



# FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Grado en Biotecnología

Curso 2023/2024

## RIESGO DE EXPOSICIÓN A BIOAEROSOL EN AMBIENTES CLÍNICOS: BRONCOSCOPIAS

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

**Autora:** Lorena Alcalde Pérez

**Modalidad:** Experimental

**Tutora:** Consuelo Ferrer Rodríguez

**Cotutoras:** María Francisca Colom Valiente y Noelia Gómez Sánchez

## Índice de Contenidos

<b>1. Introducción.</b>	<b>5</b>
<b>2. Antecedentes, hipótesis y objetivos.</b>	<b>10</b>
2.1. Antecedentes.	10
2.2. Hipótesis.	11
2.3. Objetivos.	11
<b>3. Materiales y métodos.</b>	<b>11</b>
3.1. Diseño del estudio.	11
3.2. Consideraciones éticas.	12
3.3. Procedimiento de la toma de muestras	12
3.4. Recogida de datos o variables.	13
3.5. Procesado de los filtros.	13
3.6. Cultivo de las muestras.	14
3.7. Identificación microbiana.	14
3.7.1. Estudio mediante microbiología clásica.	14
3.7.2. Tinciones específicas.	15
3.7.3. Pruebas bioquímicas.	15
3.8. Técnicas de biología molecular.	16
3.8.1. Extracción de DNA bacteriano.	16
3.8.2. Extracción de DNA fúngico.	17
3.8.3. Amplificación y secuenciación de DNA bacteriano y fúngico.	17
3.8.4. Detección de RNA de virus respiratorios en filtros de cuarzo.	18
<b>4. Resultados.</b>	<b>20</b>
4.1. Detección de microorganismos por cultivo.	21
4.1.1. Identificación de los aislamientos bacterianos.	21
4.1.2. Identificación de los aislamientos fúngicos.	23
4.1.3. Controles.	24
4.2. Detección virus respiratorios	24
4.3. Carga por filtro (UFC/filtro)	25
4.4. Resultados microbiológicos de los hospitales	26
<b>5. Discusión</b>	<b>26</b>
5.1. Limitaciones del estudio	32
<b>6. Conclusiones y proyección futura</b>	<b>32</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>33</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- HUSJ: Hospital Universitario de San Juan
- HV: Hospital del Vinalopó
- LBA: Lavado broncoalveolar
- UMH: Universidad Miguel Hernández
- micras ( $\mu\text{m}$ ): micrómetros
- $\text{PM}_{10}$ : partículas de 10 micras
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-*Polimerase Chain Reaction*
- RT-PCR: Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa- *Reverse Transcription- Polimerase Chain Reaction*
- $\mu\text{L}$ : microlitro
- CT: umbral del ciclo- Cycle Threshold
- AN: agar nutritivo
- AS: agar sangre
- SDA: Sabouraud Dextrose Agar
- BHI: Brain Heart Infusion
- SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
- VSR: Virus Sincitial Respiratorio
- UCI: Unidad Cuidados Intensivos
- UBNI: Unidad de Broncoscopia y Neumología Intervencionista
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- RNA: Ácido ribonucleico
- EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- FQ: Fibrosis Quística
- ITS: Internal Transcribed Spacer
- TBE: Tris-Borato-EDTA
- ORF1ab: Open Reading Frame 1ab
- NS2: Nonstructural Protein 2
- RdRP: RNA-dependent RNA polymerase (polimerasa de ARN dependiente de ARN)
- Cy5: Cyanine 5
- FAM: Fluorescein Amidite
- HEX: Hexachloro-fluorescein
- VSR: Respiratory Syncytial Virus (Virus Respiratorio Sincitial)
- M1: Matriz 1 (proteína de la matriz del virus Influenza A)
- NS2: Nonstructural Protein 2 (proteína no estructural del virus Influenza B)
- L: Large (proteína L del VSR)
- RP: Ribonuclease P (Ribonucleasa P)

## RESUMEN

*Introducción.* Los trabajadores de la salud corren el riesgo de sufrir infecciones ocupacionales y se sabe que algunos procedimientos, como las broncoscopias, aumentan este riesgo. Por lo tanto, en este estudio se pretende valorar la carga y composición microbiana de los aerosoles generados por los pacientes durante la práctica de broncoscopias para cuantificar el riesgo ocupacional de los profesionales. *Metodología.* Se tomaron muestras de aerosoles durante la práctica rutinaria de broncoscopias en dos hospitales mediante muestreadores personales colocados en la ropa del profesional. Las muestras se cultivaron en distintos medios de cultivo, y se realizó la detección de virus respiratorios (SARS-CoV-2, Influenza A/B y VSR) mediante RT-PCR. *Resultados.* Se recogieron 29 muestras de las cuales se han obtenido un total de 234 aislamientos que corresponden 207 a especies bacterianas y 27 a especies fúngicas. Los géneros bacterianos más abundantes son *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus* y los fúngicos son *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Cladosporium* y *Trichoderma*. También se detectaron un total de 8 muestras positivas para SARS-CoV-2. *Conclusiones.* Las bacterias cultivables de la microbiota oral, nasal y pulmonar se aerosolizan durante la broncoscopia y podrían ser inhaladas por el personal médico. La posible presencia de patógenos en esos aerosoles podría representar un riesgo de infección ocupacional.

*Palabras clave:* Broncoscopia, bioaerosoles, microbiota, patógenos, exposición ocupacional.

## ABSTRACT

*Introduction.* Healthcare workers are at risk of occupational infections and some procedures, such as bronchoscopies, are known to increase this risk. Therefore, this study aims to assess the microbial load and composition of aerosols generated by patients during bronchoscopy in order to quantify the occupational risk of professionals. *Methodology.* Aerosol samples were collected during routine bronchoscopy practice in two hospitals using personal samplers placed on the practitioner's clothing. Samples were cultured in different culture media, and detection of respiratory viruses (SARS-CoV-2, Influenza A/B and RSV) was performed by RT-PCR. *Results.* Twenty-nine samples were collected from which a total of 234 isolates were obtained, 207 of which correspond to bacterial species and 27 to fungal species. The most abundant bacterial genera are *Micrococcus*, *Staphylococcus* and *Bacillus* and the fungal genera are *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Cladosporium* and *Trichoderma*. A total of 8 SARS-CoV-2 positive samples were also detected. *Conclusions.* Culturable bacteria from the oral, nasal and lung microbiota are aerosolised during bronchoscopy and could be inhaled by medical staff. The possible presence of pathogens in these aerosols could represent a risk of occupational infection.

*Keywords:* Bronchoscopy, bioaerosols, microbiota, pathogens, occupational exposure.

## 1. Introducción.

El personal sanitario es el grupo profesional expuesto a los más variados riesgos ocupacionales: biológicos, químicos, físicos y psicológicos. Entre ellos, los trabajadores hospitalarios tienen un 40% más de probabilidad de requerir una baja laboral debido a lesiones o enfermedades relacionadas con el trabajo que otros grupos laborales [1].

La enfermedad laboral está establecida en el artículo 157 de la Ley General de la Seguridad Social y se define como aquella que se contrae como resultado de la exposición a factores de riesgo intrínsecos a la actividad profesional o al entorno de trabajo [2].

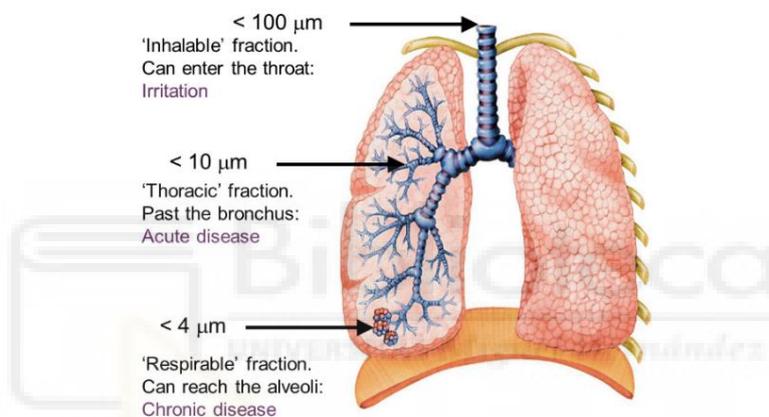
El riesgo biológico es el más frecuente entre los riesgos laborales en el personal sanitario. Tradicionalmente, se ha puesto el foco en enfermedades de transmisión parenteral (como la Hepatitis B y C o el VIH). Sin embargo, a pesar de que la tuberculosis es la enfermedad respiratoria sobre la que más incidencia se ha hecho, la transmisión respiratoria de enfermedades infecciosas no ha sido tan relevante hasta la llegada de la COVID-19. La reciente pandemia causada por el SARS-CoV-2 ha sido el ejemplo más relevante y visible de que los trabajadores del área de la salud se encuentran expuestos a peligros potenciales durante el desempeño de su actividad laboral y ha puesto de manifiesto la vulnerabilidad del personal sanitario a la transmisión aérea y la necesidad de asegurar la salud ocupacional de estos profesionales frente a esta vía. El personal sanitario se encuentra expuesto a diversas enfermedades respiratorias, como el sarampión, con un riesgo de contraerlo hasta 13 veces mayor que el de la población general, además de la gripe, tos ferina, parotiditis, rubéola y VSR [3].

Una infección transmitida por el aire es cualquier enfermedad causada por un microorganismo que se pueda adquirir a través del aire e incluye enfermedades causadas por hongos, virus y bacterias [4]. En líneas generales, existen tres vías de transporte para las partículas cargadas de agentes infecciosos: transmisión de corto alcance por inhalación de gotas ( $>100\ \mu\text{m}$ ), transmisión de largo alcance por inhalación de aerosoles ( $<100\ \mu\text{m}$ ) o por contacto con superficies contaminadas (fómites) [5].

Al inicio de la pandemia de COVID-19 se asumió que las gotitas y los fómites eran las principales vías de transmisión del SARS-CoV-2. Sin embargo, un gran número de investigaciones señaló que la forma de transmisión predominante para la pandemia es la transmisión por aerosoles [6]. Este dato pone en relieve la posibilidad de que la transmisión por aerosoles de otros patógenos respiratorios haya sido infraestimada, lo cual repercute en las prácticas de control de infecciones como la elección de los equipos de protección personal utilizados por el personal sanitario [7].

Un aerosol puede definirse como una suspensión de partículas o gotitas en el aire e incluye polvos, nieblas, vapores o humo en suspensión con un tamaño comprendido entre 0,001  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ . Los aerosoles en los que las partículas son microorganismos se denominan bioaerosoles [8]. La capacidad de penetración y el tiempo de residencia en el aire de los aerosoles depende principalmente del tamaño y es un factor a tener en cuenta en el ámbito de la salud ocupacional, especialmente en profesiones en las que la exposición a aerosoles pueda comprometer la salud de los trabajadores, como es el caso de la profesión médica [9].

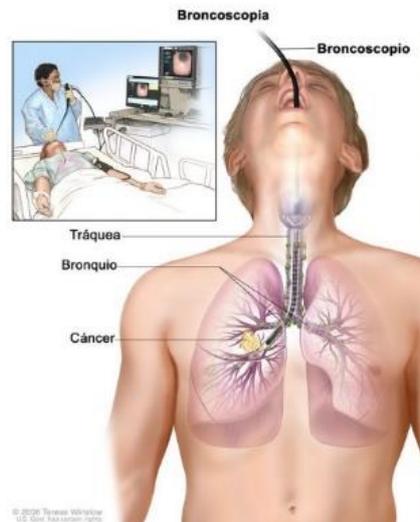
De esta manera, podemos distinguir partículas  $<100 \mu\text{m}$ , con capacidad de depositarse en las vías superiores; partículas  $<10 \mu\text{m}$ , con capacidad para depositarse en los bronquios y bronquiolos; partículas  $<4 \mu\text{m}$ , con capacidad para llegar a los alveolos pulmonares y partículas  $<0,1 \mu\text{m}$ , con capacidad para pasar al torrente sanguíneo (Figura 1) [10].



**Figura 1.** Capacidad de penetración de un aerosol en el sistema respiratorio en función de su tamaño [50].

Durante la práctica médica, existen procedimientos considerados como generadores de aerosoles (AGMPs). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Algunos de estos procedimientos médicos serían: la aspiración abierta de las vías respiratorias, la inducción de esputo, la reanimación cardiopulmonar, la intubación y extubación endotraqueal, la ventilación no invasiva, la broncoscopia y la ventilación manual [11].

