molecular y área de servicio higiénico (incluye vestidor). En la Tabla 13 y Figura 5 se exponen las siete áreas seleccionadas que se procedieron a evaluar.

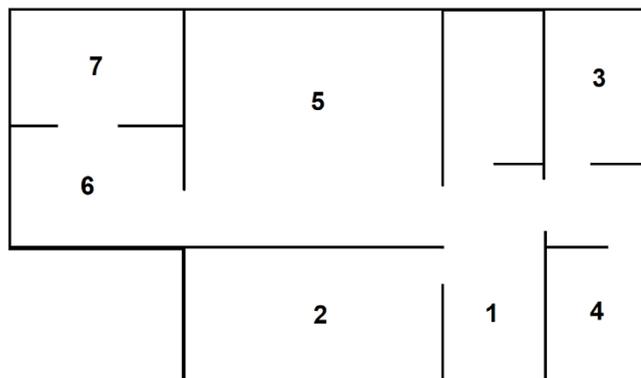
Tabla 13

Descripción de las áreas que conforman el Laboratorio de Microbiología HE-1

N°	Habitación	Equipamiento	Función
1	Área administrativa	Materiales de oficina	Recepción de muestras
2	Área de preparación de medios	Mesa central e insumos	Preparación de medios de cultivo
3	Área de limpieza	Lavabo y autoclaves	Esterilización y limpieza
4	Área fría	Refrigeradores	Almacenamiento
5	Área de trabajo	Área de diagnóstico	Análisis, diagnóstico, examinación y procesamiento de muestras biológicas
		Área de microscopía	
		Área de tinción	
6	Área Vitek2	Equipo Vitek2	Identificación y sensibilidad microbiana
7	Área de biología molecular	Cámara de flujo laminar, FilmArray	PCR y otras

Figura 5

Esquema de la distribución de las áreas que conforman el laboratorio microbiológico



Nota: 1) área administrativa (entrada), 2) área de preparación de medios, 3) área de limpieza, 4) área fría, 5) área de trabajo, 6) área Vitek2, 7) área de biología molecular.

Indumentaria para el muestreo

La formación del personal en principios de microbiología que trabajan en ambientes controlados o salas blancas garantiza un nivel de calidad ambiental adecuado; los requisitos de vestimenta difieren según el uso del entorno; es deseable la cobertura cutánea más completa posible y también considerar las cubiertas de las mangas (USP(1116), 2012).

Para el procedimiento se utilizaron guantes quirúrgicos de látex, doble mascarilla bucal, cofia, pijama de laboratorio y bata protectora descartable para evitar la autocontaminación de las placas de agar y cumplir las normas de bioseguridad establecidas en el laboratorio del Hospital HE-1 en el contexto actual de la pandemia COVID-19.

Condiciones ambientales del lugar de muestreo

Durante la recolección de muestras (9:00 am – 13:00 pm), también se registraron parámetros ambientales de cada habitación muestreada como la humedad relativa interior (RH)

% y la temperatura del ambiente con un termohigrómetro Govee Smart Thermohygrometer modelo H5075 (Tabla 14).

Tabla 14

Reporte de las condiciones ambientales durante la recolección de muestras

N°	Nombre del área	Parámetros ambientales	
		Temperatura interior °C \bar{x}	Humedad relativa interior (RH) % \bar{x}
1	Área administrativa	19,1	41
2	Área de preparación de medios	19,3	39
3	Área de limpieza	19	47
4	Área fría	19	48
5	Área de trabajo	22,6	39
6	Área Vitek2	24,2	34
7	Área de biología molecular	24,9	33

Nota: El régimen de temperatura de la habitación variaba según su exposición a las ventanas.

Cabe mencionar la estacionalidad del tiempo de muestreo, fue durante la finalización de la temporada de invierno en la sierra ecuatoriana, junio-julio 2021.

Plan de muestreo

Los procedimientos normalizados de trabajos para la monitorización de ambientes deben especificar; puntos de muestreo, momento del muestreo, duración del muestreo, tamaño de la muestra, procedimiento de muestreo, frecuencia de muestreo, niveles de alerta y acciones de ser necesarias (Botet, 2006).

Ningún plan de muestreo puede probar la ausencia de contaminación microbiana, incluso cuando no se recupera contaminación viable. La ausencia de crecimiento significa solo que no se descubrió el crecimiento; no significa que el medio ambiente esté libre de contaminación (USP(1116), 2012).

Técnica de muestreo

Para apreciar el grado de contaminación microbiana del aire (microaeroflora) se utilizó el muestreo pasivo, utilizando la técnica de sedimentación por gravedad o método de placa abierta o también llamado método de sedimentación de Koch.

El método de Koch consiste en la exposición de placas de Petri de un diámetro determinado, que contengan un ambiente nutritivo apropiado para evaluar la presencia y densidad microbiana (Cernei et al., 2013). Los microorganismos del aire se depositan gravitacionalmente en las placas de Petri (Badea et al., 2015).

Variable de estudio

Los diseños observacionales son diseños cuantitativos no experimentales. A diferencia de los diseños experimentales en los que el investigador manipula la variable independiente y observa su efecto, el investigador que realiza la investigación observacional observa tanto las variables independientes como las dependientes. En estudios observacionales, la variación en la variable independiente puede deberse a exposiciones ambientales (Meininger, 2018).

En el presente estudio la variable dependiente es la concentración de bacterias y hongos en el aire, mientras que, la variable independiente son los parámetros del aire interior como: concentración de partículas, ventilación, humedad relativa o temperatura. La variable de respuesta es el crecimiento del microorganismo en UFC / m³.

Puntos de muestreo y características de su selección

No existen métodos estándar para la toma de muestras de aire (USP(1116), 2012). Por otro lado, para clasificar salas blancas o zonas limpias la norma ISO 14644-1 define el número mínimo de ubicaciones de muestreo de aire (N_L) en función del área en m² a clasificar como se indica en la Tabla 15 (ISO 14644-1, 2015).

Tabla 15

Ubicaciones de muestreo en función del área de una sala blanca, ISO 14644-1

Área de sala blanca (m ²) menor o igual a	Número mínimo de lugares de muestreo a analizar (N _L)
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
.	.
.	.
.	.
1000	27
>1000	fórmula

Nota: Número de ubicaciones de muestreo relacionadas con el área de una sala limpia o blanca. Si el área considerada cae entre dos valores en la tabla, se debe seleccionar el mayor de los dos.

Según la norma para la colocar o posicionar los lugares de muestreo, primero se debe utilizar el número mínimo de ubicaciones de muestreo N_L derivado de la Tabla 15, luego dividir toda la sala o zona limpia en una cuadrícula de secciones N_L de igual área, a continuación se coloca una ubicación de muestreo dentro de cada sección de la cuadrícula, después se selecciona dentro de cada sección un lugar de muestreo que se considere representativo de las características de la sección y en cada lugar se coloca la sonda del contador de partículas (ISO 14644-1, 2015).

Como se mencionó, el número de muestras y las ubicaciones de muestreo son para medir y clasificar la limpieza del aire particulado de una sala blanca o ambiente controlado mediante un contador de partículas; hay que aclarar que no es un método pasivo ni activo para evaluar la calidad microbiológica del aire, pero es un símil que el presente estudio toma de referencia ya que también involucra el muestreo de aire en interiores.

Existen técnicas conocidas para el muestreo de aire, sin embargo, en varios estudios nacionales e internacionales es sumamente escasa o nula la especificación de una metodología estandarizada que indique el número de muestras y procedimientos espaciales del muestreo de aire ya que cada estudio se adapta a las condiciones físicas del ambiente, empero, la literatura cirílica vislumbra un procedimiento mesurado.

El método del envoltente, también llamado envoltura, carta o sobre “Метод конверта” es un método estándar de acuerdo con la normativa vigente rusa, comúnmente utilizado para tomar muestras de suelo, consiste en preparar una muestra combinada a partir de muestras puntuales. Los puntos deben ubicarse de tal manera que, conectados mentalmente por líneas rectas, den un dibujo de una carta o sobre sellado, para ello, se asignan o delinear cinco puntos, cuatro de los cuales se ubican en las esquinas del sitio y un punto en su centro de manera uniforme con un desplazamiento de 90° para cada punto con respecto al anterior. El principio fundamental es obtener una muestra media máxima de la superficie principal del área prueba, este método permite tener una caracterización más objetiva del área de estudio (GOST, 2017; ГОСТ, 2008). En tal aspecto y como se describe en los subsiguientes párrafos varias investigaciones relacionadas al muestreo de aire, el tipo de muestra y las características de su selección lo adecuaron y ejecutaron por el método mencionado.

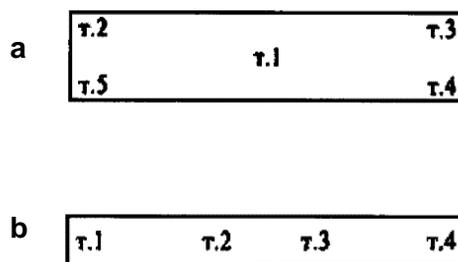
Para determinar el número total de bacterias en el aire interior usando cualquier dispositivo o método de sedimentación, en salas cerradas se establecen puntos de muestreo por cada 20 m^2 de superficie, como un sobre: cuatro puntos en las esquinas de la sala a una

distancia de 0,5 m de las paredes y el quinto punto en el centro, las muestras de aire se toman a una altura de 1,6 a 1,8 m del suelo, al nivel de la respiración y durante el periodo de actividad humana, después de haber limpiado la habitación (Pravosudova & Melnikov, 2013). Un estudio con sedimentación natural en aulas y laboratorios menciona que las placas Petri se ubicaron por el método de colocación o “sobre”, es decir, en cinco puntos en áreas mayores a 25 m² (Jruschova, 2018).

La toma muestras de aire con un impactador puede ser a una altura de al menos 50 cm del suelo y a una distancia de al menos 30 cm de la pared o cualquier objeto que impida el libre paso de aire. El muestreo de aire en una habitación de hasta 15 m² debe tomarse en un solo punto en el centro de la habitación; en habitaciones con un área mayor a 15 m², las muestras se toman en cinco puntos de acuerdo con el "principio de la envolvente" o “sobre” (Figura 6a); en salas estrechas y largas (con una relación de ancho a largo > 1: 5) las muestras se toman en puntos a una distancia de no más de 5 m entre sí (Figura 6b). El método del envolvente para el muestreo se utiliza para cubrir completamente todo el volumen de aire de una habitación (Galimyanovna et al., 2016).

Figura 6

Esquema del método envolvente o sobre “Метод конверта”.



El muestreo de aire con un impactador de las instalaciones de un hospital también se ha obtenido según el principio del envolvente o sobre (Ziatdinov et al., 2016). De la misma manera,

el muestreo microbiológico del aire en un complejo agroindustrial usando un dispositivo se llevó a cabo determinando los puntos de muestreo según el principio del “sobre”, cuatro puntos en las esquinas y un punto en el centro de la habitación a una altura de 1,5 m (Masyagutova & Bakirov, 2018). La localización y colocación de las placas Petri mediante el método de Koch en una habitación se determina en función de su forma, para rectangulares y cuadradas se utiliza tradicionalmente el método envolvente (sobre), es decir, cuatro platos en las esquinas y una en el centro (Pesnyakevich, 2016). Igualmente, para identificar la contaminación microbiana del aire de un establo se utilizó el método de sedimentación de R. Koch donde las placas Petri se colocaron de acuerdo al principio del sobre (Levshenyuk, 2016). Adicionalmente, en un control microbiológico del aire por el método de sedimentación durante un proceso biotecnológico los sitios de muestreo se establecieron de acuerdo al método del envolvente o sobre por cada 20 m² a nivel de la respiración humana de una persona sentada o de pie (Demidenko, 2018).

Con el fin de exponer un protocolo objetivo de muestreo de aire el presente estudio es el primero donde, el número, la localización y distribución de los puntos de muestreo para evaluar la calidad del aire en un ambiente interior, se definieron tomando en cuenta y adaptando los criterios mencionados de acuerdo a la norma ISO 14644-1 y principalmente al método del “sobre o envolvente”.

En el laboratorio estudiado los tamaños de las habitaciones difieren individualmente y no abarcan un vasto espacio. Se procedió a tomar cinco muestras en donde las áreas eran mayores o iguales a 20 m² y una muestra en áreas menores a los 20 m². La ubicación espacial de los puntos de muestreo se adaptó de acuerdo al método del “sobre”, es decir, para cinco puntos se ubicaron en forma de una carta cerrada y para un punto se situó en el centro. La recolección de muestras se ajustó a una altura de aproximadamente 1 m por encima del suelo para simular la zona de respiración humana de una persona sentada.

Dimensiones del lugar de muestreo

Se procedió a medir el ancho, largo y alto de las siete habitaciones evaluadas con un flexómetro marca Pretul, posteriormente se calculó su área y volumen (Tabla 16), encontrando que el área más grande corresponde al área de trabajo y el espacio más reducido al área fría.

