



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE SARS-COV-2 EN BIOAEROSOLES Y DE CO2 EN INTERIORES

Alexander Einschütz López

Máster Universitario Biotecnología aplicada

(Especialidad/Itinerario *Sanitario*)

Centro de Estudios de Postgrado

Año Académico 2021-22

Relación entre los niveles de SARS-CoV-2 en bioaerosoles y de CO2 en interiores.

Alexander Einschütz López

Trabajo de Fin de Máster

Centro de Estudios de Postgrado

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2021-22

Palabras clave del trabajo:

SARS-CoV-2, Bioaerosol, CO2, Interiores

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Josep Mercader Barceló

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Índice

Introducción	3 - 6
Recolección, almacenaje y procesado de muestras	6 - 10
Recolección de datos ambientales	11
Análisis y resultados	11 - 19
Discusión	19 - 22
Bibliografía	23 - 25
Anexo	25 – 27

Introducción

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es responsable de la pandemia mundial en curso, y es el causante de la enfermedad COVID-19.

La epidemia de SARS-CoV-2 comenzó a fines de diciembre de 2019 en Wuhan, China, y desde entonces ha afectado a la mayor parte del mundo (Tang et al., 2020). El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el brote de COVID-19 como una emergencia de salud pública de importancia internacional. A día 8 de Julio del 2022, en España se han notificado 19 973 615 infectados por SARS-CoV-2, de los cuales 108 730 han fallecido. (*Ministerio de Sanidad - Profesionales - Situación Actual Coronavirus*, n.d.)

La principal forma de contagio del SARS-CoV-2 es de persona a persona mediante bioaerosoles. Los bioaerosoles son aquellos aerosoles que se generan por la actividad de un ser vivo, en este caso lo generamos nosotros por nuestra respiración o por gestos como estornudar o toser. Los bioaerosoles a diferencia de las gotículas respiratorias, presentan un tamaño bastante más reducido (inferior a 5 μm) y tienen una gran variedad en el tamaño. Pero para la transmisibilidad del SARS-Cov-2 nos preocupan sobre todo las de menor tamaño (alrededor de 0,3 μm) debido a que son capaces de permanecer un mayor tiempo en suspensión (Schade et al., 2021; van Doremalen et al., 2020; Vargas Marcos et al., 2020).

A lo largo de 2020 y 2021, se han ido tomando muchas medidas preventivas con el fin de reducir el contagio del SARS-CoV-2, entre las que destacan están el uso de mascarillas, la correcta ventilación de los interiores y el distanciamiento social. Estas medidas fueron tomadas teniendo en cuenta varios estudios científicos entre los que están los estudios de de Myatt et al., (2004), de Rudnick & Milton, (2003), de Liao et al., (2005),

En los estudios de Myatt et al., (2004) y de Rudnick & Milton, (2003) se demostró que en ambientes cerrados de oficina, cuando hay un incremento de al menos 100 PPM de CO₂ respecto al CO₂ exterior se incrementa el riesgo de contagiarse de enfermedades respiratorias comunes, el incremento de CO₂ necesario para determinar el riesgo de

contagiarse dependerá de la enfermedad, de su resistencia y virulencia, entre otros factores. Liao et al., (2005) pudo demostrar que para enfermedades respiratorias muy contagiosas como son el virus de la influenza o el virus SARS, un incremento de la aportación de aire del exterior disminuye un poco la transmisibilidad, pero no es suficiente para controlar estas enfermedades, por lo que sería necesario tomar medidas adicionales.

Una medida que se ha tomado para prevenir el contagio de COVID19 en interiores es mantener los interiores bien ventilados y por debajo de los 800 PPM de CO₂, este valor es a partir del cual un 1% del aire que respiramos proviene del aire expirado de otra persona (Schade et al., 2021).

En septiembre de 2020, muchos colegios e instituciones educativas plantearon reabrir las puertas a las calases presenciales, para comprobar si las medidas que se fueron tomando e implementando tenían el efecto esperado se realizaron varios estudios centrados en ellos. Di et al., (2020) realizó un estudio en un colegio ubicado en Italia y se aseguró que se mantenían todas las medidas de prevención que el gobierno italiano propuso, aun así, los resultados fueron bastante negativos. De las 11 aulas estudiadas, 6 tuvieron un promedio de CO₂ superior a los 1000 PPM, además, encontró concentraciones de CO₂ superiores a los 1000 PPM en clases de 12 personas (Clase 5 – 1097 PPM) como de 21 (Clase 4 – 1010 PPM) respaldando la hipótesis de que el número de personas no es el único factor que explica el comportamiento del CO₂.

Villanueva et al., (2020) realizó un estudio similar en Ciudad Real, donde estudió 7 colegios y diferentes niveles educativos, desde pre-escolar hasta secundaria. El 26% de las clases estudiadas (5) presentaba problemas de ventilación causando que la concentración de CO₂ fuera superior a los 700 PPM recomendados, además pudo notar que las clases de pre-escolar eran las que más contaminación por partículas en suspensión tenían, y que las clases de secundaria tenían la peor ventilación. Como conclusiones comenta que aunque las medidas sirvan para mantener la mayoría de las clases seguras, para aquellas que no lo fueran debían aplicarse medidas adicionales para asegurarnos de crear un ambiente educativo seguro.

Otro lugar muy empleado y transitado son los transportes públicos. Baselga et al., (2022) realizó un estudio en los metros de Zaragoza. Durante el periodo del estudio se aplicaban tres medidas que permitían que el metro fuera un lugar bastante seguro, la primera era la restricción del aforo, la segunda es el uso de mascarilla y la tercera era el uso de filtros Coarse 75%, mejores que los empleados normalmente. Las conclusiones a las que llegaron fueron que manteniendo buenos niveles de ventilación se reduce el riesgo de infectarse en el interior del metro, el CO₂ es un indicador con un buen coste-beneficio para evitar el contagio por bioaerosoles, pero que una de las limitaciones del CO₂ es que su interpretación no puede ser generalizada, sino que debería ser individualizada.