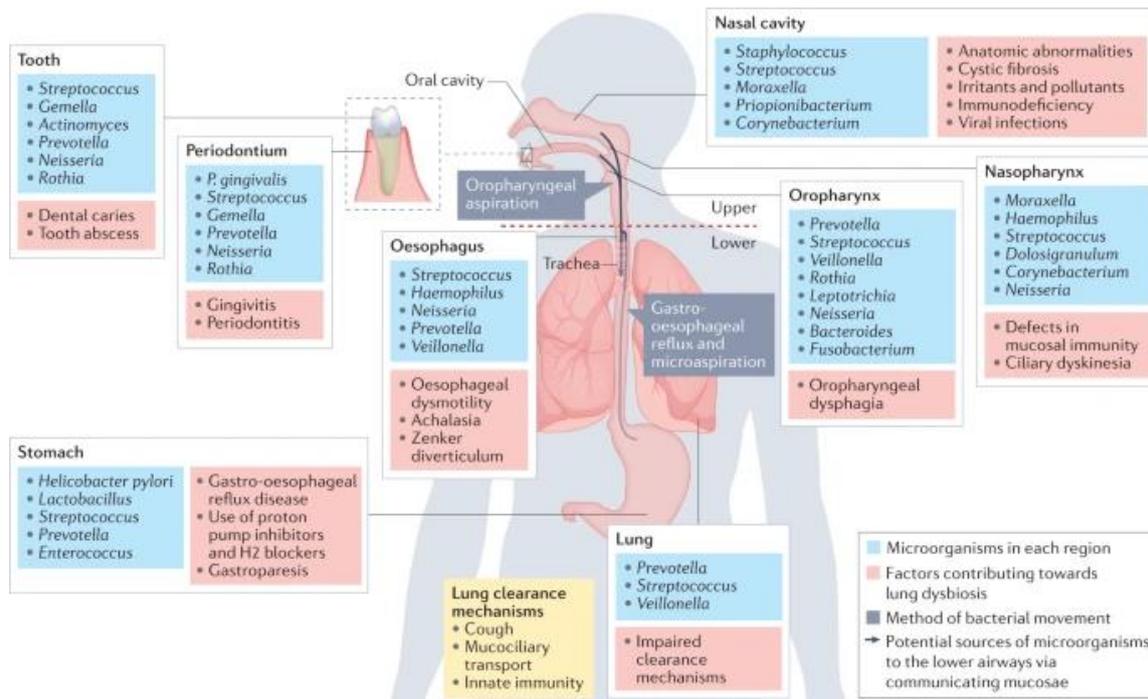
Este trabajo se centra en analizar los bioaerosoles emitidos por los pacientes a los cuales se les realiza una broncoscopia. Este procedimiento médico permite visualizar la vía respiratoria mediante la introducción de un tubo delgado llamado broncoscopio a través de la nariz o la boca que desciende por la garganta hacia los pulmones (Figura 2). Además de evaluar la vía respiratoria, durante este procedimiento se pueden recoger muestras de secreciones respiratorias, ganglios linfáticos y tejido bronquial o pulmonar [12], [13].



**Figura 2.** Procedimiento de realización de broncoscopias. Imagen tomada de la página web de NIH [14].

La manipulación de las vías respiratorias durante la realización de broncoscopias estimula el reflejo de tos en los pacientes, generando aerosoles que pueden contener microorganismos. Estos microorganismos pueden provenir de las vías respiratorias del paciente, ya sea como parte de la microbiota normal o como patógenos responsables de una infección. Entre la microbiota de un pulmón sano que puede ser arrastrada por el mecanismo de la tos o simplemente por el hecho de hablar o respirar, podemos encontrar diferentes géneros como *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, etc. que variará en su composición según su localización dentro del sistema respiratorio. La Figura 3 muestra los géneros bacterianos que podemos encontrar en base a su localización [15].

En comparación con las bacterias, las comunidades fúngicas y virales del pulmón, conocidas como “microbioma” y “viroma”, están menos estudiadas. Los taxones más comúnmente identificados en el microbioma mediante cultivo son *Ascomycota* y *Basidiomycota*, con los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Fusarium* [16]. Si atendemos a los estudios independientes del cultivo, en el estudio realizado por Rubio-Portillo et al determinaron que el “core” del microbioma pulmonar estaba formado por *Cladosporium sp.*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Aureobasidium pullulans*, *Filobasidium magnum*, *Candida parapsilosis*, *Naganishia diffuens* y *Malassezia restricta* [17].



**Figura 3.** Principales microorganismos encontrados en las vías respiratorias según su localización. El tracto respiratorio superior (cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, orofaringe), presenta una biomasa relativamente alta con una microbiota distinta dentro de cada región. Por el contrario, el tracto respiratorio inferior (porción infraglótica de la laringe, tráquea y pulmones), exhibe una biomasa relativamente baja consistente principalmente en comensales orales. Los tres mecanismos principales de eliminación de los microorganismos de los pulmones son la tos, el transporte mucociliar y los mecanismos inmunológicos innatos [15].

En los estudios sobre el viroma pulmonar, se ha encontrado que *Anelloviridae* es el virus eucariota predominante, con detección esporádica de herpesvirus, papilomavirus, retrovirus y otros virus respiratorios. *Anelloviridae* son virus de ADN con una prevalencia superior al 90% en adultos y una amplia distribución en la sangre y los tejidos. Estos virus están en regulación inmunológica constante, ya que sus niveles aumentan con la disfunción inmune, pero no se han asociado con efectos fisiológicos en el huésped ni con enfermedades. Los bacteriófagos también son comunes, especialmente aquellos asociados con huéspedes bacterianos de las vías aéreas superiores [16].

Si hablamos de las bacterias patógenas identificadas como agentes causales de enfermedades respiratorias de transmisión aérea, podemos encontrar *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycoplasma pneumoniae*. Estas bacterias pueden ser transmitidas por aerosoles, causando enfermedades respiratorias graves y potencialmente mortales.

*Streptococcus pneumoniae* puede causar neumonía, sinusitis, otitis, meningitis, y otras enfermedades respiratorias. *Chlamydia pneumoniae* causa infecciones respiratorias superiores e inferiores, como la neumonía atípica, la bronquitis y la sinusitis, y se asocia con enfermedades respiratorias crónicas como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). *Streptococcus pyogenes* es la causa más común de faringitis estreptocócica, y puede causar infecciones de la piel y tejidos blandos, así como enfermedades invasivas como la neumonía y la sepsis. *Staphylococcus aureus* se encuentra comúnmente en la piel y las membranas mucosas y puede causar infecciones respiratorias, como la neumonía en pacientes con fibrosis quística u otras patologías crónicas. *Haemophilus influenzae* puede causar infecciones respiratorias, como la neumonía, la otitis y la sinusitis. *Pseudomonas aeruginosa* puede causar infecciones respiratorias en personas con enfermedades pulmonares crónicas, como la fibrosis quística y EPOC, produciendo infecciones nosocomiales y pacientes inmunodeprimidos. *E. coli* se encuentra principalmente en el tracto intestinal humano, aunque algunas cepas pueden causar infecciones respiratorias, especialmente en pacientes hospitalizados. *Stenotrophomonas maltophilia* puede causar infecciones respiratorias en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y pacientes hospitalizados. *Mycoplasma pneumoniae* causa neumonía atípica, bronquitis y faringitis [18].

Por otra parte, los hongos son microorganismos presentes de forma ubicua en la naturaleza, algunos de ellos siendo capaces de causar enfermedades infecciosas en humanos. La transmisión de algunos hongos se puede producir por inhalación de esporas, que pueden encontrarse en el aire en forma de aerosoles, como *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* y *Aspergillus spp.* Estos hongos son capaces de infectar a individuos inmunocomprometidos, provocando enfermedades respiratorias graves. No obstante, algunos de estos hongos pueden formar parte de la microbiota de las vías respiratorias. Entre los hongos mencionados, la inhalación de esporas de *Pneumocystis jirovecii* puede causar neumonía en personas con sistemas inmunológicos debilitados. Por otro lado, *Histoplasma capsulatum* causa histoplasmosis, una enfermedad respiratoria que puede ser grave en pacientes inmunocomprometidos, aunque puede afectar a individuos inmunocompetentes en menor medida. Blastomycosis y criptococosis son otras enfermedades fúngicas transmitidas por inhalación de conidias. *Blastomyces dermatitidis* y especies del género *Coccidioides* pueden causar enfermedades respiratorias graves, mientras que especies de los complejos *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* pueden infectar los pulmones y diseminarse al cerebro, causando meningitis. *Aspergillus*, presente en el ambiente, puede causar enfermedades como la aspergilosis invasiva, que afecta principalmente a personas inmunodeprimidas [18].

En cuanto a los virus de infecciones respiratorias, se encuentran el virus de la influenza, el virus respiratorio sincitial (VSR), los coronavirus, incluido el SARS-CoV-2, y los rinovirus, todos ellos

transmitidos por vía aérea. Estos virus pueden causar infecciones respiratorias graves, particularmente en individuos inmunocomprometidos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes. El virus de la influenza puede causar desde infecciones respiratorias leves hasta neumonías graves y exacerbaciones de enfermedades crónicas. El VSR es particularmente peligroso en niños pequeños y ancianos, pudiendo causar bronquiolitis y neumonía. Los coronavirus, incluidos los responsables de epidemias recientes como el SARS, el MERS y el SARS-CoV-2, pueden provocar enfermedades respiratorias graves y se transmiten eficazmente en entornos hospitalarios. Los rinovirus, aunque generalmente causan resfriados comunes, también pueden llevar a complicaciones severas en pacientes con sistemas inmunológicos debilitados. Este hecho ha comportado que las pautas internacionales de prevención y control de infecciones recomienden que el equipo de protección personal incluya un alto nivel de protección respiratoria [11].

## **2. Antecedentes, hipótesis y objetivos.**

### **2.1. Antecedentes.**

El laboratorio de Micología del departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández (UMH), lleva varios años trabajando en el estudio del microbioma pulmonar en colaboración con varios hospitales de Alicante, en concreto el Hospital General Universitario de Alicante, Hospital Universitario de San Juan y el Hospital Universitario del Vinalopó. Debido a la preocupante situación de alarma causada por la pandemia del SARS-CoV-2, en 2021 se inició una línea de investigación sobre el estudio de virus respiratorios en aerosoles. Este proyecto se realizó en el departamento de Producción Vegetal y Microbiología, en asociación con el departamento de Física Aplicada, ambos pertenecientes a la UMH y con la colaboración con los hospitales mencionados anteriormente. Más adelante, esta línea de investigación se amplió al estudio del riesgo ocupacional del personal sanitario a los bioaerosoles, comenzando con el riesgo ocupacional en personal sanitario extrahospitalario, en concreto en clínicas odontológicas para lo que se contó con la colaboración del Grupo Médico Dental Ambrosio Bernabéu. En él se valoraba la carga y diversidad microbiana a la que se enfrentan los profesionales odontológicos en su práctica laboral diaria. Se evaluó la exposición directa a los bioaerosoles a los que se ve sometido el personal durante la realización de prácticas odontológicas, estudiándose la presencia de bacterias y hongos, así como la de los virus respiratorios Influenza A/B, VSR y SARS-CoV-2.

En este estudio se pretende valorar la carga y diversidad microbiana (bacterias, hongos y virus respiratorios) a la que se está expuesto el personal sanitario durante la realización de broncoscopias.

## **2.2. Hipótesis.**

La **hipótesis** de este trabajo asume que, en los aerosoles emitidos por pacientes con enfermedades respiratorias durante la realización de broncoscopias, viajan patógenos responsables de que se produzca la transmisión aérea a los profesionales de la salud, lo que supone un potencial peligro para el personal sanitario encargado de realizar dicha técnica.

## **2.3. Objetivos.**

El objetivo principal es evaluar el riesgo biológico del personal sanitario que realiza broncoscopias mediante la identificación de los posibles microorganismos patógenos liberados en los bioaerosoles procedentes de pacientes a los que se les realiza una broncoscopia.

Para ello, se establecen una serie de objetivos secundarios:

- Evaluar la carga y diversidad bacteriana viable contenidas en los bioaerosoles producidos durante las broncoscopias e identificar los posibles agentes patógenos.
- Evaluar la carga y diversidad fúngica viable contenida en los bioaerosoles e identificar los agentes patógenos.
- Estudiar la presencia y carga vírica de SARS-CoV-2, Influenza A/B y VSR en los bioaerosoles.
- Correlacionar los resultados obtenidos en este estudio con la indicación clínica de los pacientes.

