

EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA EN UN AULA DE FARMACIA PRE Y POST PRIMERA OLEADA DE LA PANDEMIA COVID-19

Evolution of Microbiota in a Pharmacy Classroom Pre and Post the First Wave of the COVID-19 Pandemic

María ALONSO; Pedro F. MATEOS; Fernando SÁNCHEZ-JUANES

Facultad Farmacia/CIALE. Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental Lab 213. Universidad de Salamanca. 37007-Salamanca. España
Correo-e: pfmg@usal.es

RESUMEN: La microbiota varía con el tiempo, por ello durante el curso académico 2019-20, coincidiendo con la pandemia SARS-COV-2, se evaluó la evolución de la misma en un aula de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca con la espectrometría de masas *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*. Además, se comparó con otros estudios, así como con las directrices de la Comisión de la Comunidad Europea de calidad del aire de interiores.

Tras el estudio se concluyó que dicha aula presentaba un grado de contaminación muy bajo, y que la mayoría de la microbiota era saprofítica. Asimismo, de forma general se puede concluir que de forma cuantitativa los hongos y de forma cuali-cuantitativa las bacterias no presentaban un riesgo para la salud.

Por otro lado, entre las variables más importantes encontramos la afluencia de personas, la frecuencia de limpieza y la ventilación. Finalmente, este estudio recoge la poca normativa que existe sobre la calidad del aire en interiores no industriales y no hospitalarios.

Palabras clave: MALDI-TOF; microbiota; pandemia; calidad microbiológica del aire de interiores.

ABSTRACT: Microbiota varies over time, therefore during 2019-20 academic year, coinciding with the SARS-COV-2 pandemic, the evolution of it was evaluated in a classroom of the Faculty of Pharmacy of the University of Salamanca with mass spectrometry Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight. In addition, this study was compared with others, as well as with guidelines of the European Community Commission on indoor air quality.

After the study, it was concluded that said classroom had very low contamination degree and that most of microbiota was saprophytic. Furthermore, it can be concluded that quantitatively fungi and quantitatively and qualitatively the bacteria did not present a health risk.

On the other hand, the most important variables that were found were the influx of people, the frequency of cleaning and ventilation. Finally, this study shows off the lack of regulation that exists on air quality in non-industrial and non-hospital interiors.

Keywords: MALDI-TOF; microbiota; pandemic; microbiological indoor air quality.

(*) Ver la versión extendida de este artículo en el siguiente enlace: <https://documentomovil.usal.es/visor.php?v=poster&f=94778905#1>

1. INTRODUCCIÓN

Hoy más que nunca podemos hacer nuestra la frase “la vida es cambio”. Este último año ha habido tantas modificaciones que, llegados a este punto, debemos plantearnos si también la microbiota ambiental ha variado. Para percibirlo, este proyecto se ha desarrollado en un periodo de un curso académico.

Atendiendo a esta hipótesis el presente trabajo aprovecha las ventajas de la espectrometría de masas (EM) *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) para la identificación de la microbiota, que nos permite evaluar la evolución de la misma de forma rápida y precisa. Este trabajo presenta una gran diferencia con el resto, que solo la evalúa de forma cuantitativa o cualitativa, pero mediante pruebas bioquímicas, no moleculares.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar cómo ha evolucionado, antes y después de la primera oleada de la pandemia COVID-19, la microbiota de interior de un aula de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y comparar con

otros estudios realizados, junto con las directrices de la Comisión de la Comunidad Europea (CCE) de calidad microbiológica del aire de interiores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Área de estudio*

La zona de estudio agrupa el aula VI de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y el Laboratorio de prácticas de Microbiología B06 del Edificio Departamental. El aula consta de una capacidad máxima de 120 alumnos, sin ventanas, 2 accesos y las superficies se limpian regularmente. En el aula se tomaron muestras durante 3 días diferentes (19/10/2019, 28/02/2020 y 07/10/2020), mientras que en el laboratorio fue un único día (19/11/2020), durante periodos de actividad lectiva.

3.2. *Medio de cultivo*

El medio de cultivo utilizado fue agar nutritivo al 1,7 % y PCA (Atlas, 2010).

3.3. *Toma de muestra*

La toma de muestra se llevó a cabo con un aspirador de aire Microflow para placas Rodac de 6 cm previamente desinfectada la placa metálica con etanol 70° y esterilizada con luz UV.