Tabla 16

Dimensiones de las áreas target del Laboratorio de Microbiología HE-1

N°	Habitación	Medidas (m)			Área (m ²)	Volumen (m ³)
		ancho	largo	alto		
1	Área administrativa	2,26	5,52	2,28	12,48	28,44
2	Área de preparación de medios	3,82	3,95	2,17	15,01	32,74
3	Área de limpieza	3,05	4,31	2,28	13,15	29,97
4	Área fría	2,25	3,88	2,18	8,73	19,03
5	Área de trabajo	3,84	5,54	2,26	21,27	48,08
6	Área Vitek2	2,64	3,99	2,26	10,53	23,81
7	Área de biología molecular	2,87	3,97	2,35	11,39	26,78
Total					92,56	208,85

Número de puntos de muestreo

El número de puntos de muestreo y su distribución se determinó en función del tamaño de las áreas medidas de cada habitáculo y de acuerdo a los criterios mencionados (Tabla 17), resultando en un total de 11 puntos de muestreo a utilizar.

Tabla 17

Número de puntos de muestreo en función del tamaño de cada habitáculo.

N°	Habitación	Área (m ²)	Número de puntos de muestreo		
			Criterio ISO 14644-1	Criterio "sobre"	Seleccionado
1	Área administrativa	12,48	6	1	1
2	Área de preparación de medios	15,01	6	1	1
3	Área de limpieza	13,15	6	1	1
4	Área fría	8,73	5	1	1
5	Área de trabajo	21,27	6	5	5
6	Área Vitek2	10,53	6	1	1
7	Área de biología molecular	11,39	6	1	1
Total					11

Nota: El número de puntos de muestreo para un área alrededor de 20 m² no difieren en gran medida entre el criterio ISO y el criterio "sobre o envolvente".

Momento del muestreo

Los recuentos microbianos dentro de entornos controlados, varían según el lugar de muestreo y las actividades que se realizan durante el muestreo (USP<1116>, 2012). El muestreo se lleva a cabo cuando el área está en condiciones operativas o durante la mayor tensión del sistema (ISO-14698, 2003). El monitoreo ambiental en un laboratorio de microbiología se debe realizar en cada sesión de trabajo bajo condiciones dinámicas (RedPARF, 2013).

El Estándar de Procedimientos Operativos de los Estados Unidos (SOP) refiere que se deben definir supuestos asociados al programa de muestreo de aire, estos incluyen si el muestreo se llevó a cabo en: típico, peor caso o una sola vez (SOP, 2008). Las condiciones de muestreo en el presente estudio fueron de "peor caso" ya que las muestras se recolectaron cuando la dinámica e intensidad laboral es mayor, de 9:00 am a 13:00 pm y condiciones de

“una sola vez” debido a que hubo la ocasión para un solo periodo corto de recolección de la muestra.

Periodo de muestreo y número de muestras

El tiempo de recolección de las muestras de los 11 puntos de muestreo seleccionados se fijó en tres días, una vez por día, correspondientes a un periodo de muestreo, por lo tanto, el número total de muestras fue de 3 días \times 1 período \times 11 puntos de muestreo = 33 muestras; como se estudiaron bacterias y hongos en diferentes platos de Petri, se tiene un tamaño de muestra total de $33 \times 2 = 66$ muestras evaluadas.

Volver a muestrear un ambiente varios días después tiene poco valor, porque las condiciones durante una ocasión de muestreo pueden no reproducirse con precisión durante otra (USP(1116), 2012).

Tiempo de exposición de las placas de Petri

Sin duda el tiempo de exposición de la placa es relevante para la técnica, pero varía mucho entre estudios y no está estandarizado (Nunes, 2005). Los tiempos de exposición suponen un desafío grande para el control de la humedad dentro del medio ya que puede provocar problemas de desecación (Hassel, 2020). Por otro lado, las bacterias pueden depositarse en las placas de Petri junto con el polvo; y si las partículas de polvo son pequeñas en un tiempo de 10 minutos, no tienen tiempo de asentarse en el medio nutritivo (Spiryakov , 2018). Se pueden dejar abiertas de 40 - 60 minutos (Pravosudova & Melnikov, 2013).

Tradicionalmente las placas se exponen durante 60 minutos, con un tiempo de exposición más largo, se asentarán más UFC y con una exposición más corta menos UFC (Popikhina, 2013). Las placas se instalan en los puntos de muestreo en una superficie horizontal y se dejan abiertas durante 5 a 10 minutos o más, dependiendo del grado de contaminación bacteriana sospechada (Borisovich, 2018). Igualmente, se pueden exponer

durante 5, 10 y 15 minutos dependiendo de la contaminación esperada, el tiempo aumenta de 30 - 60 min usando medios selectivos (UTP, 2011).

Según las directrices GMP de la Unión Europea (UE), las placas de sedimentación deben estar expuestas por cuatro horas y sus niveles recomendados se expresan en UFC / 4 horas (Sandle, 2015). Los períodos o tiempos de muestreo prolongados pueden aumentar la importancia y la reproducibilidad de la medición (Pasquarella et al., 2000). Asimismo, cuando se exponen durante períodos de cuatro a cinco horas, pueden proporcionar un límite de detección para una evaluación adecuada de un ambiente aséptico (USP<1116>, 2012)

Las placas de sedimentación no necesariamente son susceptibles a la deshidratación, depende de las condiciones locales de muestreo, se ven poco afectados con una exposición de hasta seis horas, sin embargo, los estándares actuales de GMP no permiten más de cuatro horas de exposición (Rodríguez et al., 2017). En realidad, los problemas de la desecación de los medios sólidos en estudios de control ambiental son tangibles (Hassel, 2020), es importante verificar que durante la exposición no se sequen los medios (Botet, 2006). Se ha demostrado que las placas de sedimentación con un tiempo de exposición de cuatro horas pueden perder aproximadamente 16 % de su peso (en términos de humedad o agua) sin impedir que el agar retenga la capacidad para apoyar el crecimiento de los microorganismos (Sandle, 2015). Para el presente estudio cada plato se dejó reposar abierto durante 240 minutos o cuatro horas.

Preparación de los medios de cultivo

La facultad de cualquier medio utilizado en el monitoreo ambiental, incluidos los selectivos para recuperar tipos específicos de organismos, debe evaluarse para determinar su capacidad para apoyar el crecimiento (USP<1116>, 2012).

La preparación de los medios de cultivo se realizó en condiciones asépticas en el área de preparación de medios. Se utilizaron medios de cultivo estándar como agar tripticasa de

soja (agar de digerido de soja y caseína) y agar dextrosa Sabouraud como medios no selectivos para el aislamiento de bacterias y hongos respectivamente. Para el medio de cultivo bacteriano el fabricante menciona que la relación de preparación es de 40 g en un litro. Para un día de muestreo se necesitaron 11 placas, generalmente cada placa se llena con un volumen de 20 ml de medio, por lo que, se necesitó preparar 220 ml. Se procedió pesando en una balanza analítica marca Boeco BPS 40 plus 8,8 g del agar tripticasa y se colocó en un frasco Boeco para finalmente verter 220 ml de agua destilada. Para el medio de cultivo fúngico la relación de preparación es de 65 g en un litro, pero para este caso se necesita agregar después de la esterilización una ampolla de 2 ml del antibiótico gentamicina de 80 mg cuya concentración se prepara para 400 ml de medio Sabouraud, por lo que se pesó 26 g del mismo, se preparó y de ahí se utilizaron los 220 ml de medio para las 11 cajas Petri. Los preparados se esterilizaron en una autoclave BAUMER HI VAC II bajo las siguientes condiciones: a presión de 1.92 bar, con una temperatura de 121 °C, durante 18 minutos. El proceso total de esterilización en la autoclave tomó 72 minutos.

Una vez que los medios en los frascos salieron calientes de la autoclave, se dejó enfriar por un corto tiempo, hasta que el contacto del frasco con la mano fuera tolerable. Cada medio se dispensó en 11 platos de Petri y las burbujas formadas se eliminaron exponiendo la llama del mechero Bunsen a cada superficie de los platos. Finalmente, las placas Petri llenas de medio de cultivo se enfriaron y solidificaron a temperatura ambiente. Para garantizar la confiabilidad de la investigación, se llevaron controles de la esterilidad de todos los medios de cultivo, por lo cual, se incubaron a 35,4 °C por 24 h para vigilar cualquier contaminación previa de las placas.

Las placas de Petri se etiquetaron adecuadamente con número de muestra, lugar de muestreo, medio de cultivo y período de exposición. Se colocaron en diferentes puntos del laboratorio, según los criterios de muestreo seleccionados, con las tapas abiertas por un tiempo

de exposición de cuatro horas. Una vez cerradas las cajas, se incubaron aeróbicamente a 35,4°C por 48 h. Finalmente se contaron las unidades formadoras de colonias como UFC totales.

Cuantificación, número total microbiano o recuento microbiano total

La contaminación microbiana se juzga sobre el número total de microorganismos contenidos en unidad de volumen o masa (1 ml de agua, 1 g de suelo, 1 m³ de aire) (Boiko, 2016). El número total de microbios se refiere al número de microorganismos en 1 ml de líquido, 1 g materia sólida o 1 m³ de aire (Pravosudova & Melnikov, 2013). La determinación del número total de gérmenes en el aire, desarrollados a 37 °C (flora mesofílica) permite apreciar el grado en que el aire está cargado de flora microbiana (Cernei et al., 2013).

La cantidad de microorganismos en 1 m³ de aire se puede hallar usando la fórmula de V.L. Omelyansky, cuyo fundamento es que en la superficie de un plato con un área de 100 cm², se depositan tantos microorganismos en cinco minutos como estén contenidos en 10 dm³ de aire (Yaroslava, 2021) o la cantidad de microbios que contiene 10 litros de aire se asienta (Pravosudova & Melnikov, 2013). De la regla de Omelyansky también se pueden derivar otras fórmulas (Vlasenko , 2017).

Para determinar el número microbiano total o recuento microbiano total de aire por el método de sedimentación de Koch, se cuenta el número de colonias que crecieron en las placas de Petri tomando en cuenta el área de superficie del agar en la placa, se halla la media aritmética y el cálculo se realiza de acuerdo con la regla de L.V Omeliansky (Kamyshny, 2019; Ataniyazov, 2012). Finalmente, se compara el número promedio de bacterias obtenido en 1 m³ de aire con las normas para cada tipo de local. El experimento se puede llevar a cabo en cuatro repeticiones (Lytvyn, 2016). También se recomienda estudiar cada habitación por triplicado para una correcta interpretación estadística de los datos (Vlasenko , 2017).

Para la expresión de la unidad de volumen de aire se utiliza la fórmula de cálculo de Omeliansky, basada en la observación de que en 5 minutos los gérmenes de 10 L de aire se depositan sobre una superficie de 100 cm^2 (Dang et al., 2020). Ciertos estudios expresan resultados como UFC / cm^2 -semana (Salustiano et al., 2003), en UFC / placa (Haas et al., 2017), en porcentajes, pero generalmente en UFC / m^3 utilizando la fórmula de Omeliansky (Koszalkowska et al., 2014).

El recuento de UFC es un parámetro sustancial ya que mide los microorganismos vivos que se pueden multiplicar (Pasquarella et al., 2000). Es importante tener en cuenta que una UFC, como se define, puede consistir en un microorganismo, un par o manojito de microorganismos, el "valor" real obtenido, como 1 UFC en una placa de sedimentación, podría representar un microorganismo o varios microorganismos (Sandle, 2015).

Una UFC es un agregado de células basado en la suposición de que cada colonia ha surgido de una sola bacteria progenitora (Brugge et al., 2012). Para determinar el número de células bacterianas, el método estándar de oro es el recuento de UFC en placas donde solo se cuentan las bacterias viables ya que excluye las muertas, por desventaja, los grupos de células bacterianas pueden contarse erróneamente como colonias individuales por ello los resultados se informan como UFC / ml en lugar de bacterias / ml (Hazan et al., 2012).

El recuento de la inoculación de bacterias del aire se lleva a cabo contando las colonias bacterianas cultivadas por separado. El grado de contaminación del aire se juzga por el número de colonias que han crecido. Al contar, se supone que cada colonia ha crecido a partir de una célula que se ha asentado en el medio (Spiryakov, 2018). Las UFC recolectadas en placas de sedimentación son como una fotocopia, o un espejo de lo que estaba sucediendo en un punto en particular, durante un período de tiempo (Pasquarella et al., 2000).

Fórmula o regla de Vasily Leonidovich Omelyansky

La regla de Omelyansky estipula que en la superficie de una caja Petri con área de 100 cm² en 5 min, se asientan o depositan tantos microorganismos como están contenidos en 10 L de aire (Boiko, 2016; Novosibirsk, 2009; Kamyshny, 2019). Es decir, V. L. Omelyansky determinó que sobre una superficie de 100 cm² de una caja Petri con medio nutritivo denso, durante una exposición de 5 min, la cantidad de microbios que contiene 10 litros de aire se asienta (Plekhanov, 2012; UTP, 2011).

Sea:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{B \cdot 10 \cdot T} \qquad [X] = \frac{CFU \cdot cm^2 \cdot L \cdot min}{cm^2 \cdot L \cdot min}$$

Donde:

X: número de microbios en 1 m³ (1000 L) de aire.

A: número de colonias que crecieron en el agar de la placa.

T: tiempo de la caja Petri abierta o tiempo de exposición (minutos).

B: área de superficie del agar en la placa Petri (cm²). Área de la circunferencia ($\pi \cdot r^2$)

5: tiempo de exposición calculado por Omelyansky (minutos).

10: volumen de aire, a partir del cual se asentaron los microbios (L).