## **3. Materiales y métodos.**

### **3.1. Diseño del estudio.**

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, multicéntrico y transversal. El estudio se ha llevado a cabo con muestras de bioaerosoles obtenidas de las salas de broncoscopia de los servicios de UBNI (Unidad de Broncoscopia y Neumología Intervencionista) o en la UCI del Hospital Universitario de San Juan y el Hospital Universitario del Vinalopó. La toma de muestras se produjo entre el 25 de septiembre del 2023 y el 1 de marzo del 2024. Las broncoscopias se realizaban tres días a la semana, martes, miércoles y jueves en el Hospital de San Juan y martes en el del Vinalopó.

La muestra de aerosoles se tomaba siempre que los pacientes que se iban a someter a la broncoscopia durante el periodo del muestreo no presentasen tuberculosis, ya que no se dispone del nivel de bioseguridad necesario para trabajar con este patógeno. El análisis de los bioaerosoles obtenidos se realizó en el laboratorio de Micología Médica del dpto. de Producción Vegetal y Microbiología de la UMH.

### 3.2. Consideraciones éticas.

Este estudio ha sido aprobado por los comités de ética del Hospital Universitario de San Juan, Hospital Universitario del Vinalopó y de la Universidad Miguel Hernández. Cuenta con el código COIR: TFG.GBI.CFR.LAP.231212 (Anexo 2).

### 3.3. Procedimiento de la toma de muestras

Los aerosoles generados durante la broncoscopia se captaron mediante filtros de cuarzo (Whatman 37 mm) [19] insertados en captadores personales de solapa “Personal Impactors Model 200” (Figura 4). Estos captadores presentaban un cabezal que capta la fracción PM<sub>10</sub> y un flujo de aire de 10 L/min.



**Figura 4.** A) Captador personal de solapa “Personal Impactors Model 200” con cabezal PM<sub>10</sub>. Fotografía tomada en el laboratorio. B) Cabezal PM<sub>10</sub>. Imagen tomada de Internet. C) Filtros de cuarzo (Whatman 37 mm). Imagen tomada de la página web de Fisher Scientific [19].

El tiempo de residencia de los aerosoles en el aire, y por tanto su capacidad de ser captadas, dependen de varios parámetros, incluyendo el tamaño, la forma y la densidad de las partículas. El cabezal PM<sub>10</sub> es capaz de captar las partículas que presentan un diámetro aerodinámico de 10 µm con una eficiencia de corte del 50%. Por tanto, mediante el uso de estos cabezales, aseguramos la captación de al menos un 50% de las partículas con un tamaño de 10 micras. A medida que el radio aerodinámico de la partícula aumente, disminuirá la probabilidad de captarla, de manera inversamente proporcional [20].

El filtro se mantenía en el captador durante una jornada (aproximadamente 4 horas), de manera que cada filtro ha sido expuesto a los aerosoles emitidos por entre 1 a 4 pacientes.

Para el muestreo, el profesional sanitario encargado de realizar la broncoscopia colocaba el cabezal que contiene el filtro a la altura del pecho (Figura 5). El captador se encendía cuando se empezaba a realizar el procedimiento y se apagaba una vez acabado. Una vez tomada la muestra, el filtro se colocaba en una placa Petri mediante unas pinzas estériles, y se transportaba al laboratorio para su estudio.



**Figura 5.** Colocación del captador en el uniforme del personal sanitario encargado de realizar la broncoscopia. Fotografía tomada en el laboratorio.

Se recogieron filtros en 4 situaciones diferentes:

1. Control negativo: se usó un filtro recién tomado de la caja, sin haber sido expuesto a aerosoles ni haber estado en contacto con el cabezal del captador.
2. Control de la sala de broncoscopias vacía: se tomaron muestras de ambiente de la sala donde se realiza el procedimiento para comprobar la carga microbiana en ausencia de pacientes. Para ello, se dejaron 2 placas de SDA abiertas durante 10 min y se recogió una muestra ambiental mediante un captador durante 60 min antes de empezar con los procedimientos de broncoscopias de esa jornada.
3. Muestras de la sala de broncoscopias durante el procedimiento: aerosoles captados en los filtros durante la realización de las broncoscopias.
4. Control de la sala entre pacientes: se tomó una muestra del aire de la sala después de haber realizado una broncoscopia a un paciente y antes de que entrara el siguiente paciente.

#### **3.4. Recogida de datos o variables.**

Las variables recogidas durante el muestreo fueron: temperatura y humedad relativa de la sala, el tiempo de muestreo, número de pacientes y el volumen de aire recogido.

En cuanto a las variables recogidas de los pacientes fueron: la sospecha clínica por la que se le realizaba la broncoscopia de cada paciente y los resultados microbiológicos de los lavados broncoalveolares (LBA) obtenidos por los laboratorios clínicos de los hospitales.

#### **3.5. Procesado de los filtros.**

Una vez en el laboratorio de Micología Médica de la UMH, cada filtro se dividió en 7 fragmentos que se sometieron a distintos procesos: cultivo para la detección de bacterias y hongos, extracción de ácidos nucleicos para la detección de virus (SARS-CoV-2, Influenza y VSR) y una parte se almacenó a -18 °C por si fuera necesario repetir una prueba o realizar una prueba adicional (Figura 6).

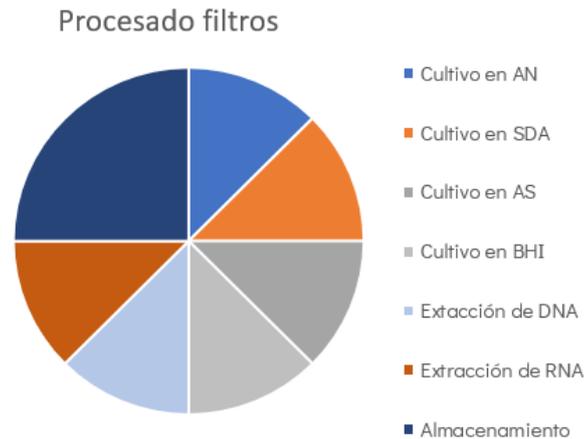


Figura 6. Esquema de procesamiento de filtros.

### 3.6. Cultivo de las muestras.

Para realizar los cultivos se depositó 1/8 de filtro directamente sobre la superficie del medio correspondiente. Se emplearon diferentes medios para asegurar el crecimiento del mayor número de especies bacterianas: agar nutritivo (AN), agar sangre (AS) y caldo/agar cerebro corazón (*Brain Heart Infusion*, BHI). Para el cultivo de hongos se usó el medio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

Los filtros se incubaron a 37 °C en condiciones de aerobiosis hasta 7 días, controlando el crecimiento microbiano a las 48 h, y posteriormente en los días 5 y 7.

### 3.7. Identificación microbiana.

Para la identificación de las colonias microbianas, se realizó un primer análisis macroscópico de la forma, color y número de colonias en cada filtro. Una vez registrados estos datos, se procedió al aislamiento de cada una de las colonias para su estudio mediante microbiología clásica (tinción y cultivo) y biología molecular (PCR y secuenciación).

#### 3.7.1. Estudio mediante microbiología clásica.

Para cada una de las colonias bacterianas se registraron una serie de datos para clasificar las colonias: medio de crecimiento (AN, AS, BHI), color, aspecto de la colonia, tinción de Gram, morfología microscópica (coco, bacilo, filamentoso), agrupaciones (parejas, tétradas, racimos,) formación de cápsula o exopolisacárido (EPS), prueba de la catalasa, prueba oxidasa y hemólisis.

Para la identificación fúngica se registró el aspecto de la colonia (mucoso o algodonoso), color, tamaño, características microscópicas (levadura, filamentoso, características del micelio, conidióforos y conidias).

### 3.7.2. Tinciones específicas.

Como primer paso en la identificación microbiana, las colonias aisladas de hongos y bacterias procedentes del cultivo directo se sometieron a tinciones específicas para poder visualizarlas al microscopio óptico. Se utilizó tinción Gram en el caso de bacterias y tinción con azul de lactofenol en el caso de hongos.

La tinción Gram nos permitió diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos (positivas y negativas) en función de la estructura de su pared. Además, pudimos visualizar la morfología de la bacteria y clasificarla en bacilos, cocos, coco-bacilos, etc.

Por otro lado, la tinción con azul de lactofenol es una tinción convencional que permite observar la morfología microscópica de las células fúngicas ya sean levaduras o filamentosos. El estudio de la estructura de las hifas, y estructuras reproductivas como los conidióforos, conidios, etc. junto a la visualización macroscópica, permitió la identificación de la especie fúngica en algunos hongos filamentosos.

### 3.7.3. Pruebas bioquímicas.

Una vez realizadas las tinciones específicas de las colonias de microorganismos, el siguiente paso en la identificación fue realizar pruebas bioquímicas, en concreto las pruebas de catalasa, oxidasa y hemólisis en agar sangre.

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba consiste en comprobar la presencia de esta enzima en las bacterias a identificar. Esta enzima se encuentra en la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el citocromo oxidasa y cuya principal excepción son las bacterias del género *Streptococcus*. Para ello, se toma una colonia con el asa de siembra y se hace una extensión en un porta-objetos. A continuación, se añaden unas gotas de peróxido de hidrógeno al 30 % y se observa si se forman burbujas, en cuyo caso la prueba resultaría positiva.

La prueba de la oxidasa se utilizó para determinar la presencia de enzimas oxidasas. Esta reacción se produce debido a la presencia del sistema citocromo oxidasa, que forman parte de la cadena de transporte de electrones, transfiriendo electrones al oxígeno y produciendo la formación de agua. Se suele encontrar en los microorganismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y excepcionalmente, en algunos microaerófilos.

La prueba de hemólisis en agar sangre se realizó para visualizar la capacidad hemolítica de los microorganismos. Para realizar esta prueba, se dejan crecer las colonias en el agar sangre. Una vez se

ha producido el crecimiento, se observan los halos hemolíticos alrededor de las colonias. Según la capacidad de producir la lisis de los glóbulos rojos, podemos encontrar 3 tipos de hemólisis (Figura 7):

- Hemólisis alfa: hemólisis parcial de los glóbulos rojos. La zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verdoso.
- Hemólisis beta: hemólisis total de los glóbulos rojos. La zona de crecimiento aparece rodeada de un halo transparente.
- Hemólisis gamma: no hay hemólisis. El microorganismo no es capaz de lisar los glóbulos rojos, por lo que no aparece ningún halo en la zona de crecimiento.



Figura 7: Representación de los diferentes halos hemolíticos en agar sangre.

### 3.8. Técnicas de biología molecular.

#### 3.8.1. Extracción de DNA bacteriano.

La extracción del DNA bacteriano se realizó mediante el sistema comercial InstaGene™ de Bio-Rad. La matriz InstaGene™ incluye en su formulación una resina Chelex al 6 % p/v. Esta matriz Chelex adsorbe los productos de lisis celular que pueden interferir con el proceso de PCR, evitando la pérdida de DNA por unión irreversible [21].

Para realizar la extracción, en primer lugar, se agitó el envase para homogeneizar el contenido. A continuación, se tomaron 100 µL de InstaGene y se depositaron en un microtubo de 1,5 mL estéril. Se tomó una colonia aislada de las bacterias de las que se quería extraer el DNA y se suspendió en la solución. Seguidamente, se agitó unos segundos mediante vórtex y se colocó a 56 °C durante 20 minutos. A continuación, se volvió a agitar y se puso a 100 °C durante 8 min. Por último, se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto y se tomó el sobrenadante que contenía el DNA extraído para realizar la amplificación por PCR.

### 3.8.2. Extracción de DNA fúngico.

Para la extracción del DNA genómico de los hongos aislados se utilizó el sistema comercial *NZY Plant/Fungi gDNA Isolation kit* de *NZYTech*<sup>®</sup> siguiendo las recomendaciones del fabricante. El método está basado en el uso de columnas de sílice y no requiere extracción con cloroformo o formol. Este kit utiliza dos sistemas de tampones de lisis basados en los métodos establecidos CTAB y SDS. Este sistema incluye las columnas de homogeneización para purificar los lisados crudos. A continuación, el lisado filtrado se mezcla con un tampón de unión PN para una unión óptima del DNA a la membrana de sílice de la columna. De esta manera, el DNA se adsorbe selectivamente a la columna *NZYSpin Plant* y las impurezas como sales o proteínas son eliminadas mediante diversos pasos de lavado con tampones de lavado incluidos en el kit. Por último, se eluye el DNA con un último lavado con tampón de elución y se obtiene el DNA listo para su amplificación por PCR [22].

### 3.8.3. Amplificación y secuenciación de DNA bacteriano y fúngico.

Se realizó una PCR convencional para la amplificación de la región V1-V3 con una región específica del gen ARNr 16S en el caso de bacterias y la región ITS1-5.8S-ITS2 en el caso de los hongos. Las regiones amplificadas y los primers utilizados se muestran en la Figura 8 y en la Tabla 1, respectivamente.