Las oficinas son unos de los ambientes más afectados por el SARS-CoV-2. Para evitar el contagio, se realizan de forma rutinaria pruebas PCR, que a la larga acaban costándole a la empresa mucho dinero. Ramuta et al., (2022) propone sustituir las pruebas individuales por muestreos de aire en las oficinas. Los resultados obtenidos sostienen sus afirmaciones, de los 15 establecimientos muestreados 14 dieron positivo en al menos una muestra de aire, de los 15 establecimientos uno sufrió un foco de covid-19 durante el muestreo. Una semana antes de que el primer infectado diera positivo, ya se podía detectar el SARS-CoV-2 en las muestras de aire, indicando que podría ser un buen indicador temprano de detección, también realizaron estudios sobre el tiempo de muestreo y observaron que las diferencias entre muestreos diarios y semanales no variaba mucho haciéndolos una posible vía alternativa para la detección de SARS-CoV-2 en el caso de que las pruebas individuales no estén disponibles.

Habiendo visto que en las muestras de aire se podía detectar el SARS-CoV-2, Hartmann & Kriegel, (2020) propusieron un modelo mediante el cual eran capaces de determinar el riesgo de contagio mediante la concentración de CO₂ resolviendo ecuaciones diferenciales. Según el modelo, el CO₂ es un buen indicador de la eficacia del sistema de ventilación, también destaca que la muerte y deposición de los virus en bioaerosoles es negligible. En sus estudios concluyen que es igual de peligroso estar muy poco tiempo en un ambiente con una concentración de CO₂ muy elevada que estar mucho tiempo en un ambiente con una concentración de CO₂ muy baja.

Teniendo en cuenta estos estudios, entre otros muchos, se ha propuesto que la concentración de CO₂ sirva como indicador de la presencia de SARS-CoV-2 en interiores.(Hartmann & Kriegel, 2020; Pang et al., 2021).

No obstante, no hay estudios que se hayan centrado de forma prioritaria en el análisis y correlación entre los niveles de CO₂ y de SARS-CoV-2 en bioaerosoles. El objetivo del presente estudio es verificar que el CO₂ es un buen indicador de la presencia del SARS-CoV-2 en espacios interiores.

Recolección de muestra, almacenaje y procesado

En estudios anteriores realizados por el grupo (Truyols-Vives, Joan; Stiliyanov-Atanasov, Kristiyan; Sala-Llinàs, Ernest; Toledo- Pons, Nuria; G. Baldoví, Herme; Mercader-Barceló, 2022; Tuyols Vives et al., 2022), se diseñó un protocolo para cuantificar los niveles de SARS-CoV-2 en el aire del interior de edificios. Este nuevo protocolo es el que se emplea en este estudio debido a que, mejora la eficiencia de recolección de bioaerosoles y es muy sensible siendo capaz de detectar hasta una copia de RNA de SARS-CoV-2.

El sistema de recolección empleado en el estudio es el BioSampler® (Bioaerosol Collection Device Cat. No. 225 Series). Empleamos el Biosampler® debido a que presenta una eficacia de recolección de bioaerosoles de 1-3 micras (Kesavan et al., 2010) y preservación superiores comparados con otros muestreadores de aire basados en otros principios de recolección. (Fabian et al., 2009)

La recolección de muestras se realizó en dos plantas COVID (Figura 1) del hospital universitario de Son Espases (Carretera de Valldemossa, 79, 07120 Palma, Illes Balears, España).

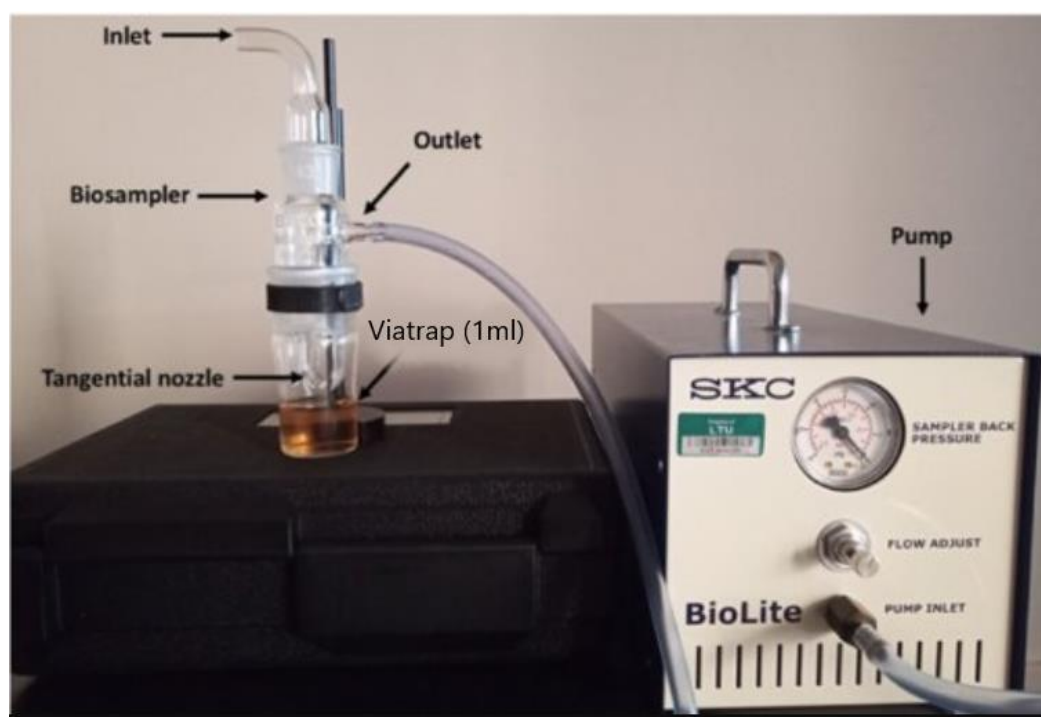


Imagen adaptada de Brown et al., (2020): Componentes del SKC Biosampler®. La pieza de cristal superior está montada sobre un vaso recolector de cristal que contiene 1 ml de Viatrap®. El Biosampler® está conectado a una bomba de aire que permite la circulación del aire del medio hacia el vaso recolector con Viatrap® pasando por los nodos tangenciales, estructura que permite reducir el estrés físico que sufre el SARS-CoV-2 obteniendo muestras de mayor calidad.

Se realizaron 10 muestreos y cada una de ellas consta de 4 muestreos continuos de 1 hora. Cada hora se recogía el vaso recolector con el medio (Viatrap®) y se sustituía por otro vaso recolector con 1 ml de Viatrap® estéril nuevo. Los muestreos se dividieron en dos plantas. En la planta 2-N se encuentran los pacientes ingresados con COVID-19 que requieren bajos cuidados y no requieren o requieren muy poco aporte de oxígeno, y la planta 3-O, que se readaptó para convertirse en una unidad de cuidados respiratorios

intermedios (UCRI). En la planta 3-O, encontramos a aquellos pacientes con COVID-19 que se encuentran en un estado más grave, y necesitan más atención por parte del personal sanitario además de un alto flujo de oxígeno ($\geq 60\text{L}/\text{min}$). Se realizaron cuatro muestreos en la planta 2-N y seis en la planta 3-O (ver tabla 1).