100: área del plato en la que se asentaron los microbios, recálculo (cm²).

1000: volumen de aire requerido o deseado en litros (L), es decir 1 m³, recálculo.

[X]: análisis dimensional deducido por el presente estudio

(Borisovich, 2018; Ataniyazov, 2012).

Se pueden utilizar placas de diferentes diámetros, por lo que es necesario recalcular el área de las placas. Por ejemplo, el área de una placa de Petri estándar es de 78,5 cm².

Supongamos que se encuentran 25 colonias (es decir, 25 bacterias). Es necesario calcular cuántas bacterias (X) se asentarían en un plato de 100 cm², se realiza la proporción.

$$\left. \begin{array}{l} 78,5 \text{ cm}^2 \\ 100 \text{ cm}^2 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 25 \text{ bac} \\ x \end{array} \} x = \frac{100 \text{ cm}^2 \cdot 25 \text{ bac}}{78,5 \text{ cm}^2} = 31 \text{ bacterias}$$

En consecuencia, crecerían 31 bacterias (valor entero) en un área de 100 cm², es decir, tantas bacterias están contenidas en 10 L de aire, un metro cúbico de aire equivale a 1000 L, entonces las bacterias que contendrá son:

$$\left. \begin{array}{l} 10 \text{ l} \\ 1000 \text{ l} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 31 \text{ bac} \\ x \end{array} \} x = \frac{1000 \text{ l} \cdot 31 \text{ bac}}{10 \text{ l}} = 3100 \text{ bacterias} \quad (\text{Lytvyn, 2016}).$$

Cabe mencionar que el tiempo de exposición considerado en el ejemplo anterior es de 5 min. Si utilizamos la fórmula general, nos da un valor similar al resultado del ejemplo anterior. La diferencia se da porque en el primer recálculo relacionado al área, se tomó el valor entero omitiendo los decimales.

$$X = \frac{25 \text{ bac} \cdot 100 \text{ cm}^2 \cdot 1000 \text{ l} \cdot 5 \text{ min}}{78,5 \text{ cm}^2 \cdot 10 \text{ l} \cdot 5 \text{ min}} = 3185 \text{ bacterias}$$

También se ha determinado el número de bacterias en 1 m³, cuando en una superficie de MPA (agar peptona carne) se formaron 2 colonias, con un tiempo de exposición de 10 min y un área de placa de 78 cm², encontrando 150 bacterias en 1 m³ de aire.

$$\left. \begin{array}{l} 78 \text{ cm}^2 \\ 100 \text{ cm}^2 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 2 \text{ colonias} \\ x \end{array} \} x = \frac{100 \text{ cm}^2 \cdot 2 \text{ colonias}}{78 \text{ cm}^2} = 3 \text{ bacterias}$$

$$\left. \begin{array}{l} 10 \text{ l} \\ 1000 \text{ l} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 3 \text{ bac} \\ x \end{array} \} x = \frac{1000 \text{ l} \cdot 3 \text{ bac}}{10 \text{ l}} = 300 \text{ bacterias}$$

$$x = \frac{300 \text{ bacterias} \cdot 5 \text{ min}}{10 \text{ min}} = 150 \text{ bacterias} \quad (\text{Novosibirsk, 2009}).$$

Si se analiza el paso del recálculo del área da 2,56 bacterias que en el ejemplo anterior lo redondea a 3 bacterias junto con el recálculo del volumen y considerando los tiempos, se

tiene un resultado de 150 bacterias. En contraste, al utilizar la fórmula general nos da un valor de 128 bacterias.

$$X = \frac{2colonias \cdot 100cm^2 \cdot 1000 l \cdot 5min}{78cm^2 \cdot 10 l \cdot 10min} = 128 \text{ bacterias}$$

Limitaciones de la fórmula o ecuación de cálculo Omeliana

La fórmula de Omelyansky no es un método exacto, para obtener resultados más precisos, es más conveniente hacer varios cultivos (MUK, 2016). La ecuación de Omelyansky de los antiguos soviéticos se ha adoptado ampliamente para la conversión entre las bacterias del asentamiento y las bacterias del aire en China. Esta ecuación muestra que el número de bacterias asentadas en los 100 cm² de medio de cultivo en 5 min es el mismo que el número de bacterias en el aire con un volumen de 10 L. El volumen de 10 L es un valor de corrección. Sin embargo, generalmente se refleja que esta formulación no es precisa. La razón principal de la inexactitud es la falta de especificación de las condiciones de aplicación adecuadas y se utiliza sin tener en cuenta las ocasiones (Xu, 2014).

Caracterización e identificación microbiana

Una vez recuperadas y cuantificadas las UFC en la superficie de los medios de cultivo de las placas Petri después de 48 h incubadas a 35,4 °C, se procedió a identificar las bacterias y los hongos que se encontraban en los medios de cultivo. Para las bacterias primero se procedió a distinguir las características macroscópicas de todas las colonias, posteriormente se examinó las características microscópicas mediante tinción Gram (Figura 7), para después agruparlas de acuerdo a la frecuencia con la que se encontraban en todas las muestras en cinco conjuntos de colonias bacterianas representativas.

Finalmente se realizaron baterías bioquímicas para identificar los tipos de bacterias recolectadas. En el caso de los hongos también se avizoraron las características

macroscópicas y fenotípicas de las colonias y se realizó una tinción de azul de lactofenol y claves de identificación para observar sus características microscópicas e identificarlos. Cabe mencionar que para el nivel de identificación se consideró primero patogenicidad clínica.

Figura 7

Observación microscópica de microorganismos



Nota: La tinción Gram diferencia a los tipos de bacterianas según la composición de la pared celular en Gram positivas o Gram negativas. El procedimiento se lo realizó con el colorante primario cristal violeta por 30 segundos, el mordiente Lugol por 15 segundos, el decolorante acetona por 1 segundo y la contra tinción con safranina por 1 segundo. Se observó al microscopio con aceite de inmersión y aumento 100X.

Capítulo IV

Resultados

Microorganismos recolectados de muestras de aire

Una vez incubadas las placas Petri, se realizó una lectura de las mismas a las 24 h y 72 h donde se apreció las diferentes colonias formadas en el medio tripticasa y Sabouraud (Figura 11), el compilado de número de unidades formadoras de colonias obtenidas durante los días de muestreo, encontró que tanto la concentración de UFC / plato recuperadas de bacterias (Tabla 18) como de hongos (Tabla 19) fue sumamente mayor en el área de limpieza y el área de trabajo. Los resultados consolidados se expresaron como número de microorganismos totales en UFC / plato (Tabla 20).

Tabla 18

Número de UFC de bacterias obtenidas en cada día de muestreo por habitación

N°	Habitación	Bacterias (UFC / plato)			
		Día 1	Día 2	Día 3	Media
1	Área administrativa	33	26	25	28
2	Área de preparación de medios	14	11	8	11
3	Área de limpieza	100	36	30	55,3
4	Área fría	0	0	0	0
5	Área de trabajo	243	204	210	219
6	Área Vitek2	6	4	5	5
7	Área de biología molecular	24	17	19	20
	Total	420	298	297	338,3

Tabla 19

Número de UFC de hongos obtenidas en cada día de muestreo por habitación

N°	Habitación	Hongos (UFC / plato)			
		Día 1	Día 2	Día 3	Media
1	Área administrativa	3	4	3	3,33
2	Área de preparación de medios	2	2	0	1,33
3	Área de limpieza	6	5	7	6
4	Área fría	0	0	0	0
5	Área de trabajo	15	17	11	14,33
6	Área Vitek2	0	0	1	0,33
7	Área de biología molecular	0	0	0	0
Total		26	28	22	25,32

Nota: Los hongos también se desarrollaron en el agar tripticasa (medio de cultivo para bacterias).

Tabla 20

Número de microorganismos totales expresados en UFC / 4 horas o UFC / plato.

N°	Habitación	Bacterias	Hongos	Microorganismos totales
		UFC / plato UFC / 4 horas	UFC / plato UFC / 4 horas	UFC / plato UFC / 4 horas
1	Área administrativa	28	3,33	31,33
2	Área de preparación de medios	11	1,33	12,33
3	Área de limpieza	55,3	6	61,3
4	Área fría	0	0	0
5	Área de trabajo	219	14,33	233,33
6	Área Vitek2	5	0,33	5,33
7	Área de biología molecular	20	0	20

Nota: Número de microorganismos totales se obtuvo sumando las UFC de bacterias y hongos.

Recálculo de Omeliansky en volumen de aire

Las colonias cuantificadas de bacterias y hongos se pueden expresar por metro cúbico de aire y transformar matemáticamente a UFC / m³ mediante la fórmula de Omeliansky (Tabla 21), resultó ser que el área de trabajo y el área de limpieza son las habitaciones que abarcan la mayor cantidad de UFC tanto de bacterias como de hongos por volumen de aire (Figura 8).

Tabla 21

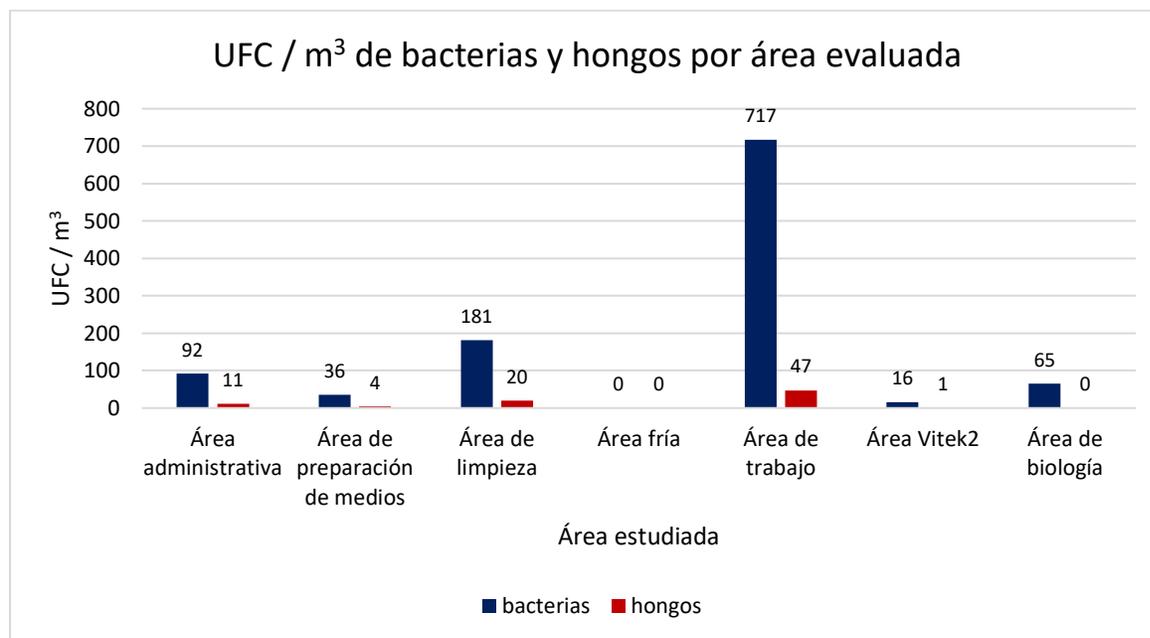
Cálculo del número de bacterias y hongos por m³ según la regla de V.L Omeliansky

N°	Habitación	Bacterias		Hongos	
		UFC / plato	UFC / m ³	UFC / plato	UFC / m ³
1	Área administrativa	28	92	3,33	11
2	Área de preparación de medios	11	36	1,33	4
3	Área de limpieza	55,3	181	6	20
4	Área fría	0	0	0	0
5	Área de trabajo	219	717	14,33	47
6	Área Vitek2	5	16	0,33	1
7	Área de biología molecular	20	65	0	0

Nota: Los cálculos se realizaron para un tiempo de exposición de 4 h o 240 min y un diámetro de placa Petri de 90 mm. Además, se tomaron valores enteros para el resultado de UFC / m³.

Figura 8

Número de UFC de bacterias y hongos recolectados por m³ de aire



Recuento microbiano total de UFC por m³ de aire

El recuento microbiano total comparado entre las áreas estudiadas demuestra que el área de trabajo y área de limpieza concentraron la mayor parte de hongos y bacterias recolectados durante el estudio. Para posteriormente apreciar el grado o nivel de contaminación ambiental según las normas existentes, primero se determinó el número total de microorganismos en el aire o recuento microbiano (Tabla 22), donde se visualizó que el área con la mayor carga microbiana se encuentra en el área de trabajo (Figura 9).