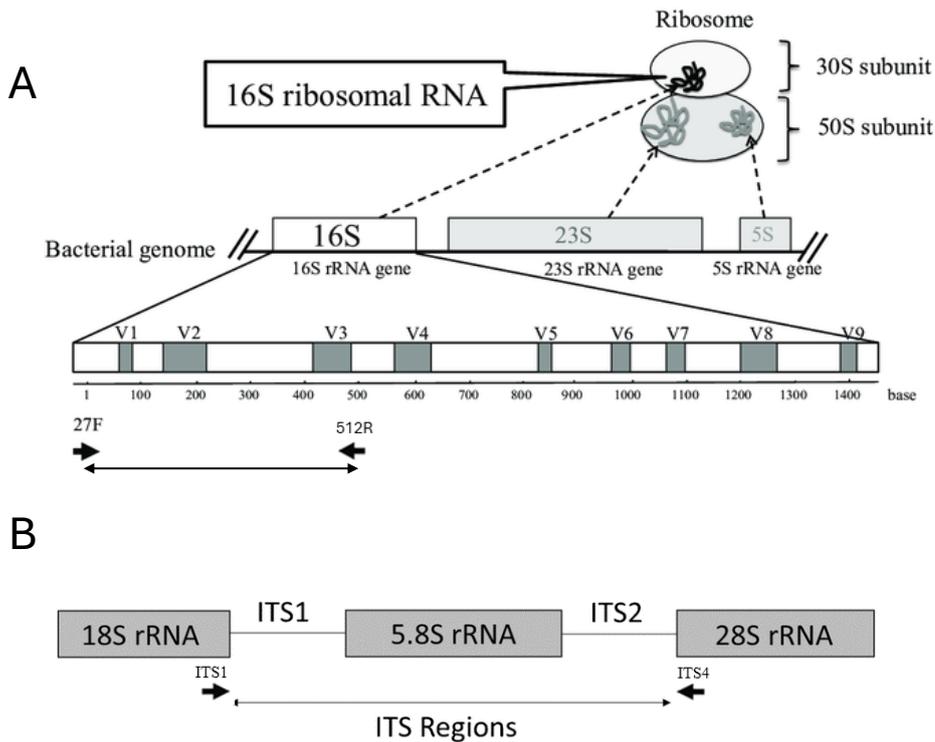
**Tabla 1.** Primers utilizados para la amplificación de las regiones “barcode” de bacterias y hongos.

Primer	Región hibridación	Secuencia	Referencia	Fragmento
Bac-F (27F)	16S rRNA	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Kim et al. 2012	515 pb
Bac-R (512R)	16S rRNA	TTACCGCGGCKGCTGGCAC	Kim et al. 2012	
ITS1	18S RNA gene	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Ferrer et al. JCM 2001	500-850 pb
ITS4	28S RNA gene	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Ferrer et al. JCM 2001	

Las condiciones de la PCR en ambos casos fueron las misma y se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Protocolo de ciclos llevado a cabo para la amplificación bacteriana y fúngica.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	95 °C	5 min	Desnaturalización inicial
40	95 °C	30 seg	Desnaturalización
	55 °C	1 min	Hibridación sonda
	72 °C	1 min	Extensión
1	72 °C	5 min	Extensión final



**Figura 8. A)** Región del genoma bacteriano que codifica para los rRNA en el que se muestra dónde hibridan los primers y la región que amplifican. Fuente: Modificado de Fukuda et al. J UOEH 2016. **B)** Región el genoma fúngico que codifica para los rRNA donde se muestra donde hibridan los primers y la región que amplifican. Fuente: Modificado de Krystin GenoHub blog 2023.

Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en TBE a 120 mA durante 20 minutos para comprobar que se ha producido correctamente la amplificación de los genes. Si la amplificación ha transcurrido de forma adecuada, es posible visualizar un fragmento de  $\approx 550$  pb en el caso del ARNr 16S de bacterias y de entre 400 -750 pb en el caso de la región ITS de hongos.

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados, primero se eliminó el exceso de cebadores lineales y dNTPs no incorporados mediante el kit *ExoProStar™* de *Illustra™*, que incluye una exonucleasa de tipo I, que degrada el DNA monocatenario sin afectar al DNA de doble cadena y una fosfatasa alcalina que elimina los dNTPs no incorporados [23]. Una vez obtuvimos los productos de PCR limpios, estos se enviaron a una empresa externa (STABVIDA) para la secuenciación por el método Sanger.

#### 3.8.4. Detección de RNA de virus respiratorios en filtros de cuarzo.

En primer lugar, se realizó la extracción de RNA utilizando 1/8 del filtro mediante el sistema QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50), siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras se lisaron mediante tampones y enzimas optimizados, que estabilizan los ácidos nucleicos y mejoran la adsorción del RNA a la membrana de sílice de la columna del sistema QIAamp. Para garantizar la integridad del RNA, las muestras se lisan en condiciones altamente desnaturizantes, que inactivan las RNAsas. El

protocolo incluye dos pasos de lavado que eliminan las posibles impurezas que pueden afectar al proceso de PCR, obteniendo el RNA viral puro eluido en un tampón de elución incluido en el kit [24].

Para realizar la detección cualitativa de virus respiratorios se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR). Los virus detectados fueron el VSR, la Influenza A/B y el SARS-CoV-2. Para ello, se utilizó el kit NZYTech's *COVID-19, Flu A/B, VSR Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD* de NZYTech® [25].

Debido a que se trata de un método de detección semicuantitativo, no es posible determinar la carga viral exacta (U/mL) de la muestra, por lo que los resultados se expresan en términos del valor umbral del ciclo o CT (Cycle Threshold). Este valor indica en qué ciclo se observa un aumento significativo de la fluorescencia que permite considerar que la muestra es positiva para un virus en específico. El valor de CT varía entre 0 y 40, siendo un valor bajo de CT indicativo de una alta carga viral (ya que se requieren menos ciclos de amplificación para superar el umbral de positividad) y un valor alto de CT indicativo de una baja carga viral. En una muestra nasofaríngea, las referencias para considerar si un paciente presenta alta o carga viral son: un CT menor a 20 se considera alta carga viral, un CT entre 20 y 30 se considera carga viral media, y un CT mayor a 30 se clasifica como baja carga viral. [26]. En los estudios donde se estudia la carga viral en aerosoles los valores CT oscilar entre 30 y 40, siendo más próximos a este último [27].

Este kit está diseñado para diagnóstico in vitro y proporciona el conjunto de sondas y reactivos necesarios para detectar los genomas víricos. Para identificar el virus SARS-CoV-2, se amplifican las dianas ubicadas en los genes *rdrp* y *n*. El gen *rdrp* codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) y el gen *n* codifica para la fosfoproteína de la nucleocápside viral (proteína N). El virus la Influenza A se identifica amplificando dianas situadas en el gen *M1*, que codifica para la proteína de matriz del virus. Por otro lado, la Influenza B se detecta mediante la amplificación del gen *ns2*, que codifica para la proteína no estructural 2 (NS2), involucrada en la exportación de los complejos de ribonucleoproteínas virales. Por último, para realizar la identificación del virus VSR, se amplifica el gen *L*, que codifica para la proteína L, que se trata de la polimerasa viral. El kit presenta además un control interno mediante la amplificación del gen de la ribonucleasa P humana (RP). Este control interno permite validar el proceso de extracción de RNA y la ausencia de inhibidores de la PCR presentes en las muestras biológicas humanas.

Para la amplificación del DNA viral, se utilizaron 6 mezclas de cebadores y sondas suministrados en el kit. La sonda que permite detectar SARS-CoV-2 pertenecen al canal de fluorescencia *Texas Red*®. En el caso de la Influenza A y B, las sondas pertenecen al canal de fluorescencia *FAM*™. Para VSR, la

sonda pertenece al canal de fluorescencia *HEX™*. En el caso del control interno, la sonda utilizada pertenece al canal de fluorescencia *Cy5™*.

El kit incluye dos controles positivos y un control negativo. El primer control positivo incluye fragmentos de la ORF1ab para SARS-CoV-2, del gen NS2 para Influenza B, del gen L para VSR y genes RP humanos. El segundo control positivo contiene fracciones del gen N de SARS-CoV-2, del gen M1 de Influenza A, fragmentos del gen L para SVR y del control interno RP humanos.

La plataforma usada para la amplificación a tiempo real fue el equipo *CFX Opus 96 Real-Time PCR System*.

#### 4. Resultados.

Se recogieron un total de 27 filtros de muestras de aerosol procedentes de la práctica de bronoscopias realizadas a 70 pacientes (Tabla 3) entre el 25 de septiembre del 2023 y el 1 de marzo del 2024. De estas, 19 muestras fueron recogidas en el Hospital Universitario de San Juan (HUSJ), correspondientes a 54 pacientes y las 8 restantes se tomaron en el Hospital Universitario del Vinalopó (HUV) procedentes de 16 pacientes. Además, se realizaron 3 controles: 2 muestras de aerosoles tomadas con la sala vacía (una antes y otra después de realizar la sesión de bronoscopia) y un filtro directamente de la caja sin exponerlo a aerosoles.

Las muestras de aerosoles se tomaron en la UBNI (Unidad de Broncoscopia y Neumología Intervencionista) de ambos hospitales, con excepción de 1 muestra, que se tomó a un paciente de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

**Tabla 3.** Resumen muestras obtenidas.

Hospital	Muestras	Pacientes	Unidad
HUSJ	19	54	UBNI
HV	8	15	UBNI
		1	UCI
Control sala vacía	2		UBNI
Control filtro	1		UBNI

Se identificaron un total de 14 indicaciones clínicas para la realización de las bronoscopias (Tabla 4). La principal indicación clínica fue la presencia de un nódulo/masa pulmonar, seguida de la neumonía y cáncer de pulmón en tercer lugar.

**Tabla 4.** Indicaciones clínicas para la realización de bronoscopias.

<b>Indicación clínica</b>	<b>N.º Pacientes</b>
Masa /nódulo pulmonar	24
Neumonía	14
Cáncer pulmón	6
Hemoptisis	5
Atelectasia	4
EPID	3
Bronquiectasias	2
Adenopatías mediastínicas	2
Infiltrados pulmonares	1
Neumonitis por hipersensibilidad	1
Endocarditis	1
Asma	1
Síndrome Di George	1
Otros	5

Tal y como se ha descrito en el apartado 3.4, se tomaron los valores de temperatura, humedad, tiempo de muestreo y volumen de aire muestreado recogidas por el captador. Los valores promedio tomados de la sala en la que se realizaron las bronoscopias quedan descritas en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros medidos en la sala de bronoscopias.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor promedio</b>
Pacientes	3 ± 1
Tiempo (min)	41,66 ± 21
Volumen (l/min)	415 ± 218
Temperatura (°C)	24,91 ± 2
Humedad (%)	55 ± 13

#### **4.1. Detección de microorganismos por cultivo.**

Del cultivo de los 29 filtros muestreados se han obtenido un total de 234 aislamientos que corresponden 207 a especies bacterianas y 27 a especies fúngicas.