Muestreo	Fecha de recolección	Planta	Nº de habitaciones ocupadas/ total	Tipo de pacientes
1	25/01/2022	3O	6/17	Alto flujo
2	26/01/2022	2N	25/26	Bajo flujo
3	27/01/2022	2N	25/26	Bajo flujo
4	31/01/2022	3O	7/17	Alto flujo
5	01/02/2022	2N	25/26	Bajo flujo
6	02/02/2022	2N	26/26	Bajo flujo
7	03/02/2022	3O	8/17	Alto flujo
8	07/02/2022	3O	12/17	Mixto
9	08/02/2022	3O	12/17	Mixto
10	09/02/2022	3O	17/17	Mixto

Tabla 1: Datos de los muestreos indicando la fecha de recolección, la planta donde se realiza, el tipo de pacientes que se encontraban en la planta y el número de habitaciones ocupadas del máximo posible. En la planta 3O, encontramos menos pacientes debido a que requieren de una mayor atención por parte del personal sanitario.

Las muestras obtenidas fueron procesadas acto seguido mediante el método fenol-cloroformo. Empleamos TRIidty G (fenol) junto con cloroformo para separar el RNA del resto de componentes. Después de centrifugar, extraemos la fase acuosa que contiene el RNA (sobrenadante) y le introducimos isopropanol para que el RNA precipite. Dejamos que el RNA precipitara a lo largo de la noche a -20°C para incrementar el rendimiento. Al día siguiente se centrifugó y nos quedamos con una bolita o “pellet” de RNA. El RNA se limpió con etanol al 75% y finalmente se re-suspendió en agua libre de RNAsas tratada con dietilpircarbonato (DEPC). Cuantificamos la concentración de RNA mediante espectrofotometría empleando el espectrofotómetro Synergy H1 y comprobamos la calidad de la muestra analizando la ratio 260/230 (Tabla extra-1), después, las muestras de RNA fueron preservadas a -80°C .

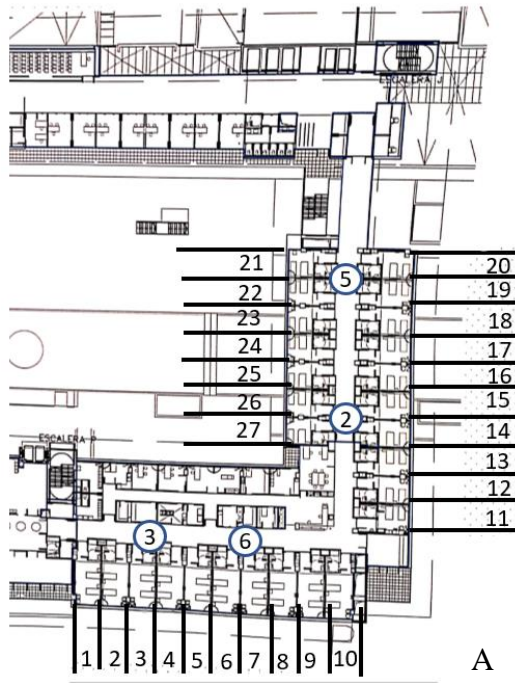
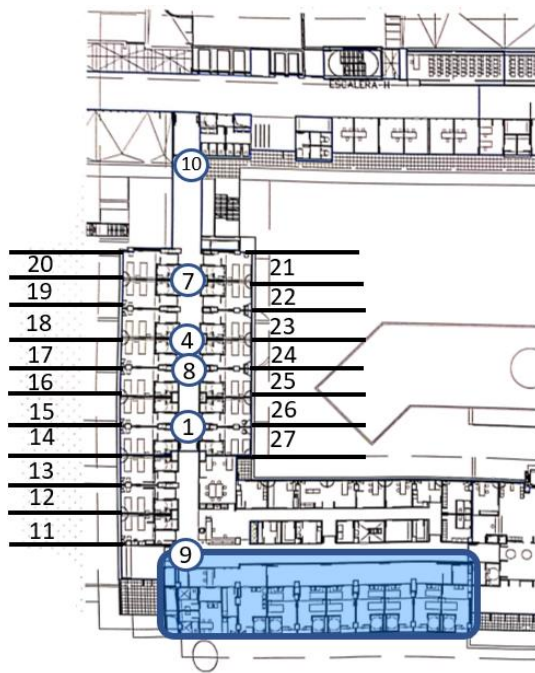


Figura 1: A) Representación esquemática del módulo 2-N.

El módulo 2-N es donde se encuentran aquellos pacientes COVID19 sin necesidad de soporte respiratorio. Los puntos representan los puntos de muestreo y el orden en que fueron tomados (del 1 al 10).

En este módulo, la habitación 10 se convirtió en una “sala sucia”, donde el personal sanitario se desvestía después de entrar a una habitación con paciente/s con covid-19.

Las habitaciones de la 1 a la 9 son habitaciones dobles, donde puede haber hasta dos pacientes COVID19, mientras que las habitaciones de la 11 a la 27 son individuales. Cabe destacar que las únicas habitaciones con presión negativa son la 11, la 12 y la 13.



B) Representación esquemática del módulo 3-O.

El módulo 3-O es la unidad de cuidados respiratorios intermedios (UCRI) y solo ingresan los pacientes con necesidades de alto Flujo de oxígeno. Un paciente alto Flujo es aquel al que se le inyectan al menos 60L/min de oxígeno, lo que puede provocar un aumento de los bioaerosoles. Los puntos representan los puntos de muestreo y el orden en que fueron tomados (del 1 al 10).

La distribución de las habitaciones y el tipo son idénticas a las del módulo 2-N, exceptuando que las habitaciones de la 1-10 han sido adaptadas para formar el módulo de presos, representado por el rectángulo azul.