Las muestras se tomaron a la altura de las mesas utilizando 6 placas: 2 en la mesa del profesor (Profesor 1 y 2), otras 4 en la zona de los alumnos: 2 en mitad del aula (Alumno mitad 1 y 2) y finalmente otras 2 en el acceso de la puerta trasera (PT 1 y 2).

Los valores óptimos de flujo (1,5 L/s), tiempo (5 min), incubación (28 °C, durante 2 días) y medio de cultivo (agar nutritivo 1,7 %) establecidos se basaron en un ensayo previo realizado el 19/10/2019 y en base a las directrices de la CCE (Wanner y Gravesen, 1993). En dicho ensayo, se probaron diferentes tiempos de muestreo (5 min, 7,5 min y 10 min), temperaturas de incubación (28 °C y 37 °C) y medios de crecimiento [agar nutritivo y *Plate Count Agar* (PCA)] (Atlas, 2010).

3.4. *Identificación de microorganismos mediante EM MALDI-TOF*

Se trata de una herramienta de diagnóstico para identificación y caracterización basado en la detección de la masa de proteínas ribosomales de los microorganismos. Se usó el método directo.

Se marcaron las unidades formadoras de colonias (UFC) a identificar, que estaban lo suficientemente aisladas para una correcta identificación. Utilizando una punta desechable de micropipeta, se pusieron por duplicado sobre la placa metálica. A cada celda se le añadió 1 μ L de ácido fórmico y, tras dejarlo evaporar, se añadió 1 μ L de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, HCCA), dejándose secar la placa. Una vez secas todas las celdas, se introdujo dentro del EM MALDI-TOF.

La obtención de datos en forma de *score* permite determinar la probabilidad de que la colonia puesta en la celda se corresponda con una entrada en la base de datos del EM MALDI-TOF.

3.5. *Análisis de los datos*

El *software* es MALDI Biotyper (*Bruker Daltonics*) y la base es la 3.0 con 4111 entradas de microorganismos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. *Análisis de la carga microbiana (bacterias y hongos)*

La primera toma de muestras (19/10/2019) se dedicó a poner a punto el resto de toma de muestras. Por consiguiente, solo consideramos aquellas placas que coincidían con los parámetros óptimos que se utilizaron en el resto de experimentos, descartando el resto de placas (Figura 1).

El 28/02/2020 se detectó la mayor cantidad de UFC/m³ de bacterias y hongos (Figura 1). El máximo para bacterias se obtuvo en la posición “Profesor 2”, 500 UFC/m³. Podría deberse a la presencia de basura en la papelera ubicada junto a la mesa del profesor. Además, tras la reincorporación a las aulas (07/10/2020), este elemento continuaba presente en la misma ubicación, aunque vacía, y como consecuencia la carga microbiana descendió a 22 UFC/m³.

Tras la primera oleada (07/10/2020) las UFC/m³ descendieron en bacterias y hongos. Podría atribuirse a protocolos de desinfección y/o a la menor ocupación de las aulas. Adicionalmente, hay estudios que afirman que la ventilación modifica la microbiota (Meadow *et al.*, 2014). Sin embargo, y en nuestro caso, la ventilación no pudo realizarse al no existir ventanas en esta aula (Universidad de Salamanca, 2020).

Por otro lado, el día 07/10/2020 se detectó la menor presencia de bacterias en los entornos “Alumno mitad 1” y “PT 2”, con 14 UFC/m³. Este día también coincide con la menor manifestación de hongos (0 UFC/m³).