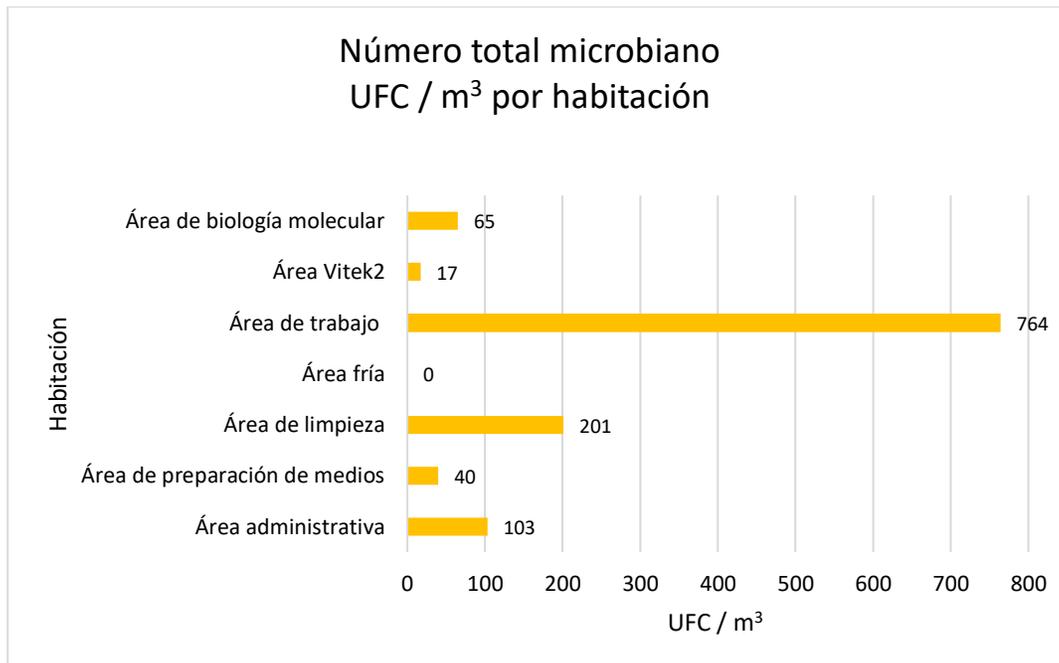
Tabla 22

Número total microbiano o recuento microbiano total de UFC por m³ de aire

N°	Habitación	Número total Bacterias UFC / m ³	Número total Hongos UFC / m ³	Número total de microbios UFC / m ³
1	Área administrativa	92	11	103
2	Área de preparación de medios	36	4	40
3	Área de limpieza	181	20	201
4	Área fría	0	0	0
5	Área de trabajo	717	47	764
6	Área Vitek2	16	1	17
7	Área de biología molecular	65	0	65
Total		1107	83	1190

Figura 9

Número total microbiano por m³ de aire

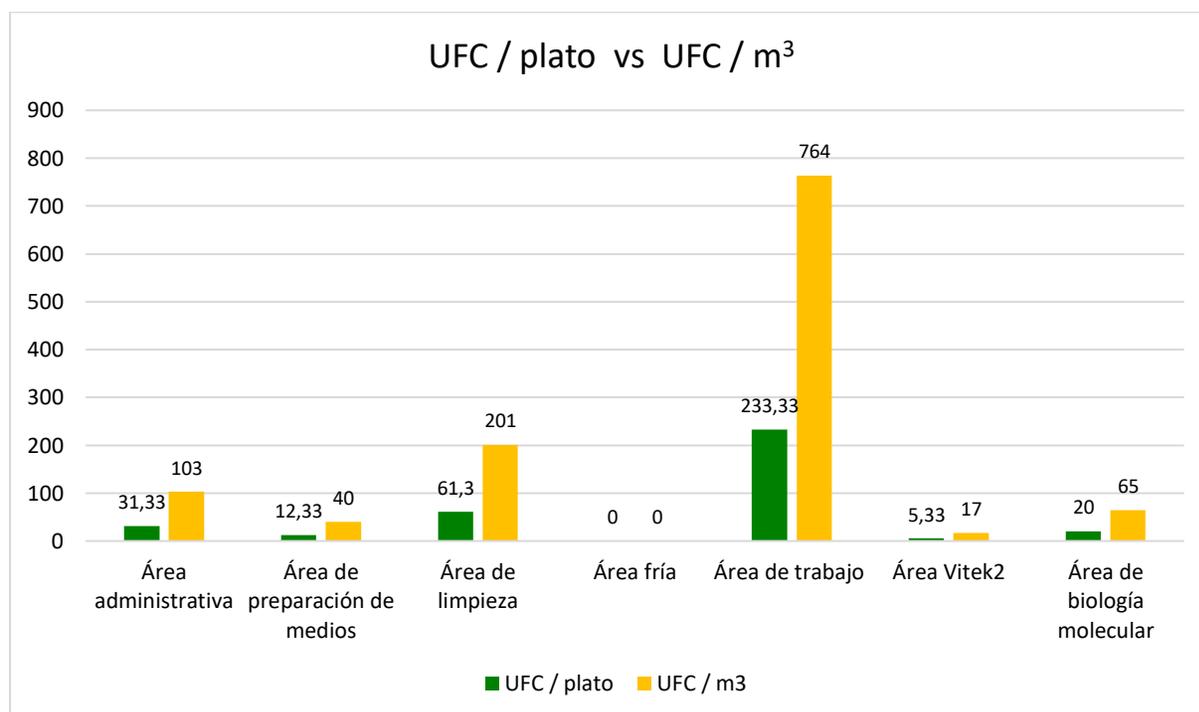


Nota: Casi en la totalidad del ambiente aéreo de las habitaciones estudiadas existe la presencia de microorganismos.

Al comparar el número de microorganismos totales en UFC / plato frente al número total microbiano en UFC / m³, resulta que la distribución de la concentración microbiana encontrada al principio en UFC / plato no sufre alteración alguna al realizar el recálculo en m³ mediante la fórmula de Omyelansky, ya que se mantiene como área mayor contaminada el área de trabajo seguida del área de limpieza, área administrativa, área de biología molecular, área de preparación de medios, área Vitek2 y área fría (Figura 10). Es decir, el recálculo amplificó los valores iniciales y los correlacionó.

Figura 10

Comparación de resultados obtenidos en UFC / plato vs UFC / m³ totales



Nota: La comparación se basa en microorganismos totales.

Expresión de la tasa de incidencia de contaminación microbiana del aire

También se evaluó la contaminación microbiana de acuerdo al criterio de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), según la cual se considera la regularidad con la que

se detecta la contaminación microbiana en lugar de cuantificar las UFC de cada muestra, es decir, la tasa de incidencia es independiente del número de colonias. Se obtuvo una tasa incidente del 90,91 % para bacterias, es decir, el 90,91 % de las muestras tomadas tienen alguna contaminación bacteriana (Tabla 23), cabe mencionar que en este contexto no se enumeran las colonias obtenidas por plato si no los platos Petri con colonias bacterianas, en este caso, el 9,09 % de las muestras tomadas estuvieron completamente libres de contaminación bacteriana. De la misma forma para los hongos, la tasa de incidencia fue del 72,73 %, es decir, menor que la tasa de incidencia bacteriana, e indica que 27,27 % de las muestras en Sabouraud se encuentran libres de contaminación fúngica.

Tabla 23

Tasa de incidencia de contaminación microbiana

Microorganismo	Placas contaminadas / placas totales	Tasa de incidencia (%)
Bacterias	30/33	90,91
Hongos	24/33	72.73

La tasa de incidencia general para hongos resulta que puede alcanzar un 62,12 % representado por 41 / 66 ya que muchos hongos también crecieron en el medio de cultivo tripticasa destinado a bacterias, no sucediendo así con las bacterias y el medio Sabouraud, donde la tasa de incidencia general para bacterias sería de 30 / 66, es decir, un 45,45 %.

Grado o nivel de contaminación microbiológica del aire

Se realizó una referenciación de los microorganismos totales obtenidos con los grados de limpieza del Anexo 1 de las GMP de la UE y la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU (FDA), cabe enfatizar que no es una clasificación (Tabla 24). Cada grado de limpieza del aire proviene de la clasificación ISO 14644-1, la misma que calcula la cantidad de partículas de ciertos tamaños por m³ de aire, es decir, es importante señalar que el valor de

UFC / 4 horas de cada habitación correspondería a un nivel aceptado por un grado de limpieza en particular (A - D), pero no necesariamente la habitación se tipifica en ese grado porque para ello primero se necesitaría medir la concentración y el tamaño de partículas en el aire con un contador de partículas.

Tabla 24

Referenciación de microorganismos totales con la GMP de la UE y la FDA.

N°	Habitación	Microorganismos totales	Normas Internacionales	
			EU GMP Anexo 1.	FDA
	Unidades	UFC / 4 horas	UFC / 4 horas	UFC / 4 horas
1	Área administrativa	31,33	Grado C	ISO 8
2	Área de preparación de medios	12,33	Grado C	ISO 8
3	Área de limpieza	61,3	Grado D	No entra
4	Área fría	0	Grado A	ISO 5
5	Área de trabajo	233,33	No entra	No entra
6	Área Vitek2	5,33	Grado B	ISO 7
7	Área de biología molecular	20	Grado C	ISO 8

En base a lo expuesto anteriormente podemos afirmar que dentro del laboratorio microbiológico el área 5 de trabajo excede los límites microbiológicos recomendados por la GMP de la UE y la FDA y no entran o no se pueden tipificar en algún grado de limpieza (A - D). Adicionalmente, el área de limpieza también se encuentra fuera de los límites aceptados según la FDA para cumplir la normativa de calidad del aire de áreas limpias. Las UFC recolectadas de las demás áreas se encuentran dentro del rango permisible que aceptan las normas internacionales recomendadas para un grado o tipo particular de sala blanca o limpia.

Los grados o niveles de contaminación microbiana (Tabla 25) se adjudicaron en función de la norma SAMPSP donde los niveles de alerta y acción seleccionados están considerados según la zona de riesgo intermedio, zona a la cual pertenece un laboratorio hospitalario.

Adicionalmente, se tomó en cuenta la norma EUR 14988. Las normas identificaron qué tan contaminado o limpio está el ambiente, permitiendo apreciar niveles de alarma como el nivel de alerta y el nivel de acción. Justamente las dos áreas más contaminadas son aquellas que sobrepasan el nivel de acción, lo que exige tomar medidas correctivas inmediatas.

Tabla 25

Grado o nivel de contaminación microbiana del aire interior estudiado.

N°	Habitación	Recuento microbiano total	Normas Internacionales	
			EUR 14988 EN	SAMPSP
	Unidades	UFC / m ³	UFC / m ³	UFC / m ³
1	Área administrativa	103	Contaminación intermedia	Ambiente aceptable (nivel alerta)
2	Área de preparación de medios	40	Contaminación muy baja	Ambiente limpio
3	Área de limpieza	201	Contaminación intermedia	Nivel de acción
4	Área fría	0	Contaminación muy baja	Ambiente muy limpio
5	Área de trabajo	764	Contaminación alta	Nivel de acción
6	Área Vitek2	17	Contaminación muy baja	Ambiente limpio
7	Área de biología molecular	65	Contaminación baja	Ambiente limpio

Nota: Grado de contaminación microbiana del aire interior del laboratorio microbiológico estudiado según los criterios de la Agencia Europea de Protección - EUR 14988 EN y la Sociedad de Andalucía de Medicina Preventiva y Salud Pública (SAMPSP).

Microaeroflora identificada en los ambientes interiores

Como se ve en la Tabla 26, las identificaciones microbianas incluyeron dos grupos de bacterias y seis de hongos que estuvieron presentes en la mayoría de las habitaciones muestreadas. Se apreciaron morfologías bacterianas como cocos y bacilos, además, todas las bacterias fueron Gram positivas mesófilas aerobias coagulasa negativa y manitol negativo, para

proseguir con el nivel de identificación, primero se tomó en cuenta si satisfacían la necesidad clínica patogénica, por ejemplo, estafilococos coagulasa negativos (CoNS) (Figura 11 - 16).

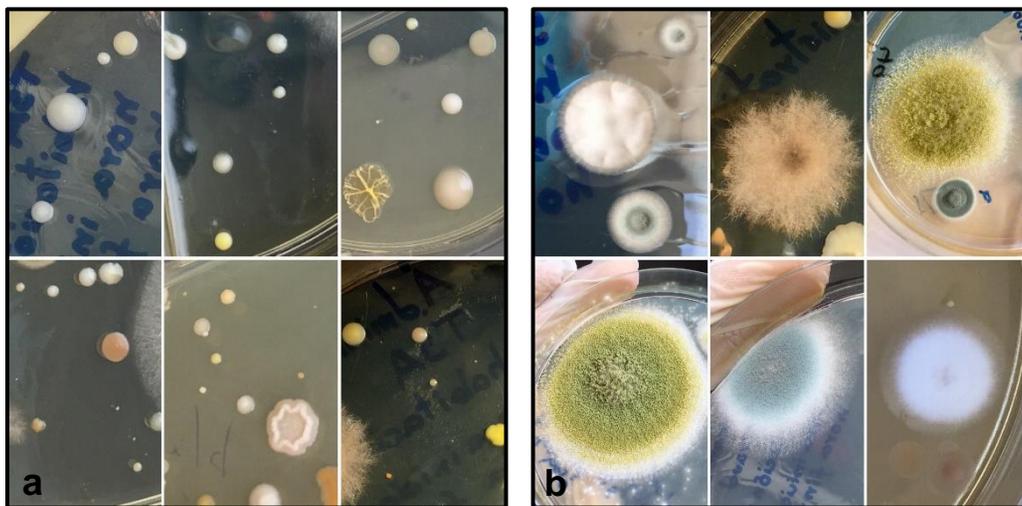
Tabla 26

Microorganismos identificados en el laboratorio microbiológico

Microorganismo	Identificación
Bacterias	<i>Bacillus</i> spp. Estafilococos coagulasa negativos.
Hongos	<i>Aspergillus fumigatus</i> . <i>Aspergillus flavus</i> . <i>Aspergillus</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Scopulariopsis</i> sp. <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Candida</i> sp.