Una vez obtuvimos todas las muestras, realizamos una RT-ddPCR en dos pasos, en el primer paso, empleamos la transcriptasa SuperScript de Invitrogen para retrotranscribir el RNA a cDNA, empleamos la transcriptasa SuperScript de Invitrogen debido a que comprobamos que es más eficiente a bajas concentraciones de material genómico en muestras de bioaerosoles (Truyols-Vives et al., 2022). Posteriormente, en el segundo paso, se realizó una ddPCR con dos pares de primers, uno para la región ORF1ab, elegido como diana por presentar un LOD de 1 después de analizarla, y el otro para la región codificante de la proteína N1, cada par de primers iban asociadas a una sonda HEX y FAM respectivamente. El protocolo para la PCR fue: 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 94°C durante 30 s y 60°C durante 1 min, y 98°C durante 10 min. Las secuencias amplificadas fueron leídas en el canal FAM/HEX usando el QX200 Droplet Reader (Bio-Rad).

Recolección de datos ambientales

Durante el proceso de recolección de muestra, junto al BioSampler® se encuentra un medidor de calidad del aire (C-LOGIC 7100-AQ) que nos permite medir la temperatura (°C), la humedad relativa (%HR) y la concentración de CO₂ (PPM). Estos valores, junto al de número de personas presentes en el pasillo y el número de veces que se abren las puertas de las habitaciones de los pacientes fueron tomados cada 5 minutos durante las 4 horas de cada muestreo. Para los datos del número de veces que se abren las puertas de las habitaciones de los pacientes, solo se tienen en cuenta aquellas habitaciones en las que se encuentran pacientes y que no son de presión negativa (Figura 1). En el caso de la planta 2-N, como tiene dos pasillos que forman una L, solo se tienen en cuenta las habitaciones del pasillo donde se encuentra el BioSampler® y no ambos pasillos. También cabe destacar que las habitaciones de la 1 a la 9 del módulo 2-N son habitaciones dobles.

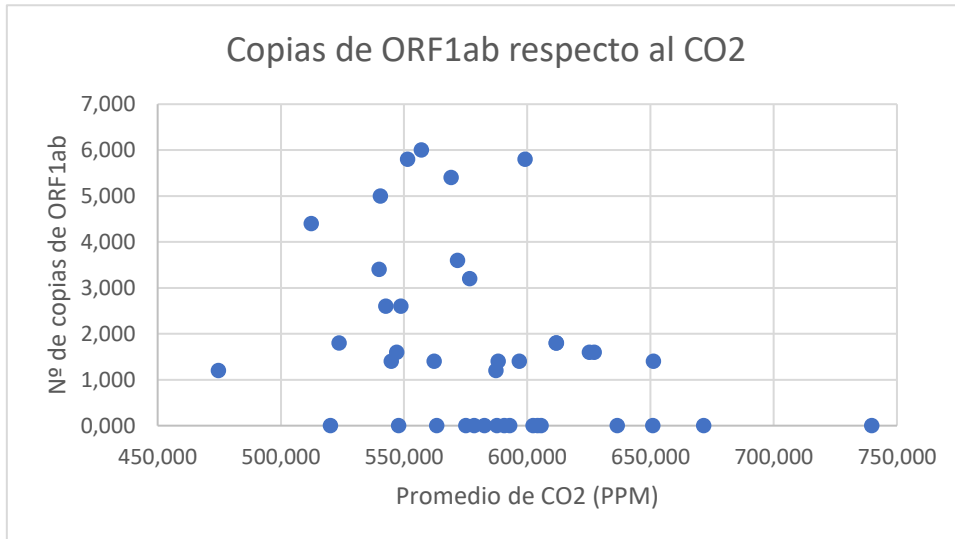
Tratamiento de datos y análisis estadísticos

Con los datos obtenidos durante los muestreos (ver tabla 2) se han realizado varios análisis. El primer análisis realizado fue la prueba de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov). Esta prueba es una prueba ómnibus EDF para la hipótesis compuesta de normalidad. El resultado de la prueba es la diferencia absoluta máxima entre la función de distribución acumulada empírica e hipotética (ver tabla 3). Tras comprobar que la mitad de nuestros valores no siguen una distribución normal, se ha optado por emplear el coeficiente de correlación de Spearman para determinar si existe y de que tipo es la correlación entre nuestras diferentes variables (ver tabla 4 y 5). Finalmente emplearemos una prueba T-Student para determinar si agrupando los valores dependiendo de la presencia o ausencia de copias de ORF1ab detectadas es estadísticamente significativo o no (ver tabla 6).

