Mesura de contaminants biològics a l'aire

Xavier Guardino Solà

PID_00186765

UOC
Universitat Oberta de Catalunya

Els textos i imatges publicats en aquesta obra estan subjectes –llevat que s'indiqui el contrari– a una llicència de Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada (BY-NC-ND) v.3.0 Espanya de Creative Commons. Podeu copiar-los, distribuir-los i transmetre'ls públicament sempre que en citeu l'autor i la font (FUOC. Fundació per a la Universitat Oberta de Catalunya), no en feu un ús comercial i no en feu obra derivada. La llicència completa es pot consultar a http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/legalcode.ca

Índex

Introducció 5

Objectius 11

1. Aspectes bàsics en la mesura d'agents biològics 13
1.1. Per què mesurem 16
1.2. Què mesurem 16
1.3. On i quan mesurem 17
1.4. Com mesurem 19
1.5. Quantes mostres s'han de prendre 20
1.6. Volum i temps de mostreig 21
1.7. Eficàcia del mostreig 23

2. Equips de mostreig d'aire 26
2.1. Mostreig inercial 26
2.1.1. Mostrejador d'escletxa 26
2.1.2. Mostrejador Andersen 27
2.1.3. Mostrejadors multiorifici 28
2.1.4. Flascons rentadors de gasos 28
2.1.5. Ciclons rentadors 29
2.1.6. Mostrejador RCS 30
2.2. Filtració 31
2.2.1. Filtres capil·lars 31
2.2.2. Filtres de membrana 32

3. Mostreig de materials i superfícies 33
3.1. Frotis de superfícies 34
3.2. Mostreig per contacte 34
3.2.1. Plaques de contacte 34
3.2.2. Cintes adhesives 35

4. Selecció del mostrejador 36

5. Anàlisi de les mostres 38
5.1. Transport i conservació de les mostres 39
5.2. Tipus d'estudis 40
5.3. Cultiu de microorganismes. Bacteris i fongs 41
5.3.1. Placa amb medi de cultiu 42
5.3.2. Temperatura d'incubació 43
5.3.3. Atmosfera d'incubació 44
5.3.4. Recompte de colònies 44

5.3.5. Identificació de microorganismes cultivables 45
5.4. Recompte de microorganismes, pol·len i espores 46
5.5. Tècniques microscòpiques 47
5.6. Bioassajos 49
5.6.1. Immunoassaig 49
5.6.2. Assajos de toxicitat 51
5.7. Proves genètiques 51
5.8. Assajos químics 52

6. Avaluació..... 53
6.1. Absència de criteris numèrics de valoració 53
6.1.1. Absència de base científica 53
6.1.2. Manca d'informació sobre efectes irritants, tòxics o al·lèrgics 54
6.1.3. Agents infecciosos 54
6.1.4. Contaminants d'origen biològic analitzables 55
6.2. Pautes per a l'avaluació de l'exposició a agents biològics 55
6.3. Criteris d'interpretació de resultats 57
6.3.1. Virus 57
6.3.2. Bacteris 58
6.3.3. Endotoxines 58
6.3.4. Fongs 58
6.3.5. Micotoxines 59
6.3.6. Protozous 60
6.3.7. Antígens 60

Exercicis d'autoavaluació..... 61

Solucionari..... 64

Bibliografia..... 65

Introducció

Els agents biològics poden accedir a l'interior de l'organisme humà per les mateixes vies de penetració que els contaminants químics, encara que en aquest cas la via parenteral, sobretot, i la digestiva són també importants. Quan l'agent es troba en suspensió a l'aire, sol o dipositat en un aerosol, es parla de l'existència d'un **bioaerosol**, la mesura i avaluació del qual analitzarem en aquest mòdul.

Es defineixen els **agents biològics** com a microorganismes, amb inclusió dels genèticament modificats, cultius cel·lulars i endoparàsits humans, susceptibles d'originar qualsevol tipus d'infecció, al·lèrgia o toxicitat. Es consideren també inclosos els agents no convencionals associats amb les encefalopaties espongiformes transmissibles anomenats *prions*.

Un **microorganisme** és qualsevol entitat microbiològica, cel·lular o no, capaç de reproduir-se o de transferir material genètic, mentre que un **cultiu cel·lular** es defineix com el resultat del creixement *in vitro* de cèl·lules obtingudes d'organismes multicel·lulars i **paràsit** com un ésser viu que viu i es nodreix a costa d'un altre sense aportar-li cap benefici; quan l'ésser viu parasitat és l'home, es diu *paràsit humà*.

De la definició d'*agent biològic* cal remarcar que el dany a l'organisme afectat no solament són infeccions, sinó també respostes al·lèrgiques i efectes tòxics. D'altra banda, i encara que no s'indica expressament en aquesta definició, el concepte de *contaminant biològic* també inclou substàncies generades per ells i, fins i tot, parts d'ells mateixos. Finalment, es diu ***vector*** l'animal que transmet una malaltia sense patir-la ell mateix.

En abordar la contaminació biològica s'inclouen els efectes tòxics i al·lèrgens causats per substàncies generades per organismes vius, les més importants de les quals són les micotoxines, substàncies provinents dels fongs que poden presentar nivells de toxicitat molt elevats, com és el cas de les aflatoxines, tricotecens i ocratoxines. En la mateixa classificació formal dels agents biològics, s'hi inclou la capacitat de produir toxines o de generar efectes al·lèrgens.