Figura 11

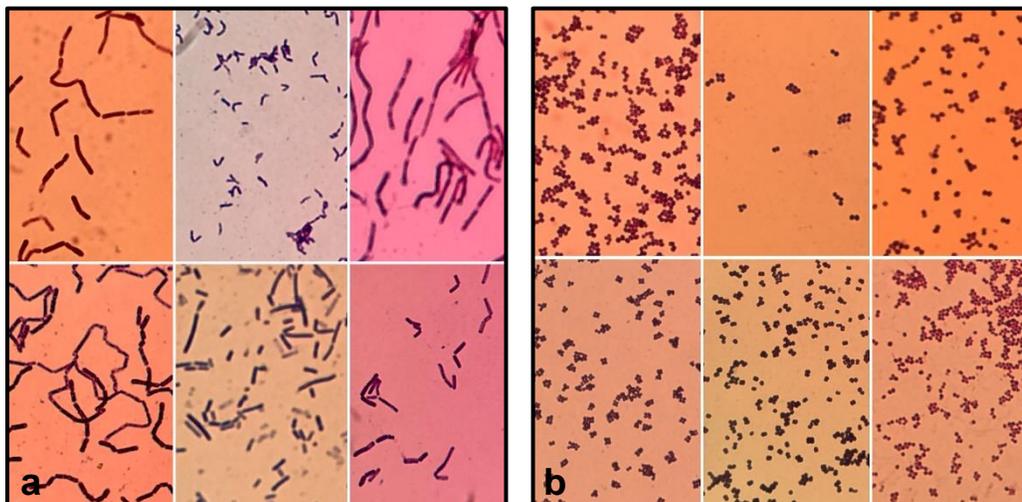
Observación macroscópica de UFC de bacterias y hongos recolectados



Nota: a) Colonias bacterianas desarrolladas en agar tripticasa de soja, b) Colonias de hongos filamentosos o mohos crecidos en agar dextrosa Sabouraud (SDA). Cabe destacar que también hubo hongos presentes en el agar destinado al cultivo de bacterias.

Figura 12

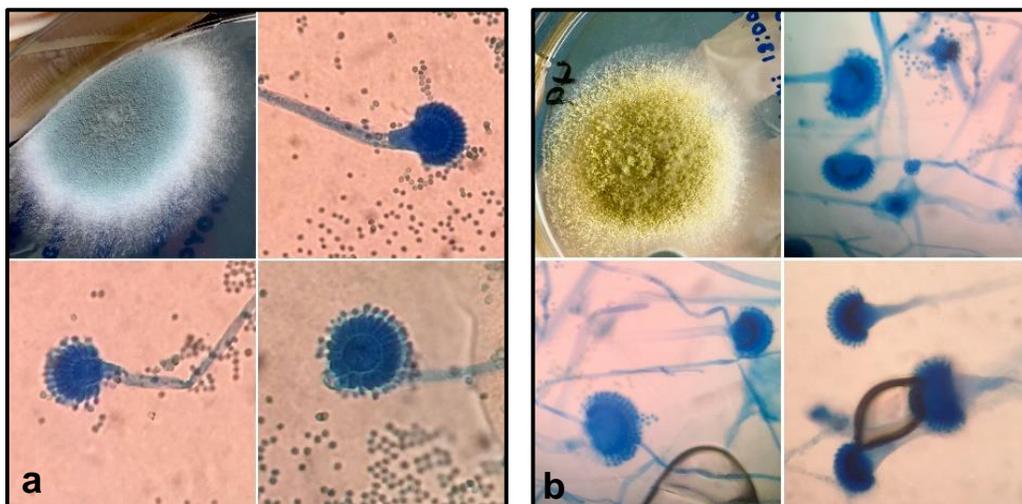
Observación microscópica de colonias bacterianas recolectadas



Nota: a) Bacilos Gram positivos. b) Cocos Gran positivos, aumento 100X. Tinción Gram.

Figura 13

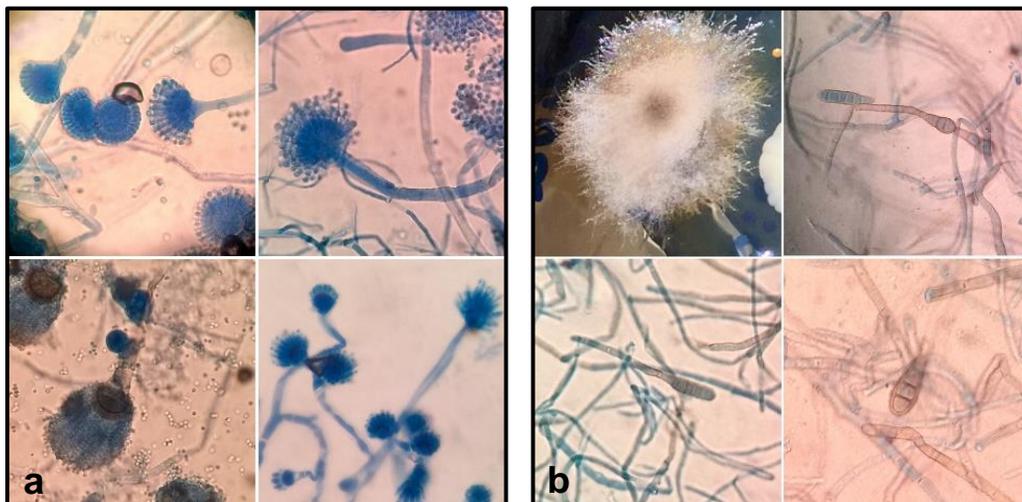
Observación microscópica de hongos recolectados



Nota: a) Aspergillus fumigatus, b) Aspergillus flavus. Tinción azul de lactofenol, aumento 40X.

Figura 14

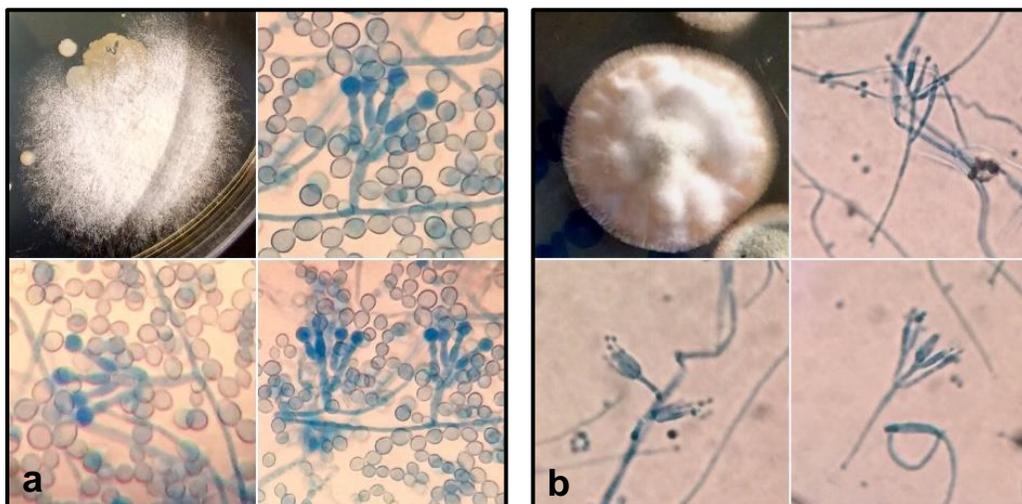
Observación microscópica de hongos recolectados



Nota: a) *Aspergillus* sp., b) *Alternaria* sp. Tinción azul de lactofenol, aumento 40X.

Figura 15

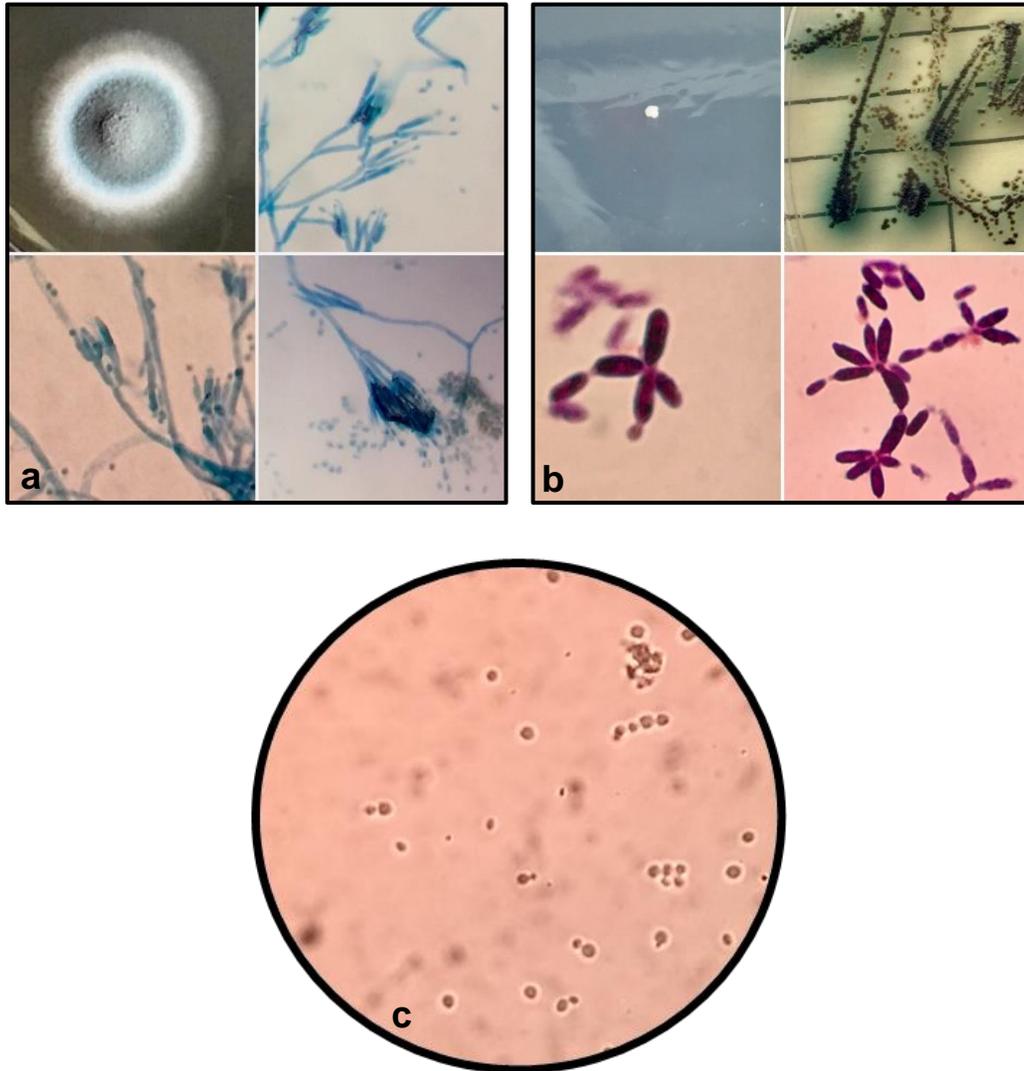
Observación microscópica de hongos recolectados



Nota: a) *Scopulariopsis* sp., b) *Paecilomyces* sp. Tinción azul de lactofenol, aumento 40X.

Figura 16

Observación microscópica de hongos recolectados



Nota: a) *Penicillium* sp., tinción azul de lactofenol, 40X b) *Candida* sp., tinción Gram, aumento 100X. Levadura desarrollada en agar Sabouraud posteriormente resembrada en medio ChromCandida, un medio selectivo y de diferenciación que incluye sustratos cromogénicos para el aislamiento e identificación de hongos. Se detectó la presencia de *Candida tropicalis*. c) Prueba del KOH, aumento 40X.

Capítulo V

Discusión

Según Xu (2014), la fórmula Omeliana para el recálculo de la concentración de microorganismos en volumen de aire no es precisa, sin embargo, no alteró los recuentos de UFC / plato, más bien los amplificó al transformarlos matemáticamente en UFC / m³ y el orden de mayor a menor carga o contaminación microbiana de las áreas estudiadas no se vio afectado, es decir, se correlacionaron (Tabla 22). El número total de bacterias y hongos en las áreas del Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar fue de 1107 UFC / m³ y 83 UFC / m³ respectivamente, siendo la habitación número 5 correspondiente al área de trabajo, aquella que contuvo una mayor concentración de microorganismos (764 UFC / m³), esto es principalmente explicado porque Meadow et al. (2015) afirman que los seres humanos dispersan y emiten bioaerosoles por el aliento, por la ropa, piel e inclusive según la USP(1116) (2012) cuando un operador viste adecuadamente en un entorno controlado elimina continuamente microorganismos al aire. También Prussin & Marr (2015) alegan que la resuspensión del polvo sedimentado, como sucede al caminar, es una importante fuente de microorganismos, este efecto pudo amplificarse en el área de trabajo debido a que es el área más grande (Tabla 16), por ende, existe mayor superficie de contacto entre el suelo y las personas que caminan en tal espacio. Además, según las recomendaciones de la USP(1116) (2012), RedPARF (2013) e ISO-14698 (2003) el muestreo se realizó cuando la dinámica laboral dentro del laboratorio es alta, por ello, el personal se encontraba en constante movimiento. Cabe mencionar que el área de trabajo es un punto relevante y confluyente de las demás áreas ya que allí se realiza el procesamiento de las muestras biológicas recibidas de las distintas áreas del hospital, también abarca tres subáreas no delimitadas como el área de diagnóstico, área de microscopía y área de tinción. En contraste, el área fría, área Vitek2 y el área de preparación de medios abarcaron la menor concentración de microorganismos totales con menos de 40 UFC / m³ y pese a que

Dang et al. (2020) mencionan que las actividades humanas producen bioaerosoles, pudo deberse a que son espacio más reducidos con funciones específicas y donde la estancia del personal es temporal.