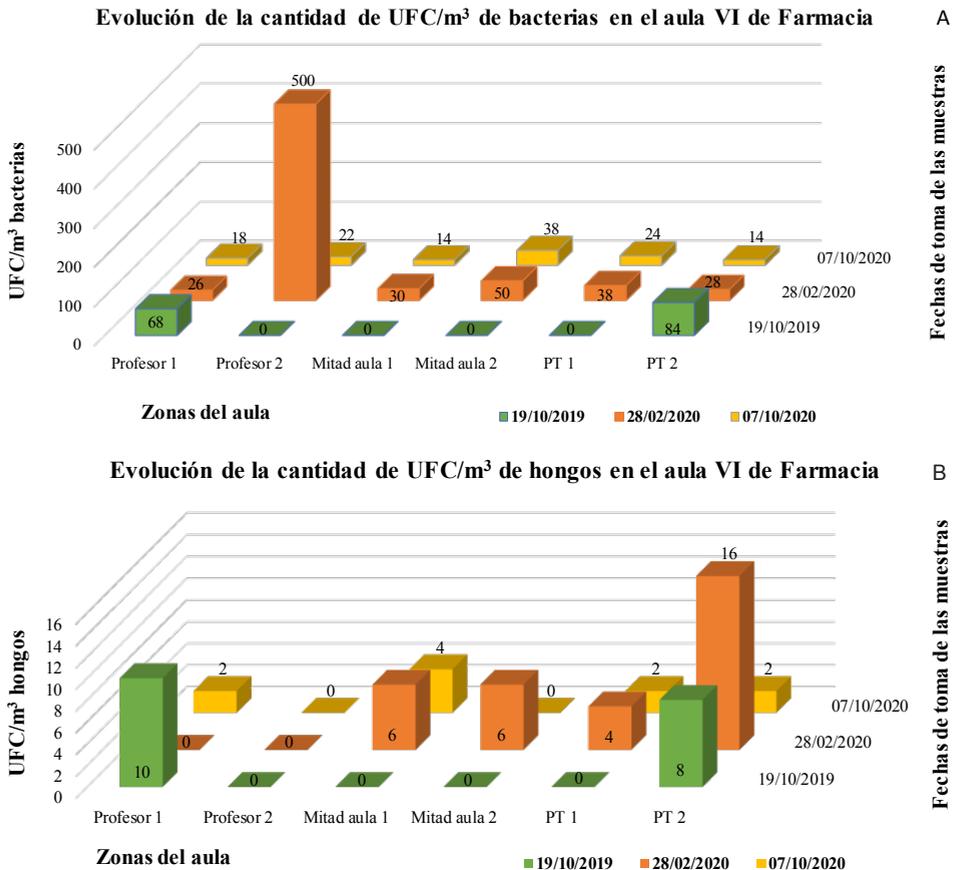


Figura 1. Evolución de la cantidad de UFC/m³ de bacterias en el aula VI de Farmacia (A).
 Evolución de la cantidad de UFC/m³ de hongos en el aula VI de Farmacia (B).

4.2. *Análisis de la biodiversidad bacteriana*

Se identificaron mediante EM MALDI-TOF un total de 124 colonias, de las cuales se pudo identificar certeramente el género del 32,26 % de las muestras y un 16,13 % de forma probable. Sin embargo, este porcentaje bajó al 4,84 % cuando se trató de identificar a nivel de especie. Aquellos que no pudieron ser correctamente identificados (46,77 %) pudo deberse a que la muestra era insuficiente, cultivo mixto y/o que el perfil obtenido no se encontrase en la base de datos.

Un dato a resaltar es que el 40,91 % (27/66) del total de muestras identificadas con *score* superior a 1,700 corresponden a la especie *Micrococcus luteus* (Figura 2). Ante este hecho, se estableció la hipótesis de la relación con las prácticas de laboratorio de la asignatura de Microbiología, ya que es una de las especies utilizadas. Para confirmarla, se analizó la presencia de bacterias en el laboratorio de prácticas, identificando como especie dominante *Kocuria rhizophila*, especie también identificada en el aula, pero no había *Micrococcus luteus*. Por otro lado, *Micrococcus* es un género que no esporula, pero es muy abundante en la piel y mucosas de humanos y siendo Gram+ puede perdurar más tiempo por su estructura, explicando su presencia en las 3 sesiones y su poca distorsión en el estudio.