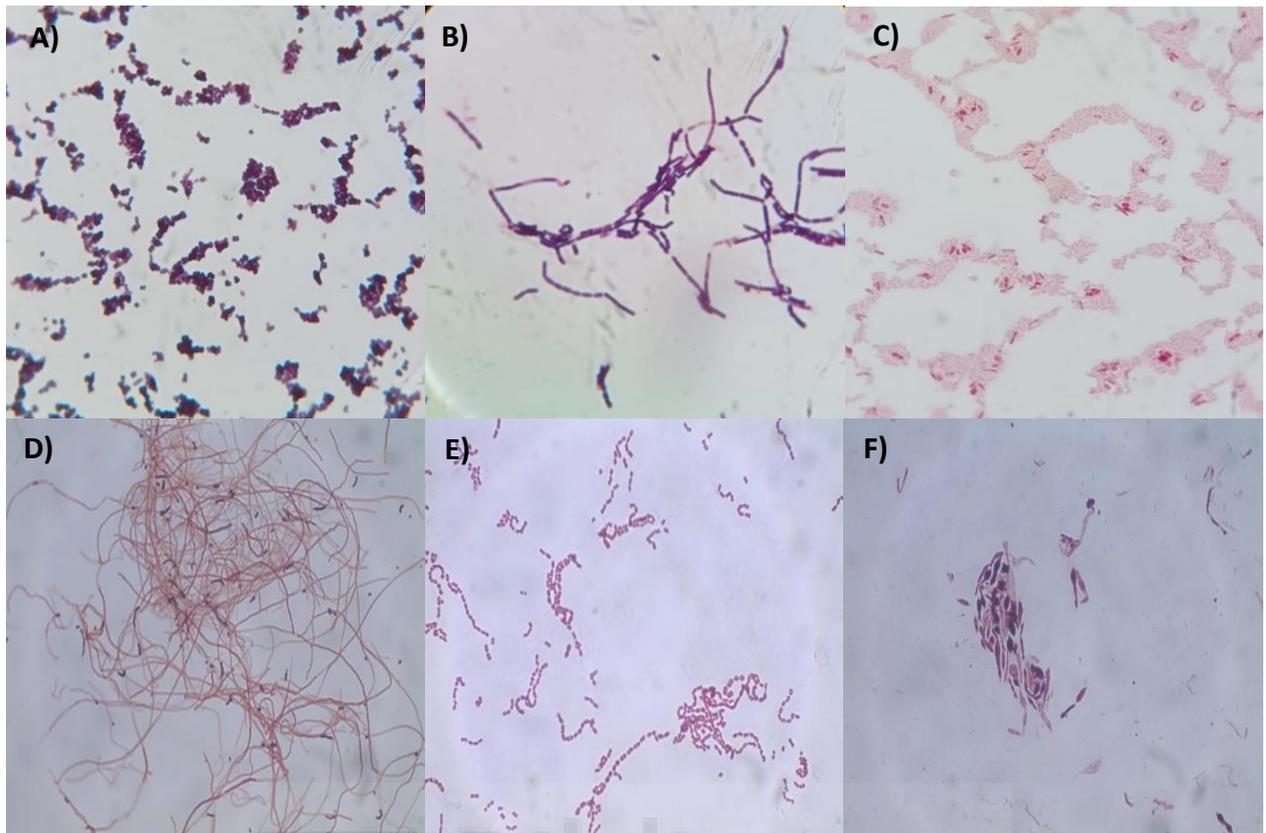
##### **4.1.1. Identificación de los aislamientos bacterianos.**

Se identificó todas aquellas colonias que crecieron sobre los filtros depositados sobre la superficie de los diferentes medios de cultivo (AS, BHI, AN). Para comenzar, se hizo un estudio mediante pruebas de microbiología clásica para clasificar los aislados (Figura 9) y posteriormente se realizó la identificación molecular mediante secuenciación de 16S rRNA. Se han identificado un total de 174

aislamientos pertenecientes a 28 géneros distintos (Anexo 1). El género identificado con una mayor frecuencia ha sido el género *Micrococcus*, del que se han logrado identificar 2 especies (*M. luteus*, *M. aloeverae*). En segundo lugar, se encuentra el género *Staphylococcus*, del que se han aislado 10 especies distintas (*S. cohnii*, *S. taiwanensis*, *S. aureus*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. pragensis*). En tercer lugar, encontramos al género *Bacillus*, del cual se ha logrado identificar 5 especies (*B. cereus*, *B. tropicus*, *B. paramycoides*, *B. velezensis* y *B. licheniformis*). El cuarto género más abundante es el género *Streptomyces*, del que se han identificado hasta 9 especies (*S. olivaceus*, *S. sampsonii*, *S. alfalfae*, *S. swartloengensis*, *S. vinacedrapus*, *S. yangpuensis*, *S. atrovirens*, *S. speibonae* y *S. antibioticalis*).

Otros géneros de los cuales se han identificado varias especies han sido el género *Kocuria*, con 3 especies (*K. rosea*, *K. arsenatis* y *K. rhizophila*), el género *Nocardiopsis* (*N. synnemataformans*, *N. umidischolae*), el género *Priestia* (*P. megaterium*, *P. endophytica*), *Saccharothrix* (*S. xinjiagensis*, *S. saharensis*), *Corynebacterium* (*C. sanguinis*, *C. fournieri*), o *Methabacillus* (*M. endolithicus*, *M. schmidtae*)

Otras especies encontradas con una menor frecuencia son *Brevibacterium ptyocampae*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Moraxella osloensis*, *Kroppenstedtia pulmonis*, *Stutzerimonas stutzeri*, *Roseomonas mucosa*, *Lysinibacillus telephonicus*, *Microbacterium liquefaciens*, *Cutibacterium acnes*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter lwoffii*, *Aerococcus viridans*, *Neobacillus niacini*, *Kytococcus sedentarius*, *Brachybacterium conglomeratum*, *Calidifontibacillus erzurumensis*, *Terribacillus goriensis*.



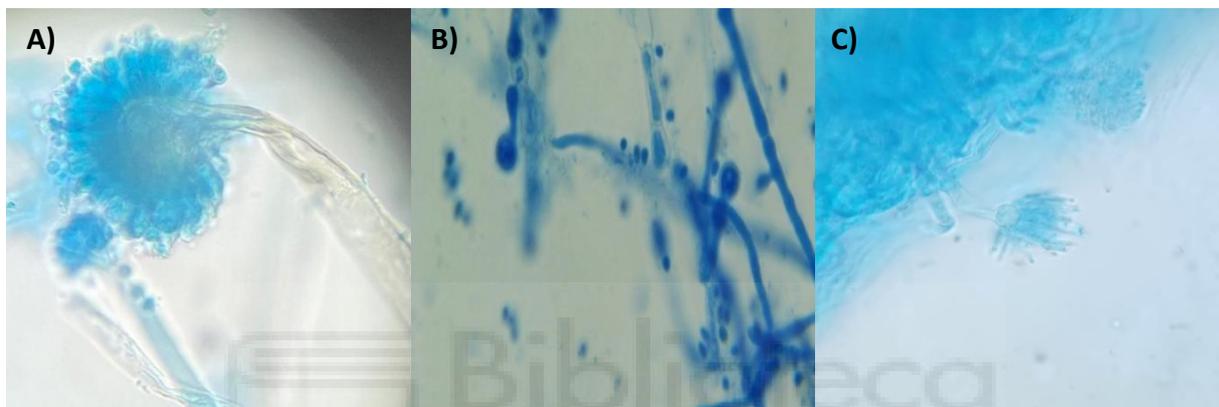
**Figura 9. Tinciones de Gram realizadas a algunos aislamientos bacterianos. A) *Staphylococcus aureus*, aislamiento BR-56 AS A B) *Bacillus paramycoides*, aislamiento BR-58 AN A2 C) *Moraxella osloensis*, aislamiento BR-56 AN R D) *Streptomyces sampsonii*, aislamiento BR-64 AS B1 E) *Roseomonas mucosa*, aislamiento BR-55 AN 2 F) *Stutzerimonas stutzeri*, aislamiento BR-60 AS M1 1. Fotografías tomadas a 1000x aumentos.**

#### 4.1.2. Identificación de los aislamientos fúngicos.

Para el análisis del componente fúngico que viaja en los aerosoles, se tuvieron en cuenta todas aquellas colonias que crecieron en los filtros depositados, no solo en agar Sabouraud, sino en los 4 medios de cultivo utilizados. Al igual que para los aislamientos bacterianos, en primer lugar, se hicieron tinciones con azul de lactofenol para la clasificación de las colonias (Figura 10). Se han obtenido un total de 27 aislamientos fúngicos, de los cuales se han logrado identificar 21 mediante secuenciación de la región ITS-5.8S rRNA. El género mayoritario que se ha encontrado ha sido el género *Aspergillus*, pudiendo identificar dentro de éste 6 especies diferentes (*A. niger*, *A. versicolor*, *A. pulvericola*, *A. flavus*, *A. candidus* y *A. nidulans*). Por otra parte, del género *Talaromyces* se han identificado 2 especies (*T. stipitatus* y *T. clemensii*) y las especies *Cladosporium chasmanthicola* y *Trichoderma harzianum* (Tabla 6).

**Tabla 6.** Identificación de especies fúngicas

Especie fúngica	N.º Aislamientos
<i>Aspergillus niger</i>	7
<i>Aspergillus sp.</i>	3
<i>Cladosporium chasmanthicola</i>	2
<i>Aspergillus versicolor</i>	2
<i>Talaromyces stipitatus</i>	1
<i>Talaromyces clemensii</i>	1
<i>Aspergillus pulvericola</i>	1
<i>Aspergillus flavus</i>	1
<i>Aspergillus candidus</i>	1
<i>Trichoderma harzianum</i>	1
<i>Aspergillus nidulans</i>	1



**Figura 10.** Tinción de lactofenol realizada algunos aislamientos fúngicos para su visualización al microscopio. A) *Aspergillus niger*, aislamiento BR-57 SDA A. B) *Trichoderma harzianum*, aislamiento BR-64 SDA. C) *Aspergillus candidus*, aislamiento BR-58 SDA B. Fotografías tomadas a 400x aumentos.

#### 4.1.3. Controles.

El cultivo del control negativo realizado a un filtro nuevo sin haber sido no presentó ningún crecimiento ni bacteriano ni fúngico. Además, tampoco se detectó la presencia de RNA vírico.

En cuanto al control de la sala antes de los pacientes, es decir, antes de comenzar la jornada de trabajo presentó las especies *Micrococcus luteus*, *Priestia megaterium* y *Niallia circulans*. Por otra parte, en el control de la sala entre pacientes se identificaron las especies *Massilia timonae*, *Roseomonas mucosa*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus aloeverae* y *Staphylococcus hominis*.

#### 4.2. Detección virus respiratorios.

La detección de virus respiratorios se realizó mediante RT-PCR a partir del RNA total extraído de cada fragmento de 1/8 de los filtros. De todas las muestras analizadas, se han obtenido 7 muestras positivas para el virus SARS-CoV-2, con un valor de CT promedio de 36,47, lo cual supone una carga viral baja, de acuerdo con la referencia utilizada para muestras nasofaríngeas [26] y un valor positivo para muestras de aerosoles [27]. En cuanto al control interno de RNAsa P humana, se han obtenido 9

resultados positivos, con un CT promedio de 37,83. Por otro lado, no se han obtenido resultados positivos para los virus Influenza A/B y VSR. En la Tabla 7 aparecen representadas las muestras positivas junto al CT obtenido.

**Tabla 7.** Muestras positivas para la detección de RNA de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR y sus valores de CT correspondientes.

Muestra	CT
BR-45	35,85
BR-47	35,45
BR-49	38,18
BR-50	31,55
BR-51	34,83
BR-53	39,79
H.V BR-1	39,45

### 4.3. Carga por filtro (UFC/filtro).

Para calcular la carga microbiana por filtro, se procedió de diferente manera en el caso de bacterias y de hongos por presentar diferente especificidad en el crecimiento en los medios de cultivo.

En el cálculo de la carga bacteriana se tuvo en cuenta que hay especies que crecen en todos los medios y otras que no lo hacen en ninguno. En primer lugar, se calculó el número de colonias que crecían en cada uno de medios de cultivo para bacterias (AS, AN y BHI). El medio que obtuvo el mayor número de colonias fue el BHI con una media de 29,6 UFC/filtro, seguido de AN (21.63 UFC/filtro) y de AS (17.5 UFC/filtro). Este dato se calculó a partir de la media del número de colonias crecidas en 1/8 de filtro del medio correspondiente y multiplicándolo por 8. Por otra parte, para hacer el cálculo de la carga microbiana total se utilizó solo el valor obtenido en BHI, ya que no se pueden sumar las colonias aisladas en cada medio porque hay especies que crecen en más de un medio y sobreestimaríamos la carga bacteriana.

Para el cálculo de la carga fúngica, dado que los hongos identificados son capaces de crecer en los cuatro medios utilizados, se sumó el número de colonias obtenidas en cada uno de los medios ( $1/8 AS + 1/8 AN + 1/8 BHI + 1/8 SAB$ ) y se multiplicó por 2. De este modo, se minimiza el error estadístico ya que el número de colonias obtenidas fue bajo, entre 0-1 por 1/8 filtro. La carga fúngica se estimó en 5,3 UFC/filtro.

Por lo tanto, la carga microbiana (bacterias y hongos) por filtro fue de 34,9 UFC/filtro. Este valor se divide entre el volumen de aire muestreado en  $m^3$  (un promedio de 0,415  $m^3$  por filtro), para obtener el valor de UFC por volumen de aire muestreado. De esta forma, se ha obtenido un promedio de 84,1 UFC/  $m^3$  (Tabla 8).