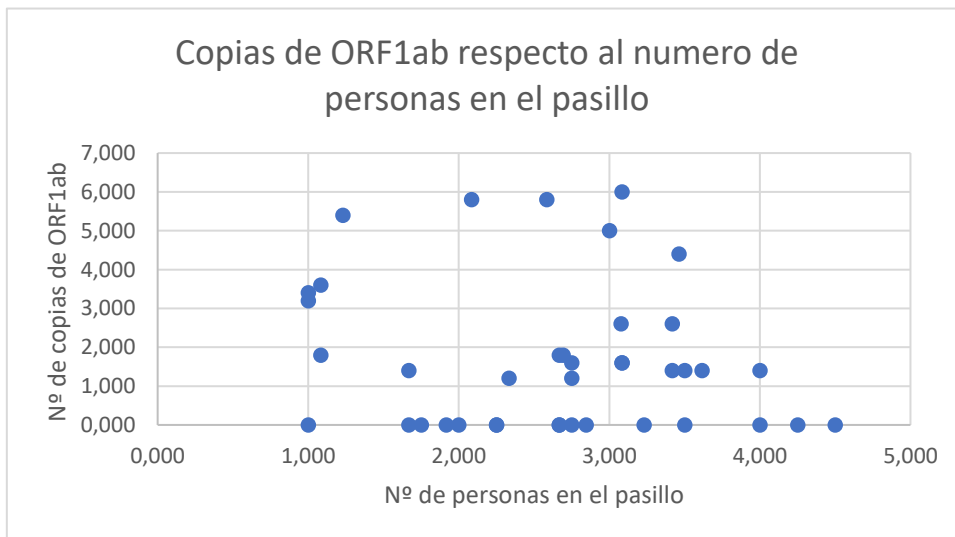
Muestra	Hora muestreo	Promedio de temperatura	Promedio de humedad relativa	Promedio concentración de CO2	Promedio personas pasillo	Total puertas abiertas	Copias NI 20 µL	Copias ORF1ab 20 µL	Copias ORF1ab / m ³
1	1	24,000	30,462	596,692	3,615	17,000	0,000	1,4	12,44
	2	25,833	27,667	625,167	3,083	14,000	0,000	1,6	14,22
	3	25,917	27,583	578,417	4,250	25,000	0,000	0	0,00
	4	26,000	26,750	575,000	2,750	29,000	0,000	0	0,00
2	5	25,231	26,923	604,077	4,000	41,000	2,600	0	0,00
	6	26,833	24,917	605,583	2,667	36,000	0,000	0	0,00
	7	25,250	27,333	602,333	4,500	64,000	0,000	0	0,00
	8	26,833	26,083	651,167	4,000	36,000	0,000	1,4	12,44
3	9	23,769	26,692	671,462	2,846	87,000	0,000	0	0,00
	10	25,000	26,167	739,667	3,500	72,000	0,000	0	0,00
	11	25,333	25,333	636,500	1,667	21,000	0,000	0	0,00
	12	25,000	25,500	650,833	2,250	65,000	0,000	0	0,00
4	13	23,692	27,692	548,615	3,077	69,000	0,000	2,6	23,11
	14	23,583	23,167	474,583	2,333	41,000	0,000	1,2	10,67
	15	24,917	19,333	520,083	2,250	35,000	0,000	0	0,00
	16	26,000	17,583	587,250	2,750	28,000	0,000	1,2	10,67
5	17	23,692	30,231	540,308	3,000	200,000	0,000	5	44,44
	18	25,000	27,667	562,167	1,667	39,000	1,200	1,4	12,44
	19	25,167	27,417	563,167	2,667	44,000	0,000	0	0,00
	20	24,583	27,750	551,333	2,083	32,000	0,000	5,8	51,56
6	21	24,385	27,462	611,769	2,692	43,000	0,000	1,8	16,00
	22	25,833	24,750	599,000	2,583	51,000	0,000	5,8	51,56
	23	27,000	21,083	547,000	3,083	36,000	0,000	1,6	14,22
	24	25,417	21,750	523,583	2,667	19,000	0,000	1,8	16,00
7	25	23,385	25,538	569,000	1,231	28,000	0,000	5,4	48,00
	26	25,000	24,750	571,667	1,083	14,000	0,000	3,6	32,00
	27	25,000	27,500	582,500	1,917	9,000	0,000	0	0,00
	28	25,667	27,917	590,583	1,750	28,000	0,000	0	0,00
8	29	24,154	25,769	592,769	3,231	57,000	0,000	0	0,00
	30	25,000	28,583	587,667	2,000	23,000	0,000	0	0,00
	31	25,167	28,000	588,083	3,417	65,000	0,000	1,4	12,44
	32	25,667	27,500	627,083	2,750	58,000	0,000	1,6	14,22
9	33	24,154	28,000	512,308	3,462	1,000	0,000	4,4	39,11
	34	25,500	25,583	542,500	3,417	6,000	0,000	2,6	23,11
	35	25,667	25,083	544,750	3,500	14,000	0,000	1,4	12,44
	36	25,333	24,333	557,000	3,083	0,000	0,000	6	53,33
10	37	22,385	33,154	539,846	1,000	18,000	0,000	3,4	30,22
	38	23,000	31,917	547,750	1,000	13,000	0,000	0	0,00
	39	23,417	31,250	611,583	1,083	9,000	0,000	1,8	16,00
	40	24,000	31,000	576,583	1,000	14,000	0,000	3,2	28,44

Tabla 2: Valores promedios de los parámetros analizados. Las filas coloreadas en naranja indican una ausencia de copias de ORF1ab, las de color azul indican la presencia de copias de ORF1ab.

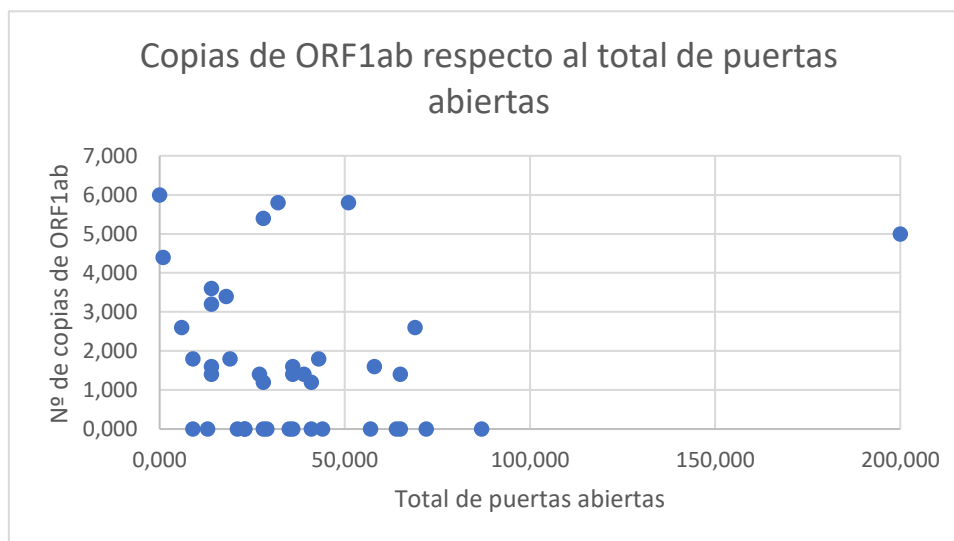
3



4



5



Representación gráfica de la correlación entre las variables ambientales y el número de copias de ORF1ab. Los datos fueron tomados en los pasillos de las plantas COVID19 del hospital universitario de Son Espases. 1) representación del número de copias de orf1ab respecto a la temperatura promedio, 2) respecto al promedio de humedad relativa, 3) respecto a la concentración de CO2, 4) respecto al promedio de personas que se encontraban en el pasillo y 5) respecto al número total de puertas de habitaciones abiertas.

A la hora de analizar los resultados, el primer paso es comprobar si nuestros datos siguen una distribución normal. Para ello, se ha realizado el análisis “lillie.test” en R-studio, lo que nos permite obtener los Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) que nos permitirá determinar si nuestros datos siguen o no una distribución normal. Para esta prueba, todos los P-valores superiores a 0,05 indican que sigue una distribución normal (ver tabla 2).

Valores	P-Valor	Normalidad
Temperatura	0,01268	NO
Humedad relativa	0,05178	SI
CO2	0,45	SI
Nº Personas pasillo	0,1673	SI
Total de puertas abiertas	0,003056	NO
Copias ORF1ab	9,833*10 ⁻⁵	NO

Tabla 2: Resultados del lillie.test para los diferentes valores indicando si siguen o no una distribución normal. Se considera que sigue una distribución normal cuando el P-Valor es superior a 0,05.