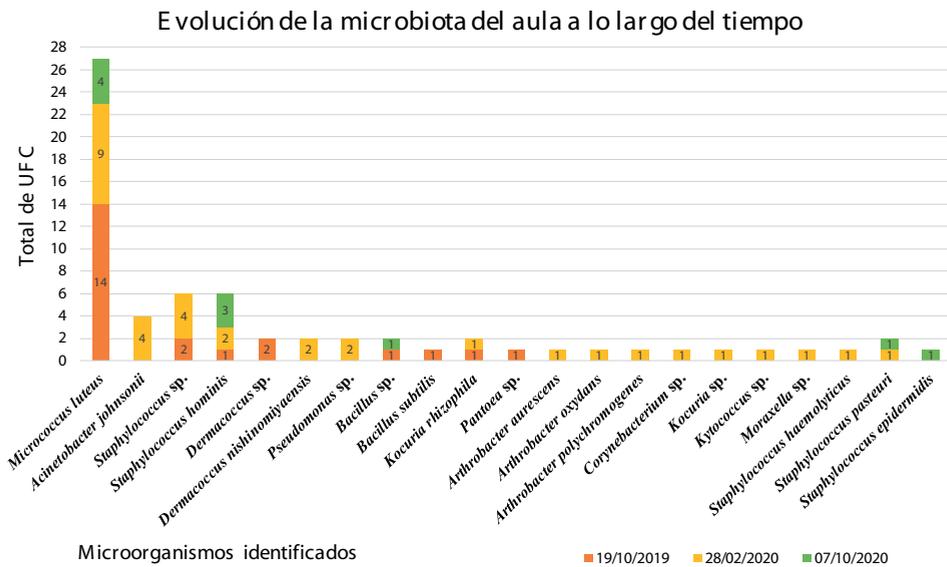


Figura 2. Evolución de la microbiota del aula a lo largo del tiempo.

4.3. Clasificación

4.3.1. Árbol filogenético

Destaca el orden *Micrococcales*, que es el más extenso con al menos 7 especies diferentes, seguido por *Caryophanales*, que tiene 5 especies dentro de las especies de bacterias identificadas con un *score* superior a 1,700 (Reimer *et al.*, 2015; Reimer *et al.*, 2019).

4.3.2. Clasificación según riesgo de infección

Ninguna de las especies identificadas aparecen en el RD 664/1997 (Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. *Boletín Oficial del Estado*, n.º 124, 24 de mayo de 1997). No obstante, tal y como se indica en el artículo 3-A del Anexo II del citado RD, “su no inclusión no les clasifica automáticamente en la tipología de grupo 1 (riesgo bajo)” (Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. *Boletín Oficial del Estado*, n.º 124, 24 de mayo de 1997). De hecho, tras una investigación bibliográfica la gran mayoría de ellos pueden ser patógenos oportunistas (Peřkala *et al.*, 2018; Joron *et al.*, 2019; Fariña *et al.*, 2013).

4.3.3. Clasificación según tinción de Gram y capacidad de esporular

El 87,88 % del total de las muestras son Gram+, mientras que únicamente el 12,12 % son Gram-. Dentro de los Gram+ solo el 4,55 % son esporulados y no hay ningún Gram- esporulado. La prevalencia de las bacterias Gram+ puede deberse a la resistencia conferida por la diferencia en la composición y estructura de la pared celular y la mayor cantidad de peptidoglicano (Soto *et al.*, 2009).

4.4. Factores que varían la carga microbiana

4.4.1. Tránsito y presencia estudiantil en el entorno de estudio

Atendiendo a los grupos que utilizan/utilizaban de manera habitual esta aula y sabiendo el número de integrantes, podemos estimar aproximadamente el tránsito de personas por día y semana del aula.

Con el objetivo de extraer los datos más fidedignos, se ha llevado a cabo la comparativa de las zonas “Profesor 1” y “PT 2”, las más alejadas del aula (Figura 3). Hay una clara evidencia de una relación proporcional entre la cantidad de las UFC/m³ de bacterias y hongos con el total de personas que pasan durante la semana. Dicha variable influye más en la concentración de bacterias, lo cual se refleja en otros estudios (Soto Pino *et al.*, 2009).