**Tabla 8.** Valores obtenidos de UFC, volumen aire muestreado y UFC/m<sup>3</sup> aire

Según el medio	Promedio UFC/filtro	Promedio volumen aire (m <sup>3</sup> )	Promedio UFC/m <sup>3</sup> aire
Bacterias AS	17,5	0,415	42,2
Bacterias AN	21,6	0,415	52
Bacterias BHI	29,6	0,415	71,3
Hongos (AS+BHI+AN+SBA)	5,3	0,415	12,8
Total (bacteria BHI + hongos)	34,9	0,415	84,1

#### 4.4. Resultados microbiológicos de los hospitales.

Se han recogido los resultados microbiológicos realizados por ambos hospitales sobre las muestras de lavado broncoalveolar recogidas en cada broncoscopia a cada paciente. En su gran mayoría los resultados obtenidos han sido microbiota orofaríngea habitual (sin especificar que especies son). Sin embargo, en los LBA de algunos pacientes se aislaron microorganismos patógenos. La Tabla 9 recoge las muestras recogidas de los pacientes que tuvieron diagnóstico de algún patógeno con su identificación y los resultados obtenidos tras cultivar los aerosoles en este estudio.

**Tabla 9.** Comparación de los resultados de los cultivos de hospitales y los resultados obtenidos del laboratorio.

Muestra	Resultados cultivo hospital		Resultados cultivo laboratorio	
	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos
BR-50		<i>Aspergillus sp</i>	<i>Priestia megaterium, Brachybacterium conglomeratum, Micrococcus sp, Staphylococcus saprophyticus, Bacillus tropicus, Kroppenstedtia pulmonis</i>	
BR-51		<i>Candida sp.</i>	<i>Brachybacterium conglomeratum, Micrococcus aloeverae, Micrococcus luteus, Bacillus tropicus, Bacillus velezensis, Brevibacterium pityocampae, Calidifontibacillus erzurumensis</i>	
BR-54		<i>Candida sp.</i>	<i>Staphylococcus sp, Micrococcus sp, Saccharothrix saharensis</i>	
BR-56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Moraxella osloensis, Micrococcus luteus, Dermacoccus nishinomiyaensis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus warneri, Nocardiosis synnemataformans</i>	<i>Talaromyces stipitatus</i>
BR-57	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Kocuria rhizophila, Stutzerimonas stutzeri, Micrococcus sp, Bacillus sp,</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BR-58	<i>Nocardia sp</i>		<i>Bacillus paramycoides, Micrococcus luteus, Staphylococcus caprae, Bacillus cereus, Lysinibacillus telephonicus</i>	<i>Aspergillus candidus</i>
BR-60	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Roseomonas mucosa, Bacillus sp, Sedimentimonas flavescens, Stutzerimonas stutzeri, Micrococcus luteus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BR-64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp, Micrococcus sp, Streptomyces sampsonii</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>

## 5. Discusión.

Este es el primer estudio que cuantifica e identifica la microbiota bacteriana y fúngica real presente en el ambiente de una sala mientras se realizan broncoscopias desde captadores unipersonales colocados sobre el personal clínico. No solo hemos colocado el captador sobre el profesional que realiza la intervención, si no que hemos fijado aproximadamente el mismo de flujo de aire en los captadores que el que entra en los pulmones normalmente (10 L/m) y durante el tiempo que el especialista realiza una sesión de broncoscopias ( $3 \pm 1$  h). De esta manera podemos extrapolar la cantidad de microorganismos que inhalaría el intervencionista durante el tiempo que realiza las broncoscopias en una de sus sesiones si no llevara puesto ningún tipo de protección, aproximadamente 34,9 UFC. El estudio de los microorganismos en los bioaerosoles es complejo debido a la falta de un método universal y aceptado para llevarlo a cabo [28]. Tradicionalmente, la exposición de esta práctica se había basado en las estimaciones del riesgo y en estudios epidemiológicos y, hasta la fecha, tan solo un estudio ha evaluado la microbiota presente en el ambiente durante la realización de broncoscopias a pacientes [29]. Sin embargo, Marchand et al realizan muestreos de la sala con un captador ciclónico de pared húmeda y un impactador en medios de cultivos, con rango de muestreo situado a 1,5 m desde la cabeza del paciente y la zona de respiración del personal sanitario que realiza la broncoscopia. Ellos obtienen una carga bacteriana (no miden carga fúngica) de 105-370 UFC/m<sup>3</sup> que comparada con la que se obtiene en este estudio (71,3 UFC/m<sup>3</sup>) es significativamente mayor. Esta diferencia puede ser debida a varios factores, como, por ejemplo, la falta de limpieza del hospital, las actividades humanas, los materiales orgánicos traídos del exterior, la eficiencia de la ventilación del hospital, etc. Sin embargo, también puede ser consecuencia de la falta de estandarización del método como hemos comentado anteriormente. En su estudio, utilizan un captador diferente con un flujo de volumen de aire mayor (28,3 L/m), durante 10 minutos y posicionado enfrente del paciente. Nuestro captador presenta un flujo de 10 L/m (más similar a la respiración humana), recogiendo aire durante todo el tiempo que dura la intervención y se encuentra en la solapa del médico que está posicionado detrás del paciente. Por tanto, este estudio se aproxima mejor al riesgo real al que se expone el personal sanitario, ya que se asemeja más a las condiciones bajo las cuales se inhalan los aerosoles desde la posición del intervencionista. Es el primer estudio que ha evaluado el riesgo biológico ocupacional del profesional sanitario utilizando muestreadores personales.

Se han analizado 29 muestras de aerosoles correspondientes a 27 sesiones de broncoscopias (70 pacientes), 1 control de sala vacía antes de empezar y 1 control entre pacientes. Del total de las muestras, se ha logrado identificar 64 especies microbianas. A la vista de los resultados obtenidos, se podría afirmar que existe una alta concentración microbiana en el ambiente cuando se realiza esta práctica médica, ya que los pacientes generan una gran cantidad de aerosoles [11]. Hasta hace unos

años, los pulmones sanos se habían considerado órganos estériles o libres de bacterias. No obstante, los pulmones se encuentran en contacto constante con el medio externo y con las vías respiratorias superiores, que son entornos ricos en microorganismos. Además, mediante técnicas moleculares tanto dependientes como independientes de cultivo se ha demostrado la presencia de un gran número de microorganismos, incluidos bacterias, hongos y virus en los pulmones de individuos sanos, conocidos colectivamente como microbioma pulmonar. La composición del microbioma pulmonar se encuentra en equilibrio dinámico entre la inmigración microbiana, impulsada por la inhalación, la microaspiración y la dispersión mucosa, y la eliminación microbiana, impulsada por la tos, el transporte mucociliar y los mecanismos inmunes [15]. Este hecho queda constatado por varios estudios independientes de cultivo, los cuales han demostrado que el microbioma pulmonar se parece más al microbioma de la orofaringe que a las comunidades microbianas del aire inhalado [30].

La mayoría de las especies microbianas encontradas en este estudio corresponden a microorganismos no patógenos que se encuentran normalmente formando parte de la microbiota normal de la piel, orofaringe y nasofaringe como las bacterias de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. También se han encontrado microorganismos aislados normalmente de medioambiente. A continuación, se discute los microorganismos encontrados en los aerosoles en base a su supuesto origen.

#### **Microbiota piel:**

De acuerdo con varios estudios, los géneros más abundantes de la microbiota normal de la piel son los géneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* y *Brevibacterium* [31]. En nuestros resultados se han encontrado bacterias de todos los géneros mencionados, destacando las bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*, siendo *Micrococcus luteus* la especie bacteriana que se ha aislado con mayor frecuencia. Se han encontrado bacterias del género *Staphylococcus* que son parte de la microbiota normal de las vías respiratorias superiores y de la piel como *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus* o *S. capitis*. Se ha identificado la especie *Cutibacterium acnes* (anteriormente *Propionibacterium acnes*), una de las bacterias más abundantes del microbioma de la piel y *Brevibacterium ptyocampae*, así como del género *Acinetobacter* (*A. Iwoffii*) y del género *Corynebacterium*, (*C. sanguinis* y *C. fournierii*).

La mayoría de estas bacterias se consideran comensales de la microbiota normal del ser humano, aunque algunas de ellas pueden actuar como patógenos oportunistas, en especial en individuos inmunocomprometidos. Este es el caso de *S. taiwanensis*, especie aislada de un hemocultivo [32], o *S. saprophyticus*, bacteria que coloniza el recto, perineo, uretra o cuello uterino y puede provocar infecciones de orina o, con menor frecuencia, pielonefritis aguda, uretritis, epididimitis y

prostatitis [33]. *C. sanguinis* o *Dermaococcus nishinomiyaensis* pueden producir bacteriemia [34],[35], o *C. fournierii* que puede producir vaginosis [36]. En cuanto a si alguna de estas bacterias puede producir infecciones del tracto respiratorio únicamente hemos encontrado referencias sobre patologías respiratorias producidas por *A. Iwoffii* [37] y *Kytococcus sedentarius* (neumonía hemorrágica) [38].

En general, todas las bacterias que se han aislado cuyo origen en principio es la piel no presentan patogenicidad en personal sano, aunque algunas de estas especies hayan sido reportadas como causantes de patologías en pacientes inmunodeprimidos.

### **Microbiota nasofaringe y cavidad oral:**

Los pacientes a los que se les realiza una broncoscopia se someten a la manipulación de las vías respiratorias superiores y como consecuencia tosen numerosas veces, especialmente cuando se inserta el broncoscopio. Como es bien sabido, la tos produce un elevado número de partículas de aerosol, por lo que parece lógico atribuir una proporción de los microorganismos encontrados en el aire al sistema respiratorio del paciente [29]. En la microbiota de la nasofaringe y cavidad oral existen una gran cantidad de especies como *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Neisseria* o *Moraxella*. En este trabajo hemos identificado algunas de ellas en los aerosoles recogidos por los captadores personales.

Dentro de las bacterias no patógenas hemos encontrado bacterias del género *Staphylococcus*, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis* o *Staphylococcus saprophyticus*, que, además de la piel, pueden colonizar las vías respiratorias superiores.

En cuanto a bacterias que podrían ser patógenas oportunistas o incluso consideradas patógenos primarios hemos encontrado ***S. aureus*** (patógeno primario), que produce bacteriemia, endocarditis infecciosa, infecciones en la piel y tejidos blandos, osteomielitis, infecciones pulmonares y meningitis entre otras [39]. El género ***Kocuria*** que se encuentran habitualmente como comensales en la piel, mucosas y cavidad oral. Sin embargo, se conocen 5 especies patógenas en este género, de las cuales se han logrado identificar 2 en nuestro trabajo, *K. rhizophila* y *K. rosea*. Estos patógenos oportunistas pueden provocar infecciones en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas previas causando peritonitis, bacteriemias asociadas a catéter, colecistitis, infecciones del tracto urinario o endocarditis [40]. El género ***Moraxella*** forma parte del microbioma normal de las vías respiratorias superiores, en los aerosoles hemos aislado *M. osloensis*, una bacteria generalmente inofensiva, aunque se han descritos casos de bacteriemia, meningitis, peritonitis, artritis, piomiositis, osteomielitis, endoftalmitis, uretritis, vaginitis y diarrea provocadas por este microorganismo oportunista [41]. ***Aerococcus viridans*** se asocia a infecciones oportunistas como artritis, bacteriemia, endocarditis y meningitis [42]. ***Kroppenstedtia pulmonis*** es una bacteria que se ha aislado de muestras

clínicas de pacientes con infecciones respiratorias como neumonía, lo que indica la capacidad de transmitirse vía aérea y colonizar el trato respiratorio [43].

Al comparar los resultados de los cultivos de los aerosoles con aquellos obtenidos en el laboratorio de microbiología del hospital correspondiente en donde se le analizaron las muestras de LBA por indicación médica, en ninguno de los filtros obtenidos de las sesiones de broncoscopia donde se había intervenido a un paciente con infección respiratoria bacteriana, se cultivó la misma especie en los aerosoles. Si bien es cierto que de los 70 pacientes solo 5 presentaron un cultivo positivo de LBA para patógenos bacterianos.

### **Bacterias medioambientales**

Se han encontrado bacterias consideradas típicamente como bacterias ambientales, debido a que se encuentran principalmente en el suelo, agua o aire. La sala en la que se realizan las broncoscopias no es una sala estéril, lo que puede explicar la presencia de bacterias del suelo debido a la resuspensión de estas en el aire al desplazarse por la sala. Se trata en su mayoría de bacterias formadoras de endosporas como formas de resistencia, lo que justificaría su presencia en las muestras aisladas, ya que estas esporas pueden haber impactado contra el captador, permitiendo su aislamiento. Algunos ejemplos de estas bacterias son las bacterias del género **Bacillus**, (*B. cereus*, *B. tropicus*, *B. velezensis*, *Bacillus licheniformis*) que pueden provocar bacteriemias, endoftalmitis, neumonías, meningitis, infecciones de piel y tejidos blandos (fascitis, mionecrosis) [44]. Otros ejemplos de bacterias formadoras de endosporas encontradas en este trabajo serían los géneros *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Calidifontibacillus*, *Terribacillus*, *Saccharothrix* o *Priestia*.