Observando la tabla 2, vemos que la mitad de nuestros valores no siguen una distribución normal, por lo que para calcular el coeficiente de correlación que hay entre los valores necesitaremos utilizar el coeficiente de correlación de Spearman. El coeficiente de correlación de Spearman es una medida que nos permite correlacionar dos variables aleatorias, que no siguen una distribución normal, y determinar si existe o no, y de qué tipo es, la correlación entre las dos variables. Un coeficiente de correlación es un estadístico que cuantifica la correlación y le asigna un valor comprendido entre -1 y +1. Cuanto más cercano a 0 está, menor correlación hay y cuanto más se acerca a 1 mayor es la correlación. El signo negativo o positivo indica el tipo de correlación que hay, si es directamente proporcional (positivo), donde si A incrementa B también lo hará, o bien si es inversamente proporcional (negativo), donde si A incrementa B disminuye y viceversa.

Estudio estadístico: correlación de Spearman (P-valor)						
	Temperatura	Humedad relativa	CO2	Personas pasillo	Puertas abiertas	ORF1ab
Temperatura	NA					
Humedad relativa	0.0009372	NA				
CO2	0.1474	0.799	NA			
Personas pasillo	0.005802	0.4279	0.3109	NA		
Puertas abiertas	0.9547	0.6831	0.03106	0.08993	NA	
ORF1ab	0.234	0.7747	0.01711	0.4566	0.1264	NA

Tabla 4: P-valor obtenido en los valores de correlación de Spearman. Los valores destacados en verde indican que son estadísticamente significativos (P -valor $< 0,05$).

Estudio estadístico: correlación de Spearman						
	Temperatura	Humedad relativa	CO2	Personas pasillo	Puertas abiertas	ORF1ab
Temperatura	1,000					
Humedad relativa	-0.5030847	1,000				
CO2	0.2332859	0.04156502	1,000			
Personas pasillo	0.4285253	-0.1289096	0.1643348	1,000		
Puertas abiertas	- 0.009278905	-0.06659155	0.3414407	0.2716676	1,000	
ORF1ab	-0.1925296	0.0467152	-0.375011	-0.1211151	-0.2457295	1,000

Tabla 5: Valores de correlación de Spearman. Los valores destacados en verde indican que son estadísticamente significativos (P -valor $< 0,05$).

Para observar si hay diferencias significativas entre las variables ambientales dependiendo de si fuimos capaces de detectar SARS-CoV-2 en la muestra o no, realizamos una prueba T-Student.

	Promedio de temperatura	Promedio de humedad relativa	Promedio concentración de CO2	Promedio personas pasillo	Total puertas abiertas
Ausencia ORF1ab	25,056	26,852	603,024	2,703	40,438
Presencia ORF1ab	24,814	26,564	569,127	2,569	35,917
T-Student	0,46048788	0,769738563	0,036780646	0,670919665	0,65083166

Tabla 6: Promedio y T-Student de las variables ambientales dependiendo de la presencia o ausencia de copias de ORF1ab detectadas.

Observando los resultados obtenidos [Tabla 4 y Tabla 5], podemos afirmar que tenemos cuatro correlaciones estadísticamente significativas y una quinta que se encuentra muy cerca de ser estadísticamente significativa. Las cuatro correlaciones significativas son: Temperatura – Humedad relativa, Temperatura – personas en el pasillo, CO2 – ORF1ab y CO2 – Total de puertas abiertas.

La quinta correlación es la que hay entre el número de personas en el pasillo y el número de veces que se abren las puertas, esta correlación tiene una Rho de Spearman de 0,08993, quedándose a escasos 0,04 de ser estadísticamente significativa. La causa más probable de que no llegue a ser estadísticamente significativo es debido a que el número de personas en el pasillo es un valor tomado en un tiempo fijo, cada 5 minutos junto con los valores de CO2, temperatura y humedad relativa, mientras que el número de veces que se abren las puertas es un valor que se mide a lo largo de 5 minutos.

Podemos afirmar que hay dos correlaciones positivas (Temperatura – personas en el pasillo y CO2 – Total de puertas abiertas) y dos correlaciones negativas (CO2 – ORF1ab

y Temperatura – Humedad relativa). También, que en la prueba T-Student (ver tabla 6) los valores de CO₂ cuando detectamos o no copias de ORF1ab son estadísticamente significativos, indicando que son variables independientes. Estos resultados confirman la tendencia de los resultados obtenidos de que detectamos más copias de ORF1ab en muestras con menor concentración de CO₂.

Discusión

El objetivo de este estudio es verificar que el CO₂ es un buen indicativo de la presencia del SARS-CoV-2 en espacios interiores, sin embargo, los resultados obtenidos de los análisis muestran una discordancia con la hipótesis generalizada en la que se asume que los niveles de CO₂ en interiores son directamente proporcionales a la carga aérea del virus.

Como hemos mencionado en los resultados, encontramos cuatro correlaciones estadísticamente significativas, dos positivas y dos negativas. Analizándolo las relaciones entre estos parámetros en detalle, podemos llegar a entender las correlaciones.

La correlación entre la temperatura ambiental y el número de personas en el pasillo es positiva, esto puede estar causado por el desprendimiento de calor corporal y el equipamiento empleado por el personal sanitario, el muestreo se realizó entre enero y febrero, donde el hospital tiene la calefacción encendida y el personal lleva ropa más cálida, estos dos factores con la actividad física que conlleva el cuidar los pacientes, hace que la temperatura corporal aumente y sea desprendida, incrementando la temperatura ambiental.

Para entender la correlación negativa entre la temperatura y la humedad relativa, primero debemos comprender que la humedad relativa es la cantidad de humedad que se encuentra en el aire, se calcula dividiendo la humedad real entre la humedad total que el aire es capaz de contener a una temperatura determinada. Cuando la temperatura incrementa, así mismo incrementa la capacidad del aire para contener humedad haciendo que la humedad relativa disminuya. Cuando la temperatura disminuye, la capacidad de contener humedad se reduce haciendo que la humedad relativa incremente.