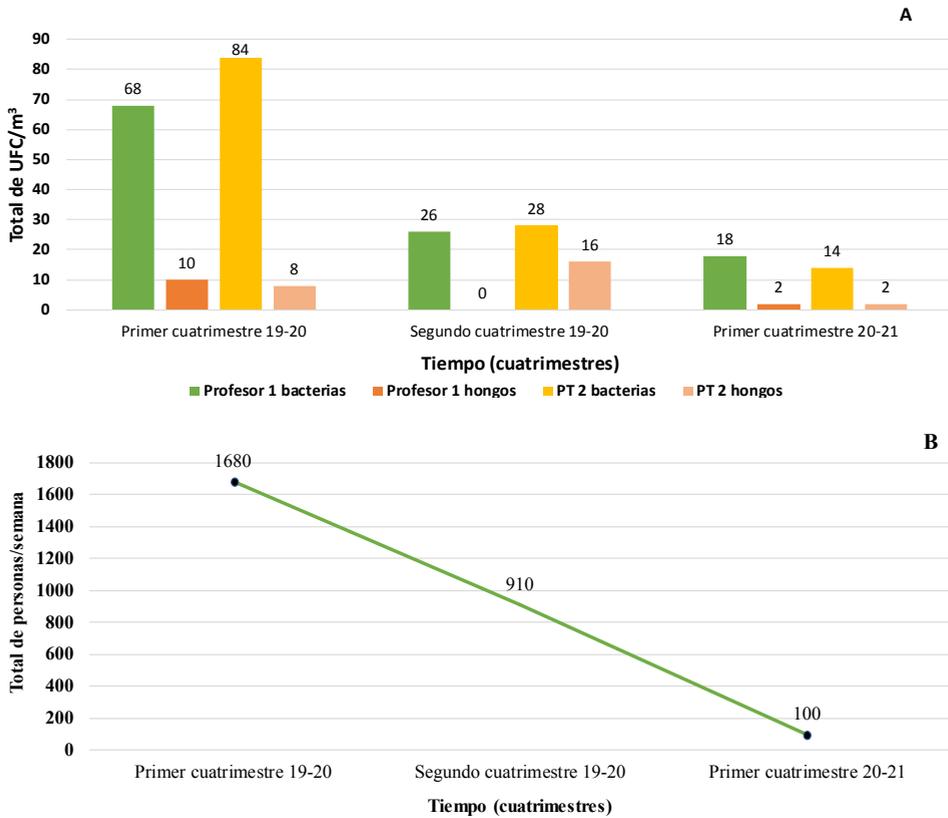


Figura 3. Evolución de la carga microbiana en las zonas “Profesor 1” y “PT 2” según tipo de microorganismo (A). Total de personas por semana que transita por el aula (B).

4.4.2. Ventilación

La Facultad de Farmacia es uno de los edificios con peor ventilación de la Universidad de Salamanca, ya que el aire recircula, sin tomar aire del exterior, ni ventanas (Universidad de Salamanca, 2020). Esto puede justificar que, pese a la reducción de aforo del 94,05 % respecto a antes de la pandemia, la concentración de UFC/m³ no ha disminuido tanto como se podría esperar.

4.4.3. Limpieza de las aulas

La desinfección de las aulas se realiza con lejía al 0,1 %, alcohol de 70° para la mesa del profesor, escobas y retirada de contenido de papeleras. La mayor diferencia entre el periodo previo y posterior a la primera oleada es la mayor frecuencia de limpieza.

4.5. Legislación

Actualmente, no existe una legislación sobre la calidad microbiológica del aire en España, aunque AENOR tiene una norma (UNE 171330-1:2008) (AENOR, 2008) que trata sobre la calidad ambiental de interiores. Sin embargo, la CCE ha planteado cinco categorías diferentes para evaluar el nivel de contaminación microbiana en el aire interior de entornos no industriales. Estas categorías se basan en el rango de valores obtenidos en ambientes interiores y no en una evaluación de riesgos para la salud (Wanner *et al.*, 1994).

Finalmente, determinamos la calidad microbiológica del aire según los criterios establecidos en las directrices vigentes. Se aprecia una sutil diferencia entre el grado de contaminación del aire antes de la pandemia en comparación con la muestra de octubre de 2020 (pasa de un grado de contaminación bajo a muy bajo).

4.6. Comparativa

Los datos de nuestro estudio se cotejaron con los resultados obtenidos por la Universidad de Murcia (Soto Pino *et al.*, 2009) y de Jimma, Etiopía (Hayleeyesus y Manaye, 2014), cuyo procedimiento es similar al nuestro, excepto en el método de identificación, ellos utilizaron pruebas bioquímicas, nosotros moleculares.

En todos los casos, los géneros predominantes son *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Adicionalmente, en estos dos estudios destaca la presencia de *Streptococcus*. En nuestro ensayo no ha sido posible su identificación al no trabajar a la temperatura ideal de crecimiento de este género, es decir, temperaturas cercanas a los 37 °C (BacDive; BacDive, 2015). Debido a ello no se puede descartar su presencia en el entorno. En general, en los estudios predominan las bacterias Gram+ que generalmente pertenecen a la microbiota saprofítica de nuestras mucosas y piel. Por otro lado, dentro de los Gram- no hay un género compartido por los tres estudios, por ejemplo, el género *Pseudomonas* solo se identificó en nuestro estudio y en el de Murcia.