Otro género de bacterias aisladas de los aerosoles, que no forman endosporas, pero si esporas, ha sido el género *Streptomyces*. Se han hallado hasta 9 especies distintas: *S. olivaceus*, *S. sampsonii*, *S. alfalfae*, *S. swartloengensis*, *S. vinacedrapus*, *S. yangpuensis*, *S. atrovirens*, *S. speibonae* o *S. antibioticalis*. Los estreptomicetos habitan en el suelo y se caracterizan por su capacidad para producir metabolitos secundarios de interés en la clínica. No obstante, no se debe pasar por alto el papel de *Streptomyces* como patógeno oportunista ya que puede causar infecciones invasivas raras, como infecciones pulmonares, bacteriemia, abscesos cerebrales o infecciones de oído [45]. Debido a la falta de conocimiento de la relevancia clínica y a la falta de datos, es posible que las infecciones por *Streptomyces* estén siendo infradiagnosticadas. El aislamiento de estas bacterias es difícil debido a su tasa de crecimiento lento en cultivos, en contraposición a la microbiota respiratoria común, que crece rápidamente durante los cultivos rutinarios. Esto, unido a la presencia ubicua en la naturaleza de estreptomicetos y a su baja patogenicidad, contribuye a su bajo diagnóstico [45], [46]. Otros actinomicetos aislados en los aerosoles, también formadores de esporas ha sido el género

*Nocardiosis*, raramente encontrado como patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos [47].

Otras bacterias ampliamente distribuidas en la naturaleza que hemos encontrado en los bioaerosoles y que no forman endosporas ni esporas son, la bacteria *Stutzerimonas stutzeri* (anteriormente conocida como *Pseudomonas stutzeri*) y *Pseudomonas luteola*. Ambas pueden actuar como patógeno oportunista en inmunodeprimidos [48], [49].

En cuanto a los microorganismos aislados de los controles tomados en las habitaciones vacías hemos encontrado bacterias de origen medioambiental tanto bacterias Gram positivas: *Priestia megaterium* y *Niallia circulans* ambas productoras de endosporas, como bacterias Gram negativas como *Roseomonas* y *Massilia* que se aíslan normalmente de muestras ambientales como agua potable, suelo o aire. Y también especies aisladas de microbiota de la piel como *Micrococcus luteus*, *Micrococcus aloeverae* y *Staphylococcus hominis*.

#### **Hongos:**

En los aerosoles obtenidos, se han identificado únicamente hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Cladosporium* y *Trichoderma*. A nuestro entender, las esporas de estos hongos filamentosos probablemente se encontraban en el ambiente y han impactado contra el captador durante el muestreo. Esto es consistente con el tamaño de las esporas que presentan estos hongos. Las esporas de *Aspergillus* presentan un tamaño de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$ , las esporas de *Talaromyces* se encuentran entre 3-4  $\mu\text{m}$ , las de *Trichoderma* 3-6  $\mu\text{m}$  y las de *Cladosporium* alrededor de 3-7  $\mu\text{m}$ . Debido al cabezal  $\text{PM}_{10}$  utilizado, cuanto menor sea el tamaño de las esporas, más probabilidad habrá de captarlas.

Sin embargo, algunas de los géneros encontrados pertenecen al micobioma pulmonar. El género *Cladosporium* forma parte del core del micobioma pulmonar, junto con *Malassezia restricta*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus neoformans*, por lo que no se puede descartar que pertenezca al micobioma de algunos de los pacientes [17].

La razón por la cual no se han identificado levaduras provenientes del micobioma pulmonar puede ser debido a que no se han utilizado los medios adecuados, ya que estas levaduras presentan unos requerimientos nutricionales y de crecimiento muy específicos al tratarse de levaduras lipofílicas y en nuestro trabajo no se han empleados los medios adecuados para que se produzca su aislamiento.

Los cultivos para hongos de los LBA obtenidos en el laboratorio de microbiología del hospital correspondiente, fueron positivos en 6 de las 70 pacientes. En este caso, en uno de los aerosoles recolectados se aisló la misma especie que la obtenida en el LBA de uno de sus pacientes (muestra BR-

60), en concreto se aisló *Aspergillus niger*. Aunque para asegurar que la procedencia del aislado en el aerosol es el pulmón del paciente, sería necesario realizar un estudio molecular para tipar la cepa.

### **Virus**

A pesar de que ninguno de los pacientes fue diagnosticado de padecer una infección viral por ninguno de los virus estudiados (SARS-CoV-2, VSR e Influenza), hubo 8 muestras donde se detectó RNA viral de SARS-CoV-2. No sabemos si corresponde a virus viables, pero en cualquier caso pone de manifiesto el riesgo del personal laboral ya que los trabajadores sanitarios nunca saben lo que se esconde en los pulmones de sus pacientes, y por tanto se debe poner énfasis en la prevención y la protección.

Este estudio proporciona una evidencia clara de la presencia de microorganismos oportunistas cultivables procedentes del tracto respiratorio de los paciente en el aire de las salas de broncoscopia, así como de patógenos insospechados (SARS-CoV-2) lo que pone de manifiesto el riesgo biológico al que se expone el personal sanitario.

#### **5.1. Limitaciones del estudio**

Se han encontrado las siguientes limitaciones en nuestro estudio:

1. Se han llevado a cabo estudios dependientes de cultivo lo cual disminuye la cantidad de microorganismos que se pueden identificar.
2. Dificultad de aislamiento debido a la naturaleza de las muestras, problemas en la reproducción de las condiciones naturales de los microorganismos. Existen grupos de microorganismos que deben permanecer en equilibrio para poder sobrevivir (formación de biofilm, sintrofia, parasitismo...).
3. Desconocimiento de los requerimientos nutricionales y condiciones específicas de crecimiento, además de uso limitado de medios de cultivo.
4. El número de pacientes con infecciones pulmonares ha sido bajo para poder relacionar la presencia del patógeno en el aerosol con la infección del paciente.

## **6. Conclusiones y proyección futura**

1. En los aerosoles recolectados durante las broncoscopias se encuentran microorganismos viables que forman parte de la microbiota normal de la piel como *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *M. luteus*, *Cutibacterium acnes*, *Acinetobacter lwoffii*, *Brevibacterium ptyocampae*, *C. sanguinis*, *Dermaococcus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius*.
2. En los aerosoles recolectados durante las broncoscopias se encuentran microorganismos viables que forman parte de la microbiota de la orofaringe y vías respiratorias superiores como bacterias del género *Kocuria*, *Moraxella osloensis*, *Roseomonas mucosa* o *Aerococcus viridans*.
3. En los aerosoles recolectados durante las broncoscopias se pueden encontrar patógenos primarios como *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rosea* o *Kroppenstedtia pulmonis*.
4. En los aerosoles recolectados durante las broncoscopias se pueden encontrar patógenos oportunistas como *Moraxella osloensis*, *Roseomonas mucosa*, *Aerococcus viridans*, *Corynebacterium sanguinis*, *Brachybacterium conglomeratum*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter lwoffii*, entre otros.
5. En los aerosoles recolectados durante las broncoscopias se pueden encontrar patógenos no diagnosticados o sospechados previamente (SARS-CoV-2).
6. Las concentraciones microbianas durante las broncoscopias son más altas que durante los controles de salas vacías.
7. El personal sanitario que realiza las broncoscopias está expuesto a un alto riesgo biológico por lo que es recomendable el uso de EPIs.

### **6.1. Proyección futura**

- Realizar estudios independientes de cultivo como las técnicas de secuenciación masiva para poder identificar los microorganismos no cultivables que contienen los bioaerosoles y compararlos con los obtenidos en cultivo.
- Utilización de medios de cultivo específicos y condiciones de crecimiento para los microorganismos del microbioma pulmonar.
- Estudio bajo condiciones anaerobias, o con bajas concentraciones de oxígeno para poder identificar microorganismos anaerobios o microaerófilos en caso de que los hubiera.

## 7. Bibliografía.

- [1] R. Rai, S. El-Zaemey, N. Dorji, B. D. Rai, and L. Fritschi, "Exposure to Occupational Hazards among Health Care Workers in Low- and Middle-Income Countries: A Scoping Review," *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, Vol. 18, Page 2603, vol. 18, no. 5, p. 2603, Mar. 2021, doi: 10.3390/IJERPH18052603.
- [2] "Ministerio de Sanidad - Áreas - Salud ambiental y laboral - Salud laboral - Salud y Trabajo." Accessed: Jun. 17, 2024. [Online]. Available: <https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/saludLaboral/saludTrab/home.htm>
- [3] M. Campins Martí and S. Uriona Tuma, "Epidemiología general de las infecciones adquiridas por el personal sanitario. Inmunización del personal sanitario," *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 32, no. 4, pp. 259–265, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.EIMC.2014.02.002.
- [4] B. Ather, T. M. Mirza, and P. F. Edemekong, "Airborne Precautions," *StatPearls*, Mar. 2023, Accessed: Mar. 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531468/>
- [5] L. K. Norvihoho *et al.*, "Mechanisms controlling the transport and evaporation of human exhaled respiratory droplets containing the severe acute respiratory syndrome coronavirus: a review," *Environ Chem Lett*, vol. 21, no. 3, p. 1701, Jun. 2023, doi: 10.1007/S10311-023-01579-1.
- [6] C. C. Wang *et al.*, "Airborne transmission of respiratory viruses," *Science* (1979), vol. 373, no. 6558, Aug. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABD9149/ASSET/9C00F9CB-FB7F-479D-BF56-5719BE0142E9/ASSETS/IMAGES/LARGE/SCIENCE.ABD9149-F5.JPG.
- [7] J. W. Tang, R. Tellier, and Y. Li, "Hypothesis: All respiratory viruses (including SARS-CoV-2) are aerosol-transmitted," *Indoor Air*, vol. 32, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1111/INA.12937.
- [8] "Aerosoles | NIOSH | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades." Accessed: Mar. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/aerosols/>
- [9] K. Chen and C. Bai, "Occupational adverse effects and protective factors in bronchoscopy," *J Thorac Dis*, vol. 11, no. 4, p. 1651, Apr. 2019, doi: 10.21037/JTD.2019.03.73.
- [10] "Partículas." Accessed: Mar. 18, 2024. [Online]. Available: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/particulas.html>
- [11] J. Leal *et al.*, "Risk of transmission of respiratory viruses during aerosol-generating medical procedures (AGMPs) revisited in the COVID-19 pandemic: a systematic review," *Antimicrob Resist Infect Control*, vol. 11, no. 1, pp. 1–29, Dec. 2022, doi: 10.1186/S13756-022-01133-8/TABLES/5.
- [12] "Broncoscopia. Prueba diagnóstica. Clínica Universidad de Navarra." Accessed: Mar. 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/pruebas-diagnosticas/broncoscopia>