Normas internacionales con estándares orientativos de una evaluación microbiológica del aire a través del método de sedimentación son escasas, y no se ajustan precisamente a una diversidad de espacios a evaluar, empero, son puntos de referencia que permiten objetivar el presente estudio. Entre éstos tenemos el Anexo 1 de las GMP de la UE, USP <1116>, FDA, EUR 14988 EN y SAMPSP que generalmente se refieren a: salas limpias o zonas limpias, salas blancas, entornos controlados y procesos de fabricación aséptica o estéril. Pero, un ambiente hospitalario no necesariamente es la antípoda de una sala blanca o limpia, Murray & Durner (2020) afirman que en las nuevas normas como en la EN 17141 ciertos entornos hospitalarios se consideran como entornos controlados. Por ello, las normas mencionadas son un buen punto de referencia.

Según Feldmann & Müller (2012), la GMP de la UE clasifica las salas blancas o limpias en cuatro grados de acuerdo a la clase de limpieza ISO 14644-1 cumplida y la guía GMP (2009) menciona los límites microbiológicos recomendados que debe cumplir cada grado o tipo de limpieza en UFC / 4 horas. En consecuencia, la Tabla 24 es una referenciación con las normas citadas, mas no una clasificación, por ejemplo, un área tipificada de grado A debería tener < 1 UFC / 4 horas, en este caso el área fría cumple con el número de colonias (0 UFC / 4 horas) aceptado en un ambiente limpio de grado A, pero, el área fría no se puede tipificar de grado A, mientras no se haya contado el número de partículas en función del tamaño por m³. Lo mismo sucede para las designaciones descritas por la FDA.

Los estándares de la Agencia Europea de Protección - EUR 14988 EN según la ECA (1993) establecen categorías de contaminación de partículas biológicas en el aire, que, si bien no toma en cuenta a hospitales, son una referencia para ambientes de interiores. A partir de tal

norma se determinó los grados de contaminación microbiológica (Tabla 25) donde se aprecia que el área de trabajo es catalogada de contaminación alta y el área de limpieza junto con el área administrativa de contaminación intermedia. Estos grados de contaminación microbiológica se equiparan con los expuestos por la normativa de la SAMPSP (2016) para la calidad del aire en ambientes hospitalarios, donde el área de trabajo y área de limpieza superan los límites permitidos para ser considerados ambientes aceptables y al mismo tiempo exceden el nivel de acción, también el área administrativa que a pesar de ser clasificado como ambiente aceptable está en el rango del nivel de alerta, por ende, se debe tomar medidas para prevenir el nivel de acción. El grado de las demás áreas fueron calificadas como de contaminación baja, contaminación muy baja o ambientes limpios y ambientes muy limpios según la norma. Cabe señalar que Gottlieb (2015) menciona que el nivel de acción es un nivel de alarma, cuando se excede requiere intervención inmediata, investigación y acciones correctivas. Así mismo el nivel de alerta es un nivel de alarma que proporciona una alerta temprana de la desviación de las condiciones normales.

Según Pepper & Gerba (2015) las bacterias Gram positivas son más tolerantes al estrés por desecación que las bacterias Gram negativas las cuales reaccionan desfavorablemente. Esta explicaría porque en los resultados obtenidos, todos los identificados bacterianos fueron Gram positivos. El presente estudio reportó estafilococos coagulasa negativos (CoNS), según Becker et al. (2014) la definición de CoNS se basa en procedimientos de diagnóstico que satisfacen la necesidad clínica de diferenciar entre *Staphylococcus aureus* y aquellos estafilococos clasificados como menos o no patógenos. Según Michels et al. (2021), los CoNS se encuentran entre las bacterias recuperadas con mayor frecuencia en la atención clínica de rutina, a menudo se clasifican como contaminantes en lugar de como agente causante infección. El presente estudio también reportó *Bacillus* spp., Okamoto et al. (2020) señalan a las bacterias del género *Bacillus* como formadoras de endosporas y ubicuas en el medio

ambiente. Según Gu et al. (2019), la mayoría de *Bacillus* no son patógenos y muchas especies se han utilizado para aplicaciones biotecnológicas e industriales. En este contexto, conviene recordar la afirmación de Riley “la atmósfera cerrada del edificio del hospital y sus ocupantes humanos constituyen una unidad ecológica” (Riley, 1972).

De acuerdo con Popikhina (2013), las esporas fúngicas de *Penicillium* y *Aspergillus*, por su tamaño, están influenciados por el movimiento Browniano evitando su sedimentación rápida, empero, se pudo identificar la presencia de estos dos géneros de hongos en la mayoría de las áreas del laboratorio microbiológico con un tiempo de exposición de las placas de Petri de cuatro horas. El hongo *Alternaria* spp. también se reconoció dentro del laboratorio, concordando con Nunes (2005), quien frecuentemente encontró el mismo género en el aire de instalaciones hospitalarias. Así mismo, el presente estudio identificó *Aspergillus fumigatus*, coincidiendo con Fernández et al. (2013) que reportan su presencia en ambientes hospitalarios y mencionan que causa infecciones nosocomiales generalmente en pacientes inmunodeprimidos. El género *Penicillium* fue encontrado con frecuencia dentro del laboratorio, según Reboux et al. (2019), uno de los géneros más comunes de hongos de moho identificados en muestras de aire interior es el *Penicillium*, un agente etiológico de la rinitis y agente del asma en niños. Según Senthilkumar et al. (2020), *Paecilomyces* es un hongo filamentoso sapróbico ubicuo comúnmente aislado del aire de laboratorio como contaminante y puede ser una causa de infección en humanos, este hongo también fue identificado dentro del estudio. Con respecto a la levadura *Candida* spp. también hallada en el laboratorio, cabe mencionar que las muestras de donde más se aíslan estos hongos unicelulares son: secreción vaginal; en menor proporción orina, secreción traqueal, uñas de mano; y ocasionalmente en sangre. Cabe resaltar la afirmación de Tong et al. (2017), los hongos que se transmiten por el aire en los hospitales se consideran patógenos críticos de las infecciones asociadas a los hospitales y la vida de los pacientes puede verse amenazada.

Conocidos los resultados del presente estudio se hizo una exhaustiva revisión de las áreas estudiadas, encontrándose inconvenientes como; extractores de aire sin funcionar; difusores de aire con rendijas cerradas pues el personal del laboratorio argumentaba la afectación de su comodidad ya que el aire que ingresaba estaba relativamente frío. También se inspeccionó las superficies superiores de los equipos y muebles, encontrando un preocupante manto de polvo, posiblemente por el difícil acceso, el personal de limpieza obviaba tales lugares. El polvo también se visualizaba en paredes, marcos, relieves y vidrios de los ventanales, así mismo, el cielo raso se encontraba percutido. Esto muestra la necesidad de un mayor control del ambiente y la calidad del aire interior en los lugares de trabajo.

En base a los resultados obtenidos, niveles de alarma e inspecciones realizadas de las áreas estudiadas, el Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar tomó las primeras acciones correctivas para disminuir la carga microbiológica aérea, como; abrir las rendijas cerradas de los difusores de aire; disminuir la ventilación natural cerrando ventanas; mantener las puertas cerradas; solicitud al departamento de mantenimiento del Hospital HE-1 para repintar las paredes; hubo una limpieza minuciosa del laboratorio microbiológico solicitada a la empresa encargada del aseo "Limpiquito"; llamamiento a la empresa Siemens encargada del mantenimiento del sistema de climatización y extracción de aire quienes realizaron una evaluación y mantenimiento del sistema y se encargaron de realizar el desmonte y cambio del cielo raso de las habitaciones que conforman el laboratorio microbiológico.

Capítulo VI

Conclusiones

- El método de plato de sedimentación de Koch es una herramienta asequible para evaluar la calidad microbiológica del aire, concomitantemente con un programa de monitoreo ambiental consolidado permiten obtener resultados prácticos, objetivos y comparables.
- La mayor parte de las áreas que conforman el Laboratorio HE-1 cumplen con las normativas referenciales para garantizar una adecuada calidad del aire interior, sin embargo, dos subáreas muestran grados de contaminación preocupantes donde las concentraciones de microorganismos son significativamente más altas que las normas, inclusive llegan a exceder los límites de nivel de alerta y nivel de acción permisibles.
- Se demostró la presencia de microorganismos en el aire interior, la microaeroflora detectada es variada, estable y el aire es su forma natural de propagación. Así, se encontraron bacterias como *Bacillus* spp. y estafilococos coagulasa negativos, además se identificaron seis géneros de hongos: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Scopulariopsis* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Candida tropicalis*. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se confirma o acepta la hipótesis de investigación alternativa.

Recomendaciones

- Es necesario establecer normas armonizadas o un consenso uniforme sobre los estándares de vigilancia, la metodología de monitoreo o niveles de contaminación aceptables a nivel mundial que coadyuven a una mejor interpretación de los resultados obtenidos durante una evaluación biológica del aire.

- El método de sedimentación de Koch se puede masificar en diversos entornos, permitiendo tener una aproximación objetiva del grado o nivel de contaminación del aire. Se podría agregar sangre al medio de cultivo tripticasa para identificar patrones de hemólisis.
- Se debería estimar la periodicidad de la limpieza de un ambiente después de una evaluación microbiológica del aire para mantener bajas las concentraciones de microorganismos mediante monitoreos paulatinos. Finalmente, el método de sedimentación puede ser abordado mediante técnicas de investigación como el principio llamado estado del arte o “state of the art”.

Bibliografia

- Awad, H., & Mawla, H. (2012). Sedimentation with the Omeliansky Formula as an Accepted Technique for Quantifying Airborne Fungi. *Pol. J. Environ. Stud.*, 1539-1541.
- Ambrose, I., Nweke, C., Umeh, S., & Braide, W. (2015). Prevalence of bio-aerosols in the outdoor air environment in Uyo Urban, Akwa Ibom state, Nigeria. *International Research Journal of Microbiology*, 12-19. <http://dx.doi.org/10.14303/irjm.2015.132> .
- Ataniyazov, O. (2012). Санитарно-микробиологическое исследование воздуха [Sanitary microbiological examination of air]. *министерство здравоохранения республики узбекистан*, 1-12.
- Badea, S., Chirita, A., Androne, C., & Olaru, B. (2015). Indoor air quality assessment through microbiological methods. *Journal of Young Scientist*, 12-17.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.*, 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>.
- Berman, J. (2018). Chapter 9 - The Alternate Futures of Precision Medicine. *Precision Medicine and the Reinvention of Human Disease*, 327-365.
- Bhangar, S., Adams, R., Pasut, W., Huffman, J., Arens, E., Taylor, J., . . . Nazaroff, W. (2015). Chamber bioaerosol study: human emissions of size-resolved fluorescent biological aerosol particles. *Indoor Air*, 193-206. <https://doi.org/10.1111/ina.12195>.
- Bhatia, A. (2015). HVAC Design for Cleanroom Facilities. *CED engineering*, 1-55.
- Blevis, S., & Bronze, M. (2009). Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*, e744-e751. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>.

- Boiko, I. (2016). Методические указания к лабораторному практикуму по дисциплине Микробиология и эпидемиология в области питания по направлению подготовки [Methodological instructions for a laboratory practice in the discipline Microbiology and Epidemiology]. *Майкопский государственный технологический университет [Maikop State Technological University]*, 1-20.
- Bonnet, M., Lagier, J., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>.
- Borisovich, K. (2018). Микробиологический анализ воздуха в школьном помещении [Microbiological analysis of air in the school room]. *Young Scientist # 4*, 1-102.
- Borrego, S., Lavin, P., Perdomo, I., Gomez, S., & Guiamet, P. (2012). Determination of Indoor Air Quality in Archives and Biodeterioration of the Documentary Heritage. *International Scholarly Research Network microbiology*, 1-11. <https://doi.org/10.5402/2012/680598>.
- Botet, J. (2006). II Congreso Egarense. "Legionella y Calidad del aire: el reto de hoy" (págs. 1-48). Terrassa: STE.
- Bragoszewska, E. (2019). Exposure to Bacterial and Fungal Aerosols: Microorganism Indices in A Waste-Sorting Plant in Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-11. <https://doi.org/10.3390/ijerph16183308>.
- Bragoszewska, E., & Biedron, I. (2018). Indoor Air Quality and Potential Health Risk Impacts of Exposure to Antibiotic Resistant Bacteria in an Office Rooms in Southern Poland. *Environmental Research and Public Health*, 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112604>.