Para entender la correlación que hay entre el CO₂ y el número total de veces que se abren las puertas de las habitaciones de los pacientes, tenemos que fijarnos en el periodo del año. Los muestreos se realizaron durante los meses de enero y febrero, meses de mucho frío en las Islas Baleares, por lo que la ventilación que existe en las habitaciones proviene casi exclusivamente del sistema de ventilación, es improbable que las personas que abran las ventanas por el frío. Durante la estancia del paciente, no tienen permiso para salir de la habitación a menos que necesiten alguna prueba que no se pueda realizar en la misma para evitar al máximo el contagio por lo que, el paciente, al estar continuamente en una habitación con aporte de aire exterior restringido al sistema de ventilación, causa que la concentración de CO₂ se vaya acumulando, sobre todo en el periodo nocturno. Cuando una puerta se abre, la diferencia de concentración de CO₂ entre el exterior y el interior favorece que el CO₂ salga incrementando el CO₂ en el pasillo, lo que podría causar esta correlación.

Finalmente, la última correlación es entre el CO₂ y el número de copias de ORF1ab. Esta correlación negativa puede ser explicada por varias razones o por su conjunto. Aunque se haya tomado el CO₂ como un buen indicador del riesgo de infectarse de SARS-CoV-2, todavía no se han realizado suficientes estudios sobre cómo afecta la carga viral que tiene cada paciente sobre los bioaerosoles que libera, y que la liberación de estos no tiene por qué ser necesariamente paralela a la exhalación de CO₂. Un paciente con una alta carga viral debería liberar una mayor carga de SARS-CoV-2 en cada exhalada que uno con una baja carga viral. Además, el personal sanitario presente en cada planta COVID, que no padece la enfermedad, debería “diluir” de la carga viral presente en los pasillos con su aporte de CO₂. Por el contrario, nuestros datos demuestran que a concentraciones bajas de CO₂ detectamos el virus. Un otro factor que podría explicar estos resultados es la diferencia en las dinámicas entre el CO₂ y el virus. Mediante una herramienta informática proporcionada por el departamento de seguridad nacional de la EE.UU. (<https://www.dhs.gov/science-and-technology/sars-airborne-calculator>) se puede estimar la descomposición en el aire del SARS-CoV-2, teniendo en cuenta que el promedio de la temperatura es de 24,911°C ~ 25°C y el de la humedad relativa es 26,679% ~ 27%, para

nuestros datos el tiempo aproximado de supervivencia en el aire es de 1 hora y 7 minutos, en cambio el CO₂ es un gas bastante estable que excepto que ocurran procesos biológicos, como la fotosíntesis, o más modernos, como la fijación artificial, dura milenios en el aire ambiental. Así que, nuestros resultados pueden ser explicados si el paciente libera un mayor volumen de carga viral que de CO₂.

Algunas de las limitaciones de este estudio pueden ser el cambio en la conducta del personal sanitario tras conocer el objetivo del estudio como la exclusión de un pasillo en la planta 2-N. También influye el hecho de detectar copias de ORF1ab a concentraciones de CO₂ tan bajas como 474,583 PPM, como el no ser capaces de detectar SARS-CoV-2 a una concentración de CO₂ de 739,667 PPM.

En la planta 2-N, los datos ambientales correspondientes al número de personas que se encuentran en el pasillo y el número total de veces que se abren las puertas de las habitaciones de los pacientes se encuentran limitados al pasillo donde está el Biosampler, el otro pasillo se encuentra completamente obviado.

El personal sanitario, tras conocer el objetivo del estudio, modificó algunas de las conductas habituales. Al principio, las enfermeras dejaban la puerta de las habitaciones entreabierta cuando había un compañero dentro, tras conocer el objetivo, comenzaron a cerrar completamente la puerta de la habitación cuando había un compañero dentro, también, empezaron a abrir la puerta del comedor que lleva a la terraza para que la zona se encuentre mejor ventilada, causando que en ciertas ocasiones el aire exterior entrara a los pasillos modificando las condiciones ambientales levemente.

Para concluir, cabe destacar que, hasta ahora, existen muchos modelos computacionales que predicen el riesgo a infectarse por SARS-CoV-2, pero todos ellos parten de que nuestras exhalaciones son mezclas de gases homogéneas y, la gran mayoría, no tienen en cuenta factores como la temperatura, la humedad relativa, la variante que nos infecta, la dosis mínima de infección y los vacunados. Faltando tantos datos importantes, debemos tomarnos el CO₂ como indicador directo de riesgo de infección con cautela. Es cierto, que recientemente Bale et al., (2021) crearon un modelo de predicción del riesgo de infectarse

mediante el modelo de dosis-respuesta simulando la dispersión de los bioaerosoles, este modelo tiene en cuenta todos los factores mencionados anteriormente y como principal resultado es que si la dosis mínima de infección es elevada, el riesgo de infectarse es bajo incluso a un metro de distancia, en cambio, si la dosis mínima de infección es reducida, como parece ser en el caso del SARS-CoV-2, el riesgo de infectarse sigue siendo elevado incluso a distancias superiores a los dos metros.

Viendo como diferentes factores pueden afectar al riesgo de infectarse, lo más recomendable sería realizar un estudio individual para cada edificio determinando valores ambientales y estableciendo pautas a seguir individualizadas para mantener un ambiente interior seguro.

Bibliografía

- Bale, R., Iida, A., Yamakawa, M., Li, C., & Tsubokura, M. (2021). Quantifying the COVID19 infection risk due to droplet/aerosol inhalation. *Scientific Reports*, 0123456789, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14862-y>
- Baselga, M., Alba, J. J., & Schuhmacher, A. J. (2022). The Control of Metabolic CO2 in Public Transport as a Strategy to Reduce the Transmission of Respiratory Infectious Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(11), 6605. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116605>
- Brown, L., Premaratna, D., Segal, Y., & Beddoe, T. (2020). Air sampling for detection of infectious laryngotracheitis (ILT) in commercial poultry flocks. *BMC Research Notes*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05399-2>
- Di, A., Palmisani, J., Pulimeno, M., & Cerino, F. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information .*

January.

Fabian, P., Mcdevitt, J. J., Houseman, E. A., & Milton, D. K. (2009). *Airborne influenza virus detection with four aerosol samplers using molecular and infectivity assays: considerations for a new infectious virus aerosol sampler.*

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2009.00609.x>

Hartmann, A., & Kriegel, M. (2020). Risk assessment of aerosols loaded with virus based on CO₂ concentration. *Hermann Rietschel Institut (Fachgebiet Gebäude-Energie-Systeme)*, *i*, 1–8.