Adicionalmente, al compartir individuos de características similares se analizó con un mayor detalle el estudio realizado por la Universidad de Murcia. Ambos aislaron los siguientes géneros en una proporción similar: *Acinetobacter*,

Pseudomonas y *Corynebacterium*. Además, se observó la asociación directa entre el número de ocupantes y la concentración bacteriana, aumentando la carga microbiana (Figura 3). Igualmente, revelaron una concentración microbiana aérea con un nivel de contaminación bajo-intermedio según las categorías establecidas por la CCE en 1993 (Wanner *et al.*, 1994). Sin embargo, el estudio de la Universidad de Jimma clasificó la calidad microbiológica del aire en un grado de contaminación alta (Hayleeyesus y Manaye, 2014).

5. CONCLUSIONES

El aula VI de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca cumple el estándar a nivel europeo presentando un grado de contaminación muy bajo en general.

Una gran parte de las bacterias identificadas forman parte de la microbiota saprofítica de nuestra piel, mucosas y tracto respiratorio superior, con predominancia de Gram+, que de forma general no presentan un peligro para la salud. Además, el hecho de que no haya una gran concentración de bacterias y hongos, *per se*, también supone un indicador de que no hay un riesgo sanitario elevado.

Una de las variables principales de cambio en la microbiota es la afluencia de personas junto con la frecuencia de limpieza y ventilación. No obstante, no se aprecian diferencias en cuanto a concentración o evolución de la microbiota entre la zona del profesor y alumnos.

El control de la carga microbiana del aire es un factor importante para establecer por cualquier institución. Sin embargo, este estudio también refleja que hay poca normativa que regule la calidad microbiológica del aire en interiores no industriales y no hospitalarios.

AGRADECIMIENTOS: A Marta Trujillo Toledo por la ayuda proporcionada para realizar este estudio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. UNE 171330-1:2008, Calidad ambiental en interiores. Parte 1: Diagnóstico de Calidad ambiental interior, de julio de 2008; 2008.
- Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 4 th ed. Boca raton: CRC press; 2010.
- BacDive The Bacterial Diversity Metadatabase [Internet]. Alemania; 2015 [citado 19 mar 2021]. Disponible en: <https://bacdive.dsmz.de/team>.
- BacDive The Bacterial Diversity Metadatabase [Internet]. Streptococcus Sp. 59015 | DSM 20379| BacDiveID:14738. Braunschweig [citado el 19 mar 2021]. Disponible en: <https://bacdive.dsmz.de/strain/14738>.

- Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R *et al.* *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Rev Chil Infectol.* 2013; 30(5):480-488.
- Hayleeyesus SF, Manaye AM. Microbiological quality of indoor air in university libraries. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4th ed (Suppl 1):S312-17.
- Joron C, Roméo B, Le Flèche-Matéos A, Rames C, El Samad Y, Hamdad F. *Dermaococcus nishinomiyaensis* as a cause of persistent paediatric catheter-related bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(8):1054-1055.
- Meadow JF, Altrichter AE, Kembel SW, Kline J, Mhuireach G, Moriyama M *et al.* Indoor airborne bacterial communities are influenced by ventilation, occupancy, and outdoor air source. *Indoor Air.* 2014; 24(1):41-48.
- Pękala A, Paździor E, Antychowicz J, Bernad A, Głowacka H, Więcek B *et al.* *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture.* 2018; 486:285-289.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Boletín Oficial del Estado, n.º 124, de 24 de mayo de 1997.
- Reimer L, Vetcinova A, Sardà Carbasse J, Söhngen C, Gleim D, Ebeling C *et al.* BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Research.* 2019; 47(D1):D631-36.
- Soto Pino T, García Murcia R, Franco Sánchez A, Vicente Soler M, Cansado Vizoso J, Gacto Fernández M. Indoor airborne microbial load in a Spanish University (University of Murcia, Spain). *Anales de Biología.* 2009; 31(31):109-115.
- Universidad de Salamanca. Instrucciones de ventilación y climatización de espacios para evitar la propagación del SARS-COV-2; 2020.
- Wanner H-U, Gravesen S. Biological Particles in Indoor Environment. Report 12. Commission of the European Communities. Luxembourg; 1993.