- Brugge, S., Baumberger, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., & Mühlemann, K. (2012). Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates. *Plos One*, 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033695>.
- Brusina, E., Chezganova, E., & Drozdova, O. (2020). Airborne transmission of hospital pathogens. *Fundamental and Clinical Medicine*, 97-103. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-97-103>.
- Bulat, K. (2019). Estudio de la microflora del aire en varias salas GPOAU YAO - Исследование микрофлоры воздуха различных помещений ГПОАУ ЯО. *Escuela secundaria No. 75*, 1-17.
- Caldeira, C., França, O., Lage, A., & Fernandes, I. (2012). Avaliação microbiológica da qualidade do ar de interiores: aspectos metodológicos e legais*. *Centro Universitário de Brasília*, 51-60. <http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v10i1.1656>.
- Cernei, E., Maxim, M., Mavru, R., & Indrei, L. (2013). Bacteriological analysis of air (aeromicroflora) from the level of dental offices in Iași county. *Romanian Journal of Oral Rehabilitation*, 53-58 .
- Chanderraj, R., & Dickson, R. (2018). Rethinking pneumonia: A paradigm shift with practical utility. *PNAS*, 1-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819024116>.
- Chaudhari, G., & Sarje, S. (2015). Clean Room Classification for Pharmaceutical Industry. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*, 1-4.
- Cincinelli, A., & Martellini, T. (2017). Indoor Air Quality and Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-5. <https://doi.org/10.3390/ijerph14111286>.
- Condair. (2017). The importance of air humidification in hospitals and in outpatient settings. *Healthy Air Humidity*, 1-24.

- Damit, B. (2013). Control of bioaerosols and volatile organic compounds with microwave and infrared radiation-based technologies. *University of Florida*, 1-186.
- Dang, D., Vuong, H., Nguyen, T., & Phan, T. (2020). Microbiological contamination of indoor air in university classrooms (Case study: University of Science - Vietnam National University, Ho Chi Minh city). *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 30-35. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.62\(4\).30-35](https://doi.org/10.31276/VJSTE.62(4).30-35).
- Dannemiller, K., Weschler, C., & Peccia, J. (2016). Fungal and bacterial growth in floor dust at elevated relative humidity levels. *Indoor Air*, 1-10. <https://doi.org/10.1111/ina.12313>.
- Delikhon, M., Guzman, M., Nabizadeh, R., & Baghani, A. (2021). Modes of Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and Factors Influencing on the Airborne Transmission: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020395>.
- Demidenko, A. (2018). Технология биосинтеза полигидроксиалканоатов на глицерине и реализация опытного производства [Technology of biosynthesis of polyhydroxyalkanoates on glycerin and implementation of pilot production]. *Higher Certification Commission of the Russian Federation*, 1-142.
- Dhand, R., & Li, J. (2020). Coughs and Sneezes: Their Role in Transmission of Respiratory Viral Infections, Including SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 651–659. <https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1263PP>.
- Dumitrache, C., Frincu, M., Ila, S., & Godeanu, A. (2016). Evaluation of air and surfaces quality through microbiological methods case study – a2 student house. *Journal of Young Scientist*, 1-6.

- ECA. (1993). Biological Particles in Indoor Environments. *European Collaborative Action (ECA) EUR 14988 EN*, 1-86.
- Ekhaise, F., Isitor, E., Idehen, O., & Emoghene, A. (2010). Airborne Microflora in the Atmosphere of an Hospital Environment of University of Benin Teaching Hospital (UBTH), Benin City, Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 166-170.
- FDA. (2004). Guidance for Industry-Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing Current Good Manufacturing Practice. *Food and Drug Administration* , 1-63.
- Fedotov, A. (2019). *Regulatory Affairs Professionals Society*. FDA and EU GMP Annex 1 Differences in Cleanroom Specifications. <https://www.raps.org/news-and-articles/news-articles/2019/7/fda-and-eu-gmp-annex-1-differences-in-cleanroom-sp>
- Feldmann, D., & Müller, H. (2012). Comparison of EU GMP Guidelines with WHO Guidelines. *Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH*, 1-51.
- Ferguson, L., Taylor, J., Davies, M., Shrubsole, C., Symonds, P., & Dimitroulopoulou, S. (2020). Exposure to indoor air pollution across socio-economic groups in high-income countries: A scoping review of the literature and a modelling methodology. *Environment International*, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105748>.
- Fernández, M., Cattana, M., Rojas, F., Sosa, M., Aguirre, C., Vergara, M., & Giusiano, G. (2013). Especies de *Aspergillus* en ambientes hospitalarios con pacientes pediátricos en estado crítico. *ELSEVIER*, 176-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.007>.
- FIRS. (2017). The Global Impact of Respiratory Disease. *Forum of International Respiratory Societies*, 1-43.

- Forterre, P. (2020). Viruses in the 21st Century: From the Curiosity-Driven Discovery of Giant Viruses to New Concepts and Definition of Life. *Clinical Infectious Diseases*, 74-79. <https://doi.org/10.1093/cid/cix349>.
- Galimyanovna , B., Barievich , B., Bilalovich, Z., Olegovich , K., Shavkhatovna, G., Nailovich, A., . . . Valeriev, L. (2016). способ оценки вирусной обсемененности воздуха [A method for assessing the viral contamination of the air]. *Russian federation federal service for intellectual property*, 1-12.
- Ghosh , B., Lal , H., & Srivastava , A. (2015). Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environment International*, 254–272. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.018>.
- Gillen, A., & Sherwin, F. (2008). Louis Pasteur’s Views on Creation, Evolution, and the Genesis of Germs . *Answers Research Journal* , 43–52.
- GMP. (2009). Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario Anexo I Fabricación de medicamentos estériles. *Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios*, 1-23.
- GMP. (2017). EudraLex - The Rules Governing Medicinal Products in the European Union . *Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced*, 1-90.
- Goncharova, V., & Moskovkin, V. (2007). Сборник студенческих научных работ [Collection of student research papers]. *Белгородский государственный университет* , 1-134.
- González, C. (2019). *Informe de rendición de cuentas*. Quito: HE-1.
- GOST. (2017). Методы отбора и подготовки проб для химического [Sampling and preparation methods for chemical]. *Interstate council for standardization, metrology and certification гост 17.4.4.02*, 1-12.

- Gottlieb, E. (2015). Understanding ISO 14644-1/2:2015 and Becoming Compliant. *PDA Parental Drug Association*, 1-33.
- Grechaninova, T., Grigorieva, N., Kosyakova, K., & Puchenko, O. (2016). теория и практика исследования микробиоты воздуха замкнутых помещений [Theory and practice of indoor air microbiota research]. *Clinical and Preventive Medicine*, 18-22.
- Gu, H., Sun, Q., Luo, J., Zhang, J., & Sun, L. (2019). A First Study of the Virulence Potential of a *Bacillus subtilis* Isolate From Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00183>.
- Guo, J., Xiong, Y., Kang, T., Xiang, Z., & Qin, C. (2020). Bacterial community analysis of floor dust and HEPA filters in air purifiers used in office rooms in ILAS, Beijing. *Scientific Reports*, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63543-1>.
- H.E-1. (2015). Informe de gestión 2015. *Hospital de Especialidades FF.AA. No.1*, 1-33.
- H.E-1. (2016). Rendición de Cuentas. *Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas N° 1*, 1-25.
- H.E-1. (2018). Informe de Rendición de Cuentas 2018. *Hospital de Especialidades de las Fuerzas Armadas N°1*, 1-24.
- Haas, D., Galler, H., Fritz, C., Hasler, C., Habib, J., & Reinthaler, F. (2017). Comparative study of impaction and sedimentation in an aerosol chamber using defined fungal spore and bacterial concentrations. *PLoS ONE*, 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187039>.
- Halton. (2021). Halton Vita Cleanroom. *Enabling Wellbeing*, 1-56.
- Hassel, T. (2020). Agar Desiccation – The Causes and How to Address Them. *EJPPS-European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, 1-8.

- Hayleeyesus , S., & Manaye, A. (2014). Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1-6.
<https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C807>.
- Hazan, R., Que, Y., Maura, D., & Rahme, L. (2012). A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiol*, 1-15.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-259>.
- Heitzmann, B. (2015). Challenges, considerations, and concerns of indoor air quality. *Pennsylvania housing research center*, 1-4.
- Hesse, W. (1992). Walther and Angelina Hesse-Early Contributors to Bacteriology. *Features*, 1-4.
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W., Yamamoto, N., Bibby1, K., Risman, H., & Peccia, J. (2012). Human Occupancy as a Source of Indoor Airborne Bacteria. *Plos One*, 1-10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034867>.
- Ilies, D., Onet, A., Wendt, J., Ilies, M., Timar, A., Ilies, A., . . . Herman, G. (2018). Study on microbial and fungal contamination of air and wooden surfaces inside of a historical Church from Romania. *Journal of Environmental Biology*, 980-984.
<http://doi.org/10.22438/jeb/39/6/MRN-658>.
- Ingelyt. (2015). Categorías de salas blancas en cuanto a limpieza por partículas en el aire. *Ingelyt*, 1-3.
- ISO 14644-1 . (2015). Cleanrooms and associated controlled environments. *International Standard*, 1-44.

- ISO-14698. (2003). Las salas blancas y ambientes controlados asociados-Control Biocontaminación Parte1. *Internacional Standard*, 1-24.
https://ccmpp.gsfc.nasa.gov/2019_presentations/Day-1/03_JKelly.pdf
- Ivanchenko, O. (2011). *Санитарно-микробиологический контроль на пивоваренном производстве [Sanitary and microbiological control in the brewing industry]*. San Petersburgo: GIORD.
- Jara, W. (2018). *Ministerio de Salud Perú*. Normas para clasificación de Salas Limpias.
https://www.digemid.minsa.gob.pe/Upload/UpLoaded/PDF/Establecimientos/Reuniones/Reunion_Tecnica/Reunion_II_2018/Salas_Limpas.pdf
- Jruschova, O. (2018). Микробиологический мониторинг воздушной среды учебных аудиторий СФУ для проведения практических занятий по микробиологии [Microbiological monitoring of the air environment of SFU classrooms for practical classes in microbiology]. *Federal University of Siberia*, 1-76.
- Kamyshny, A. (2019). методические рекомендации для самостоятельной работы иностранных студентов при подготовке к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии [Methodological recommendations for independent work of foreign students in preparation...]. *министерство здравоохранения украины запорожский государственный медицинский университет кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии*, 1-124.
- Karwowska, E. (2002). Microbiological Air Contamination in Some Educational Settings. *Polish Journal of Environmental Studies*, 181-185.
- Kasdekar, M., Duthade, M., Damle, A., Khapurkuntikar, M., Iravane, J., Bhakre, J., & Gaikwad, A. (2016). Air Quality Monitoring of Operation Theaters in Government Medical College

- and Hospital, Aurangabad, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 42-49. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.005>.
- Kolotilova, N. (2013). становление экологического направления в отечественной микробиологии в трудах с.н.виноградского, его современников и последователей (конец xix – середина xx вв.) [The formation of the ecological direction in domestic microbiology in the works]. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*, 1-53.
- Koszalkowska, M., Krecidlo, L., & Krzysko, T. (2014). Microbiological analysis of bioaerosol in food industry. *Opole University*, 1-5.
- Kouame, S. (2016). Aerobiocontamination en milieu hospitalier et risque d'infections nosocomiales : cas du service de reanimation chu de treichville. *Universite Felix Houphouët Boigny*, 1-151.
- Lakhtakia, R. (2014). The Legacy of Robert Koch. *Sultan Qaboos Univ Med J.*, 37-41. <https://doi.org/10.12816/0003334>.
- Laushkin , M., & Punchenko, O. (2019). корреляция между микробным числом, освещённостью помещений и влажностью воздуха [Correlation between microbial count, room illumination and air humidity]. *Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова*, 1-5.
- Lee, B. (2011). Life Comes from the Air: A Short Review on Bioaerosol Control. *Aerosol and Air Quality Research*, 921-927. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2011.06.0081>.
- Lee, J., Kim , J., Cho, B., Anusha, J., Sim , J., Raj, J., & Yu, K. (2019). Assessment of air purifier on efficient removal of airborne bacteria, *Staphylococcus epidermidis*, using single-chamber method. *Environ Monit Assess*, 1-10.

- Levshenyuk, A. (2016). определение эффективности дезинфицирующего [Determination of the effectiveness of the disinfectant]. *молодежь и инновации [Youth and Innovation]*, 73-76.
- Luksamijarulkul, P., Kiennukul, N., & Vatthanasomboon, P. (2014). Laboratory facility design and microbial indoor air quality in selected hospital laboratories. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 746-55.
- LWS. (2008). Airborne Particle Counting for Pharmaceutical Facilities: Update 2008, EU GMP Annex 1 . *Lighthouse Worldwide Solutions*, 1-8.
- Lytvyn, L. (2016). Микроорганизмы воздуха [Air microorganisms]. *новосибирский государственный аграрный университет* , 1-27.
- Manchenkova, O., Sokolova, V., & Sochinskaya, O. (2021). санитарно-микробиологическое исследование воздуха [Sanitary and microbiological air testing] . *биологические науки*, 1-5.
- Manfredi, J. (2009). Clean Rooms and Controlled Environments. *PhEn602 Pharmaceutical Facility*, 1-89.
- Masyagutova, L., & Bakirov, A. (2018). совершенствование системы гигиенического мониторинга в условиях обсемененности воздуха рабочей зоны условно... [Improving the system of hygienic monitoring in conditions of contamination of the air in the working area conventionally ...]. *Medicina del trabajo y ecología industrial*, 1-5.
- Meadow, J., Altrichter, A., Bateman, A., Stenson, J., Brown, G., Green, J., & Bohannan, B. (2015). Humans differ in their personal microbial cloud. *Peer J*, 1-22.
<https://doi.org/10.7717/peerj.1258>.