Kesavan, J., Schepers, D., & McFarland, A. R. (2010). Sampling and retention efficiencies of batch-type liquid-based bioaerosol samplers. *Aerosol Science and Technology*, *44*(10), 817–829. <https://doi.org/10.1080/02786826.2010.497513>

Liao, C. M., Chang, C. F., & Liang, H. M. (2005). A probabilistic transmission dynamic model to assess indoor airborne infection risks. *Risk Analysis*, *25*(5), 1097–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2005.00663.x>

Ministerio de Sanidad - Profesionales - Situación actual Coronavirus. (n.d.). Consultado el 9 de Julio del 2022 de

<https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/situacionActual.htm>

Myatt, T. A., Johnston, S. L., Zuo, Z., Wand, M., Kebabze, T., Rudnick, S., & Milton, D. K. (2004). Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *169*(11), 1187–1190. <https://doi.org/10.1164/rccm.200306-760oc>

Pang, Z., Hu, P., Lu, X., Wang, Q., O'Neill, Z., Walker, M. J., O'Conner, M. ., & McFerrin, A. (2021). A smart CO₂-based ventilation control framework to minimize the infection risk of COVID-19 in public buildings. *Building Simulation 2021 Conference, 2019.*

https://www.researchgate.net/publication/349121056_A_Smart_CO2-

Based_Ventilation_Control_Framework_to_Minimize_the_Infection_Risk_of_CO
VID-19_In_Public_Buildings

Ramuta, M. D., Newman, C. M., Brakefield, S. F., Stauss, M. R., Wiseman, R. W., Kita-Yarbro, A., O'Connor, E. J., Dahal, N., Lim, A., Poulsen, K. P., Safdar, N., Marx, J. A., Accola, M. A., Rehrauer, W. M., Zimmer, J. A., Khubbar, M., Beversdorf, L. J., Boehm, E. C., Castañeda, D., ... O'Connor, S. L. (2022). SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens are detected in continuous air samples from congregate settings. *MedRxiv*, 2022.03.29.22272716.

<http://medrxiv.org/content/early/2022/03/30/2022.03.29.22272716.abstract>

Rudnick, S. N., & Milton, D. K. (2003). Risk of indoor airborne infection transmission estimated from carbon dioxide concentration. *Indoor Air*, 13(3), 237–245.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0668.2003.00189.x>

Schade, W., Reimer, V., Seipenbusch, M., & Willer, U. (2021). Experimental investigation of aerosol and co2 dispersion for evaluation of covid-19 infection risk in a concert hall. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph18063037>

Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J. (2020). *On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>

Truyols-Vives, Joan; Stiliyanov-Atanasov, Kristiyan; Sala-Llinàs, Ernest; Toledo- Pons, Nuria; G. Baldoví, Herme; Mercader-Barceló, J. (2022). Efficiency and sensitivity optimization of a protocol to quantify indoor airborne SARS-CoV-2 levels. *Journal of Hospital Infection*.

Truyols Vives, J., Muncunill, J., Toledo Pons, N., Baldoví, H. G., Sala Llinàs, E., & Mercader Barceló, J. (2022). SARS-CoV-2 detection in bioaerosols using a liquid impinger collector and ddPCR. *Indoor Air*, 32(2), 1–15.

<https://doi.org/10.1111/ina.13002>

van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A.,

Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., Gerber, S. I., Lloyd-Smith, J. O., de Wit, E., & Munster, V. J. (2020). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, 382(16), 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/NEJMC2004973>

Vargas Marcos, F., Ruiz de Adana, M., Marín Rodríguez, I., & Moreno Grau, S. (2020). Transmisión del SARS-CoV-2 por gotas respiratorias, objetos contaminados y aerosoles (vía aérea). *Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA)*, 1–48. <https://www.sanidadambiental.com/wp-content/uploads/2020/09/Transmisión-del-SARS-CoV-2-por-gotas-respiratorias-objetos-contaminados-y-aerosoles.pdf>

Villanueva, F., Notario, A., Cabañas, B., Martín, P., Salgado, S., & Gabriel, M. F. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information. January.*

ANEXO 1

Muestra	Hora muestreo	260/280	260/280	260/230	260/230
1	1	102,130	99,249	1,450	1,460
	2	24,420	39,396	1,340	1,430
	3	37,560	34,780	1,430	1,430
	4	53,455	52,113	1,450	1,430
2	5	42,605	39,447	1,490	1,450
	6	106,580	103,903	1,480	1,480
	7	88,203	86,852	1,500	1,500
	8	38,949	39,793	1,480	1,510
3	9	42,925	42,213	1,480	1,470
	10	57,580	47,082	1,510	1,520
	11	62,213	62,918	1,490	1,510
	12	61,980	58,901	1,510	1,520
4	13	66,707	62,217	1,460	1,450
	14	39,360	35,815	1,460	1,400

	15	99,898	99,500	1,440	1,440
	16	67,717	68,262	1,440	1,440
5	17	34,896	30,751	1,540	1,510
	18	94,350	88,370	1,500	1,500
	19	53,442	52,271	1,500	1,510
	20	67,152	68,262	1,500	1,510
6	21	43,417	43,636	1,520	1,540
	22	86,171	78,793	1,510	1,540
	23	84,954	83,490	1,470	1,480
	24	54,414	54,386	1,490	1,510
7	25	91,783	84,980	1,480	1,470
	26	186,515	185,272	1,420	1,420
	27	235,452	230,698	1,450	1,450
	28	125,253	124,003	1,440	1,450
8	29	112,931	104,308	1,480	1,470
	30	65,480	64,830	1,500	1,480
	31	173,848	169,504	1,450	1,440
	32	113,657	114,075	1,450	1,450
9	33	122,640	117,075	1,460	1,450
	34	21,462	21,730	1,490	1,490
	35	47,025	45,627	1,500	1,510
	36	119,758	119,856	1,470	1,470
10	37	81,274	74,901	1,500	1,510
	38	41,749	39,180	1,530	1,500
	39	116,670	112,825	1,450	1,480
	40	72,040	71,491	1,495	1,440

Tabla extra-1: Datos informativos sobre la concentración y calidad de las muestras de RNA. Se realizaron pruebas por duplicado de las absorbancias a 260/280 para calcular la concentración de RNA y de las absorbancias a 260/230 para calcular la calidad de las muestras. Las absorbancias fueron obtenidas del espectrofotómetro Synergy H1.