- [13] “Broncoscopia - Mayo Clinic.” Accessed: Mar. 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es/tests-procedures/bronchoscopy/about/pac-20384746>
- [14] “Definición de broncoscopia - Diccionario de cáncer del NCI - NCI.” Accessed: Jun. 17, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/broncoscopia>
- [15] J. G. Natalini, S. Singh, and L. N. Segal, “nature reviews microbiology The dynamic lung microbiome in health and disease,” *Nature Reviews Microbiology* |, vol. 21, pp. 222–235, 2023, doi: 10.1038/s41579-022-00821-x.
- [16] S. A. Whiteside, J. E. McGinniss, and R. G. Collman, “The lung microbiome: progress and promise,” *J Clin Invest*, vol. 131, no. 15, Aug. 2021, doi: 10.1172/JCI150473.
- [17] E. Rubio-Portillo *et al.*, “The Domestic Environment and the Lung Mycobion,” *Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 1717*, vol. 8, no. 11, p. 1717, Nov. 2020, doi: 10.3390/MICROORGANISMS8111717.
- [18] “Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades CDC.” Accessed: Jun. 17, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/Spanish/>
- [19] “Cytiva Filtros para muestreo de aire de cuarzo, categoría QM-A, forma circular Diámetro: 37 mm | Fisher Scientific.” Accessed: Jun. 18, 2024. [Online]. Available: <https://www.fishersci.es/shop/products/whatman-quartz-air-sampling-filters-grade-qm-a-circle-1/11340624?tab=alternates>
- [20] “BOE.es - DOUE-L-2008-81053 Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa.” Accessed: Mar. 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-81053>
- [21] “InstaGene™ Matrix | Bio-Rad.” Accessed: Mar. 07, 2024. [Online]. Available: [https://www.bio-rad.com/es-es/product/instagene-matrix?ID=6c2be54f-6c95-43de-8ce3-e9aee8229eeb&WT\\_mc\\_id=220128033438&WT\\_srch=1&WT\\_knsh\\_id=8dd8c562-f17c-49fa-bb53-aedd86a9a56e&gclid=Cj0KQCjwr82iBhCuARIsAO0EAZz83ffz6IBFpsOzADjvhTsrVnxA8ID2s15codb74s5gsbruNIRQYCcaAqzyEALw\\_wcB](https://www.bio-rad.com/es-es/product/instagene-matrix?ID=6c2be54f-6c95-43de-8ce3-e9aee8229eeb&WT_mc_id=220128033438&WT_srch=1&WT_knsh_id=8dd8c562-f17c-49fa-bb53-aedd86a9a56e&gclid=Cj0KQCjwr82iBhCuARIsAO0EAZz83ffz6IBFpsOzADjvhTsrVnxA8ID2s15codb74s5gsbruNIRQYCcaAqzyEALw_wcB)
- [22] “Kit de aislamiento de ADNg de plantas/hongos NZY.” Accessed: Apr. 18, 2024. [Online]. Available: <https://www.nzytech.com/en/mb177-nzy-plant-fungi-gdna-isolation-kit/>
- [23] “ExoProStar | Cytiva.” Accessed: Mar. 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.cytivalifesciences.com/en/es/shop/molecular-and-immunodiagnosics/pcr-cleanup-and-size-selection/illustra-exoprostar-p-00259>
- [24] “Kits de ARN viral QIAamp | Aislamiento de ARN viral | QIAGEN.” Accessed: Mar. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/es-us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-kits>
- [25] “COVID-19, gripe A/B, kit de RT-qPCR de un solo paso RSV Multiplex, IVD.” Accessed: Mar. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.nzytech.com/en/covid-19-flu-a-b-rsv-multiplex-one-step-rt-qpcr-kit-ivd/>

- [26] J. Reina, C. Morales, M. Busquets, and C. Norte, "Usefulness of Ct value in acute respiratory infections caused by respiratory syncytial virus A and B and influenza virus A (H1N1)pdm09, A (H3N2) and B," *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, vol. 36, no. 6, pp. 332–335, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.EIMCE.2018.04.004.
- [27] S. J. Stein, A. R. Ravnholdt, V. L. Herrera, D. N. Rivera, P. T. Williams, and J. L. Santarpia, "SARS-CoV-2 Aerosol and Surface Detections in COVID-19 Testing Centers and Implications for Transmission Risk in Public Facing Workers," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 20, no. 2, Jan. 2023, doi: 10.3390/ijerph20020976.
- [28] P. Kulkarni, P. A. Baron, and K. Willeke, "Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications: Third Edition," *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications: Third Edition*, Jul. 2011, doi: 10.1002/9781118001684.
- [29] G. Marchand, C. Duchaine, J. Lavoie, M. Veillette, and Y. Cloutier, "Bacteria emitted in ambient air during bronchoscopy—a risk to health care workers?," *Am J Infect Control*, vol. 44, no. 12, p. 1634, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.AJIC.2016.04.241.
- [30] K. Yagi, G. B. Huffnagle, N. W. Lukacs, and N. Asai, "The lung microbiome during health and disease," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms221910872.
- [31] A. L. Byrd, Y. Belkaid, and J. A. Segre, "The human skin microbiome," *Nature Reviews Microbiology* 2018 16:3, vol. 16, no. 3, pp. 143–155, Jan. 2018, doi: 10.1038/nrmicro.2017.157.
- [32] Y. T. Lin *et al.*, "Staphylococcus taiwanensis sp. nov., isolated from human blood," *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 72, no. 2, p. 005262, Feb. 2022, doi: 10.1099/IJSEM.0.005262/CITE/REWORKS.
- [33] S. Ehlers and S. A. Merrill, "Staphylococcus saprophyticus Infection," *Definitions*, Jun. 2023, doi: 10.32388/m8m71i.
- [34] D. Jaén-Luchoro *et al.*, "Corynebacterium sanguinis sp. nov., a clinical and environmental associated corynebacterium," *Syst Appl Microbiol*, vol. 43, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.syapm.2019.126039.
- [35] "Abscesos cerebrales por Dermacoccus nishinomiyaensis como primera manifestación de enfermedad granulomatosa crónica," *Arch Argent Pediatr*, vol. 121, no. 4, Aug. 2023, doi: 10.5546/aap.2022-02804.
- [36] K. Diop, F. Bretelle, D. Raoult, and F. Fenollar, "'Corynebacterium fournierii,' a new bacterial species isolated from the vaginal sample of a patient with bacterial vaginosis," *New Microbes New Infect*, vol. 18, pp. 6–7, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.nmni.2017.03.005.
- [37] E. M. Darby *et al.*, "Differential development of antibiotic resistance and virulence between Acinetobacter species," *mSphere*, May 2024, doi: 10.1128/MSPHERE.00109-24/SUPPL\_FILE/MSPHERE.00109-24-S0002.XLSX.
- [38] D. G. Rosado *et al.*, "ENDOCARDITIS POR KYTOCOCCUS SEDENTARIUS: A PROPÓSITO DE DOS CASOS," *Cirugía Cardiovascular*, vol. 27, no. 4, p. 165, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.CIRCV.2020.03.058.

- [39] "Infección por Staphylococcus aureus - PubMed." Accessed: Jun. 14, 2024. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28722898/>
- [40] C. Agudelo *et al.*, "Infección diseminada por Kocuria spp.: reporte de caso y revisión de la literatura," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, vol. 41, no. 1, pp. 39–44, 2021.
- [41] A. Yamada *et al.*, "Peritonitis due to Moraxella osloensis: A case report and literature review," *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 25, no. 12, pp. 1050–1052, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jiac.2019.05.018.
- [42] I. A. Ezechukwu and M. Singal, "Aerococcus Viridans: Case Report, Microbiology, and Literature Review," 2019, doi: 10.12659/AJCR.914866.
- [43] Bell Brent A *et al.*, "Kroppenstedtia pulmonis sp. nov. and Kroppenstedtia sanguinis sp. nov., isolated from human patients," vol. 109, pp. 603–610, 2016, doi: 10.1007/s10482-016-0663-z.
- [44] M. Aroca-Ferri, L. Suárez-Hormiga, M. Bolaños-Rivero, and J. Luís Pérez-Arellano, "Carta al Director," doi: 10.1128/AAC.32.5.642.
- [45] J. Liu, Z. Xu, Y. Bai, J. Feng, L. Xu, and F. Li, "Streptomyces albireticuli lung infection managed as a pulmonary air cyst: a case report and literature review," 2023, doi: 10.3389/fcimb.2023.1296491.
- [46] E. Gras *et al.*, "Identification of Streptomyces spp. in a Clinical Sample: Always Contamination? Results of a French Retrospective Study," doi: 10.1093/ofid/ofac271.
- [47] T. Ding, L.-J. Yang, W.-D. Zhang, and Y.-H. Shen, "The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity," 2019, doi: 10.1039/c9ra03579f.
- [48] J. Lalucat, A. Bennasar, R. Bosch, E. García-Valdés, and N. J. Palleroni, "Biology of Pseudomonas stutzeri," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 70, no. 2, pp. 510–547, Jun. 2006, doi: 10.1128/MMBR.00047-05.
- [49] M. Barry, "Pseudomonas luteola Bacteremia in Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus," *Case Rep Infect Dis*, vol. 2021, pp. 1–4, Aug. 2021, doi: 10.1155/2021/4051378.
- [50] "Impactos y mitigación: efectos respiratorios." Accessed: Jun. 18, 2024. [Online]. Available: [https://volcanoes.usgs.gov/volcanic\\_ash/respiratory\\_effects.html](https://volcanoes.usgs.gov/volcanic_ash/respiratory_effects.html)

Anexo 1. Géneros y especies bacterianas identificadas.

Género	Especie bacteriana	N.º Aislamientos
	<i>Micrococcus sp.</i>	24
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	22
	<i>Micrococcus aloeverae</i>	5
	<i>Bacillus sp.</i>	9
	<i>Bacillus tropicus</i>	7
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus paramycoides</i>	1
	<i>Bacillus cereus</i>	1
	<i>Bacillus velezensis</i>	1
	<i>Staphylococcus sp.</i>	18
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
	<i>Staphylococcus taiwanensis</i>	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	2
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
	<i>Staphylococcus caprae</i>	1
	<i>Staphylococcus equorum</i>	1
	<i>Staphylococcus capitis</i>	1
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
	<i>Staphylococcus pragensis</i>	2
	<i>Streptomyces sp.</i>	1
	<i>Streptomyces olivaceus</i>	1
	<i>Streptomyces sampsonii</i>	3
	<i>Streptomyces alfalfae</i>	1
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces swartloengensis</i>	1
	<i>Streptomyces vinacedrapus</i>	1
	<i>Streptomyces yangpuensis</i>	1
	<i>Streptomyces atrovirens</i>	1
	<i>Streptomyces speibonae</i>	1
	<i>Streptomyces antibioticalis</i>	1
	<i>Kocuria arsenatis</i>	1
<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria rhizopila</i>	1
	<i>Kocuria rosea</i>	1
<i>Dermacoccus</i>	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	2
<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	2
<i>Kroppenstedtia</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	1
<i>Nocardiopsis</i>	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	2
	<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	1
<i>Stutzerimonas</i>	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	2
<i>Roseomonas</i>	<i>Roseomonas mucosa</i>	2
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus telephonicus</i>	1
	<i>Priestia megaterium</i>	5
	<i>Priestia endophytica</i>	1
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	2
	<i>Saccharothrix xinjiagensis</i>	1
<i>Saccharothrix</i>	<i>Saccharothrix saharensis</i>	1
	<i>Corynebacterium sanguinis</i>	1
<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium fournieri</i>	1

<i>Cutibacterium</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	1
<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium conglomeratum</i>	2
	<i>Brevibacterium pityocampae</i>	1
<i>Methabacillus</i>	<i>Methabacillus endolithicus</i>	1
	<i>Methabacillus schmidteae</i>	2
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4
<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	1
<i>Neobacillus</i>	<i>Neobacillus niacini</i>	1
<i>Kytococcus</i>	<i>Kytococcus sedentarius</i>	1
<i>Brachybacterium</i>	<i>Brachybacterium conglomeratum/paraconglomeratum</i>	2
	<i>Bacillus zanthoxyli/Priestia veravalensis</i>	2
<i>Psychrobacter</i>	<i>Psychrobacter articus/proteolyticus</i>	1
<i>Calidifontibacillus</i>	<i>Calidifontibacillus erzurumensis/Bacillus velezensis</i>	1
<i>Terribacillus</i>	<i>Terribacillus goriensis</i>	2
	<i>Sedimentomonas flavescens/Paracoccus hiujuniae</i>	1
	<i>Agrococcus/Microbacterium</i>	1

---





# CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO COIR TFG/TFM

Se otorga a:

Lorena Alcalde Pérez, con DNI: 49749291S

Por realizar la capacitación previa al inicio del procedimiento de obtención del  
CÓDIGO DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE (COIR), con una puntuación de 10 / 10.

FIRMADO POR:  
ALBERTO PASTOR CAMPOS  
OFICINA DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y  
TRANSFERENCIA  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

12/12/2023



## INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 13/12/2023

Nombre del tutor/a	Consuelo Ferrer Rodríguez
Nombre del alumno/a	Lorena Alcalde Pérez
Tipo de actividad	Adherido a un proyecto autorizado
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	Estudio de bioaerosoles generados en entornos hospitalarios
Evaluación de riesgos laborales	No solicitado/No procede
Evaluación ética humanos	No solicitado/No procede
Código provisional	231212005432
Código de autorización COIR	<b>TFG.GBI.CFR.LAP.231212</b>
Caducidad	2 años

Se considera que la presente actividad no supone riesgos laborales adicionales a los ya evaluados en el proyecto de investigación al que se adhiere. No obstante, es responsabilidad del tutor/a informar y/o formar al estudiante de los posibles riesgos laborales de la presente actividad.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Estudio de bioaerosoles generados en entornos hospitalarios** ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos  
Jefe de la Oficina de Investigación Responsable  
Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/solicitud-de-evaluacion/tfg-tfm/>