- Meininger, J. C. (2018). Observational research designs. En *Encyclopedia of nursing research* (4th ed.) (págs. 509-511). Springer Publishing Company.
- Michels, R., Last, K., Becker, S., & Papan, C. (2021). Update on Coagulase-Negative Staphylococci—What the Clinician Should Know. *Microorganisms MDPI*, 1-13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040830>.
- Moldoveanu, A. (2015). Biological Contamination of Air in Indoor Spaces. *Dimensions*, 1-26.
- Mølhave, L. (1989). The sick buildings and other buildings with indoor climate problems. *Environment International*, 65-74. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(89\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0160-4120(89)90011-1).
- Morgane, A. (2006). Composition bactérienne et fongique de l'atmosphère des étables et protection de l'enfant contre les maladies allergiques. *École Nationale de la Santé Publique*, 1-54.
- Mortlock, S. (2017). The Big Story: The Petri Dish. *Institute of Biomedical Science IBMS*, 1-2.
- MSP. (2018). *Acuerdo No. 00005212 (Se expide la tipología sustitutiva para homologar los establecimientos de salud por niveles de atención y servicios de apoyo del sistema nacional de salud)*. Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- MUK. (2016). Методы микробиологического экспресс-контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием продукции <<Петритесттм>> [Methods for express microbiological control of environmental objects and food products using the products of Petritesttm]. 14. *Контроль микробиологической обсемененности объектов среды обитания*, 1-10.
- Murray, C., & Durner, R. (2020). A new European standard for Biocontamination Control – EN 17141 will replace EN ISO 14698 Parts 1 and 2:2003. *ResearchGate: Clean Air and Containment Review*, 24-28.

- Napoli, C., Marcotrigiano, V., & Montagna, M. (2012). Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*, 1-6. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-594>.
- Nayeem, A. (2016). Microbiology Laboratory. *Mymensingh BAU*, 1-85.
- Novosibirsk. (2009). Методическая разработка для студентов факультета ветеринарной медицины [Methodical development for students of the Faculty of Veterinary Medicine]. *Новосибирск Novosibirsk*, 1-42.
- Nunes, Z. (2005). Estudo da qualidade microbiológica do ar de ambientes internos climatizados. *Instituto de Controle da Qualidade em Saúde*, 1-163.
- Okamoto , A., Otsuji , S., Kamako , M., Inoue , I., Tasaka , K., & Kato , J. (2020). Bacillus cereus Group Exhibits More Resistant to Chlorhexidine Rather Than Bacillus subtilis Group. *Open Journal of Medical Microbiology*, 139-152. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2020.103012>.
- Pasquarella, C., Pitzurra, O., & Savino, A. (2000). The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, 241–256. <https://doi.org/10.1053/jhin.2000.0820>.
- PDA. (2015). *USP <1116> and its Implications for Measuring Microbial Recovery Rates*. Parenteral Drug Association. <https://www.pda.org/pda-europe/news-archive/full-story/2015/05/27/usp-1116-and-its-implications-for-measuring-microbial-recovery-rates>
- Pepper, I., & Gerba, C. (2015). Aeromicrobiology. *Environmental Microbiology*, 89-110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00005-3>.
- Pesnyakevich, A. (2016). учебно-методический комплекс по учебной дисциплине [Educational-methodical complex for the academic discipline]. *Belarusian State Technological University*, 1-406.

- Plekhanov, G. (2012). основы микробиологии [Fundamentals of Microbiology]. *Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова*, 1-88.
- Ponsoni, K., & Gonçalves, M. (2010). Indoor Air quality related to occupancy at an air-conditioned public building. *Brazilian archives of biology and technology*, 1-5.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100013> .
- Popikhina, E. (2013). состояние воздуха в хранилищах - микробиологическое состояние воздуха [Air condition in storage - Microbiological condition of air]. *Biblioteca Nacional de Rusia*, 1-64.
- Поров, А. (2016). Сборник статей Международной научно-практической конференции [Collection of articles of the International Scientific and Practical Conference]. *Иркутский национальный исследовательский технический университет*, 1-312.
- Prathab, A., & Lalitha, C. (2012). Microbiological surveillance of air quality in operation theatres - comparison of the conventional settle plate techniques vs use of an air sampling device. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 371-381.
- Pravosudova, N., & Melnikov, V. (2013). Основы санитарной микробиологии [Fundamentals of Sanitary Microbiology]. *University of the State of Penza*, 1-105.
- Prussin, A., & Marr, L. (2015). Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome*, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0144-z>.
- Psenka, J. (2015). *Seasonal Allergy Solution*. Pensilvania: Rodale Books.
- Pumkao, P., & Iwahashi, H. (2020). Bioaerosol Sources, Sampling Methods, and Major Categories: A Comprehensive Overview. *Reviews in Agricultural Science*, 261-278.
https://doi.org/10.7831/ras.8.0_261.

- Reboux , G., Rocchi , S., Vacheyrou, M., & Millon, L. (2019). Identifying indoor air *Penicillium* species: a challenge for allergic patients. *Journal of medical microbiology*, 812-821. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000960>.
- RedPARF. (2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. *Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica*, 1-38.
- Riley, R. (1972). The ecology of indoor atmospheres: airborne infection in hospitals. *J Chronic Dis.*, 421-423.
- Rodríguez, A., De Toro, I., Mediavilla, M., Fiñana, M., Maldonado, R., Rodríguez, D., & Leyva, L. (2017). Growth promotion efficiency of dehydrated Agar settle plates used for monitoring viable particles in grade A environments. *Cytotherapy*, S66. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.156>.
- Romero, C., Castañedas, D., & Acosta, G. (2016). Determinación de la calidad bacteriológica del aire en un laboratorio de microbiología en la Universidad Distrital laboratorio de microbiología en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas en Bogotá. *Centro de investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas*, 1-9. <https://doi.org/10.22490/24629448.1756>.
- Ruiz, T., Acuña, J., Fujiyoshi, S., Tanaka, D., Noda, J., Maruyama, F., & Jorquera, M. (2020). Airborne bacterial communities of outdoor environments and their associated influencing factors. *Environment International*, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106156>.
- Salustiano, V., Andrade, N., Cardoso, S., Cordeiro, R., & Kitakawa , S. (2003). Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler . *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-5. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000300015> .

- SAMPSP. (2016). Recomendaciones para la monitorización de la calidad microbiológica del aire (bioseguridad ambiental) en zonas hospitalarias de riesgo. *Sociedad Andaluza de Medicina Preventiva y Salud Pública*, 1-36.
- Sandle, T. (2015). Settle plate exposure under unidirectional airflow and the effect of weight loss upon microbial growth. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, 1-7.
- Sandle, T. (2013). Biocontamination control - Moves toward a better standard. *Cleanroom Technology*, 1-5.
- Sandle, T. (2010). Cleaning cleanrooms. *Cleanroom Technology*, 1-7.
- Sandle, T. (2020). EU GMP Annex 1: The New Draft and the Implications for Sterile Products Manufacturing. *RSSL*, 1-15.
- Santl, T., Sikoparija, B., Maki, T., Carotenuto, F., Amato, P., Yao, M., . . . Huffman, A. (2020). Bioaerosol field measurements: Challenges and perspectives in outdoor studies. *Aerosol Science and Technology*, 520–546. <https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1676395>.
- Schirmer, N., Pian, L., Szymanski, M., & Gauer, M. (2011). A poluição do ar em ambientes internos e a síndrome dos edifícios doentes. *Ciência & Saúde Coletiva*, 1-8. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000900026>.
- Schultz, M. (2011). Who is this man? *Emerging Infectious Diseases*, 1-3.
- Senthilkumar, M., Anandham, R., & Krishnamoorthy, R. (2020). Chapter 41 - Paecilomyces. *Academic Press*, 793-808. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00041-1>.
- Sharma, R., & Sabharwal, E. (2015). Estimation of microbial air contamination by settle plate method: are we within acceptable limit. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*, 1-5.

- Shiksha, K. (2012). *e-Krishi Shiksha*. Lesson 29. Enumeration of microorganisms in air, control of airborne microorganism:
<http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=101971>
- Silva, G. (2017). Avaliação da qualidade microbiológica do ar de uma maternidade no interior de Pernambuco. *Faculdade Asces, associação Caruaruense de Ensino Superior*, 1-9.
- SOP. (2008). General Air Sampling Guidelines. *Standard Operating Procedures*, 1-27.
- Spiryakov , D. (2018). исследование эффективности дезинфекции воздуха с помощью бактерицидного облучателя «дезар» и проветривания методом осаждения в учебных помещениях [Study of the effectiveness of air disinfection...by the method of precipitation in classroom]. *Старт в науке*, 1-4.
- Steiner, U. (2020). Biotechnology. *Springer-Verlag GmbH Deutschland*, 1-80.
- Stetzenbach, L., Amman, H., Johanning, E., King, G., & Shaughnessy, R. (2004). Microorganisms, Mold, and Indoor Air Quality. *Indoor Air Quality*, 1-20.
- Strong, B. (2008). *Seeking the light*. McFarland & Company.
- Sublett, J., Seltzer, J., Burkhead, R., Williams, B., Wedner, J., & Phipatanakul, W. (2010). Air filters and air cleaners: Rostrum by the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Indoor Allergen Committee. *J Allergy Clin Immunol*, 32-38.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.036>.
- Sutton, S. (2012). Recommendations from USP <1116> on "Contamination Recovery Rates".
Peer Reviewed: Microbiology, 1-5.
- Thomas, F. (2006). Cleanrooms in the BSI spotlight. *Feature*, 1-2.

- Tichy, H., Hellwig, M., & Kallina, W. (2017). Revisiting Theories of Humidity Transduction: A Focus on Electrophysiological Data. *Front Physiol.*, 1-5.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00650>.
- Tong , X., Xu , H., Zou, L., Cai, M., Xu , X., Zhao , Z., . . . Li, Y. (2017). High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. *Scientific Reports*, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep39606>.
- Tsakas, M., Siskos, A., & Siskos, P. (2011). Indoor Air Pollutants and the Impact on Human Health. *Open access peer-reviewed chapter*, 1-40.
- TUI. (2012). FS209E and ISO Cleanroom Standards. *Terra Universal Inc*, 1-6.
- USP(1116). (2012). (1116) Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments. *The United States Pharmacopeial Convention.*, 697-707.
- УТР. (2011). лабораторные работы [Laboratory works]. *Томский политехнический университет [Tomsk Polytechnic University]*,
<https://portal.tpu.ru/SHARED/c/CHUBIC/Tab4/%D0%9B%D0%A0%20%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%B1%D0%B5%D0%B7%D0%BE%D0%BF%D0%B0%D1%81%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%8C.doc>.
- Vesitara, R., & Surahman, U. (2019). Sick building syndrome: Assessment of school building air quality. *Journal of Physics: Conference Series*, 1-8.
- Vlasenko , A. (2017). Определение уровня бактериальной загрязнённости воздуха в помещениях Лицея НИУ ВШЭ [Determination of the level of bacterial air pollution in the premises of the NRU HSE Lyceum]. *Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»*, 1-9.

- Weekes, D., Lapotaire, J., Persily, A., Siegel, J., Stephens, B., Walker, I., . . . White, B. (2020). Position Document on Indoor Air Quality. *ASHRAE*, 1-23.
- Whittet, T., Hugo, W., & Wilkinson, G. (1965). *Sterilisation and Disinfection*. Heinemann.
- WHO. (2020). Operational considerations for case management of COVID-19 in health facility and community. *Interim guidance*, 1-8.
- WHO. (2021). Roadmap to improve and ensure good indoor ventilation in the context of COVID-19. *World Health Organization*, 1-38.
- WHO. (2011). Annex 6 WHO good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products. *World Health Organization*, 1-24.
- WHO. (2012). Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities - Points to consider for manufacturers of human vaccines. *World Health Organization*, 1-37.
- Xu, Z. (2014). Theory of Biological Cleanroom Chapter 9. *Fundamentals of Air Cleaning Technology and Its Application in Cleanrooms-Springer*, 1-81.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-39374-7_9.
- Yakimenko, V. (2014). Обеззараживание воздуха в системах ОВК общественных зданий [Air disinfection in HVAC systems of public buildings]. *технологическая дирекция НПО «ЛИТ»*, 1-5.
- Yaroslava, V. (2021). Динамика накопления микроорганизмов в воздухе школьных кабинетов [Dynamics of the accumulation of microorganisms in the air of classrooms]. *лицей современных технологий управления № 2*, 1-20.
- Ziatdinov, V., Badamshina, G., Bakirov, A., Zaripova, Z., Isayeva, G., & Karimov, D. (2016). микробиологический мониторинг воздушной среды в медицинских организациях

[Microbiological air monitoring in medical organizations]. *Hygienic and Epidemiological Center in Republic of Tatarstan (Tatarstan)*, 1-5.

ГОСТ. (2008). методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа [Methods of sampling and preparation of samples for chemical, bacteriological, helminthological analysis]. *ГОСТ 17.4.4.02-84 Interstate Standard*, 1-8.

Anexos