Lectures recomanades

Vegeu les notes tècniques següents:

"NTP 351: Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales"

"NTP 802: Agentes biológicos no infecciosos: enfermedades respiratorias"

Cal recordar també que els aspectes legals dels procediments que cal aplicar i la manera de gestionar la protecció dels treballadors exposats a agents biològics estan establerts per la legislació, concretament per l'RD 664/97.

Lectura recomanada

Reial decret 664/1997, de 12 de maig, sobre la protecció dels treballadors contra els riscos relacionats amb l'exposició a agents biològics durant la feina.

L'avaluació de riscos per exposició a agents biològics de què tractem aquí es basa en el procés típic d'**identificar**, **mesurar**, **avaluar** i obtenir conclusions amb les recomanacions corresponents de les correccions que cal efectuar si escau.

D'entrada, doncs, hem de procedir a **identificar** els possibles agents biològics presents. En la taula 1 es resumeix la classificació dels agents biològics segons la seva perillositat.

Taula 1. Classificació dels agents biològics en grups de perillositat

Grups de risc dels agents biològics			
Agents biològics del grup de risc	**Risc infecciós**	**Risc de propagació a la col·lectivitat**	**Profilaxi o tractament eficaç**
1	Poc probable que causi malaltia	No	Innecessari
2	Poden causar una malaltia i constituir un perill per als treballadors	Poc probable	Possible generalment
3	Pot provocar una malaltia greu i constituir un perill seriós per als treballadors	Probable	Possible generalment
4	Provoquen una malaltia greu i constitueixen un perill seriós per als treballadors	Elevat	No conegut actualment

El primer pas és comprovar si la presència d'aquests agents en l'ambient de treball es pot eliminar per substitució de l'agent, procés o tècnica. Dit d'una altra manera, si és imprescindible usar l'agent concret en les condicions en què s'usa, o bé si hi és present segons el tipus de material tractat o activitat desenvolupada. En els casos en què no sigui possible prescindir de l'agent i hi pugui haver exposició, procedirem a avaluar-la, i en determinarem la naturalesa, el grau i la durada. Aquesta avaluació l'haurem de repetir periòdicament i sempre que, o es produeixi un canvi en les condicions de feina, o hàgim detectat una infecció, al·lèrgia o toxicitat que es puguin relacionar amb una exposició.

L'avaluació s'efectuarà tenint en compte tota la informació disponible i, en particular:

- La naturalesa dels agents biològics i el grup al qual pertanyen.
- Les recomanacions de les autoritats sanitàries.
- La informació sobre les malalties, i també els seus efectes al·lèrgics o tòxics.
- La detecció d'una malaltia directament lligada a la feina.
- El risc addicional per als treballadors especialment sensibles.
- La concentració d'agents biològics determinada a l'aire.

Quant a l'últim punt, en molts casos no es podrà obtenir una valoració ambiental quantitativa semblant a les que es fan en l'avaluació de l'exposició a agents químics. Això es deu, d'una banda, als problemes de representativitat associats al mostreig de bioaerosols, i, de l'altra, al fet que no hi ha establerts criteris de valoració numèrics per a aquest tipus de contaminants que permetin emetre un judici ràpid sobre la perillositat de la situació. La publicació *TLVs. Valores límite para sustancias químicas y agentes físicos en el ambiente de trabajo. BEIs. Índices biológicos de exposición* de l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) justifica les raons que, de moment, fan impossible l'establiment d'aquests criteris.

Lectura recomanada

La publicació anual *ACGIH Threshold limit values (TLVs®) and biological exposure indices (BEIs®)*, i també altres documents que hi estan relacionats no estan disponibles gratuïtament a Internet, però es poden adquirir a la pàgina web d'ACGIH.

Aquestes limitacions fan que la metodologia d'avaluació de l'exposició a agents biològics necessiti un treball previ d'anàlisi en el qual, partint de la màxima informació disponible sobre l'activitat laboral en estudi, es puguin definir les eines que s'utilitzaran per a aconseguir l'objectiu plantejat, que no és altre que evitar o limitar l'exposició.

Aquestes eines consisteixen en:

- Planificació de la mesura.
- Disseny d'uns criteris de valoració.
- Selecció de les mesures de prevenció i control de l'exposició.

Totes estan íntimament relacionades, per la qual cosa la seva definició ha de ser simultània. La conclusió final establirà, pràcticament per a cada situació de treball, una metodologia d'avaluació específica que, en general, no serà extrapolable a altres situacions de treball en les quals hi pugui haver una exposició a agents biològics, per similars que siguin.

Una vegada duta a terme l'avaluació de riscos preceptiva, ens podem trobar enfront de diferents situacions, que es resumeixen en la figura 1:

- Si l'exposició és deliberada, s'han d'aplicar les mesures que s'exposen en aquest mòdul.

- Si l'exposició es refereix a un agent biològic del grup 1 o a gèrmens vius atenuats (vacunes), s'han d'observar els principis de correcta seguretat i higiene professional, sense ser necessari aplicar-hi altres mesures complementàries.

- Si l'exposició no implica la intenció deliberada de manipular agents biològics, però hi pot haver una exposició, s'ha d'actuar segons els resultats de l'avaluació de riscos. Si se'n deduís que amb les mesures existents no n'hi ha prou, s'haurien d'aplicar les mesures que s'exposen en aquest mòdul. A continuació, presentem una llista d'exemples d'activitats sense intenció deliberada de manipulació.

Exemples de manipulació deliberada

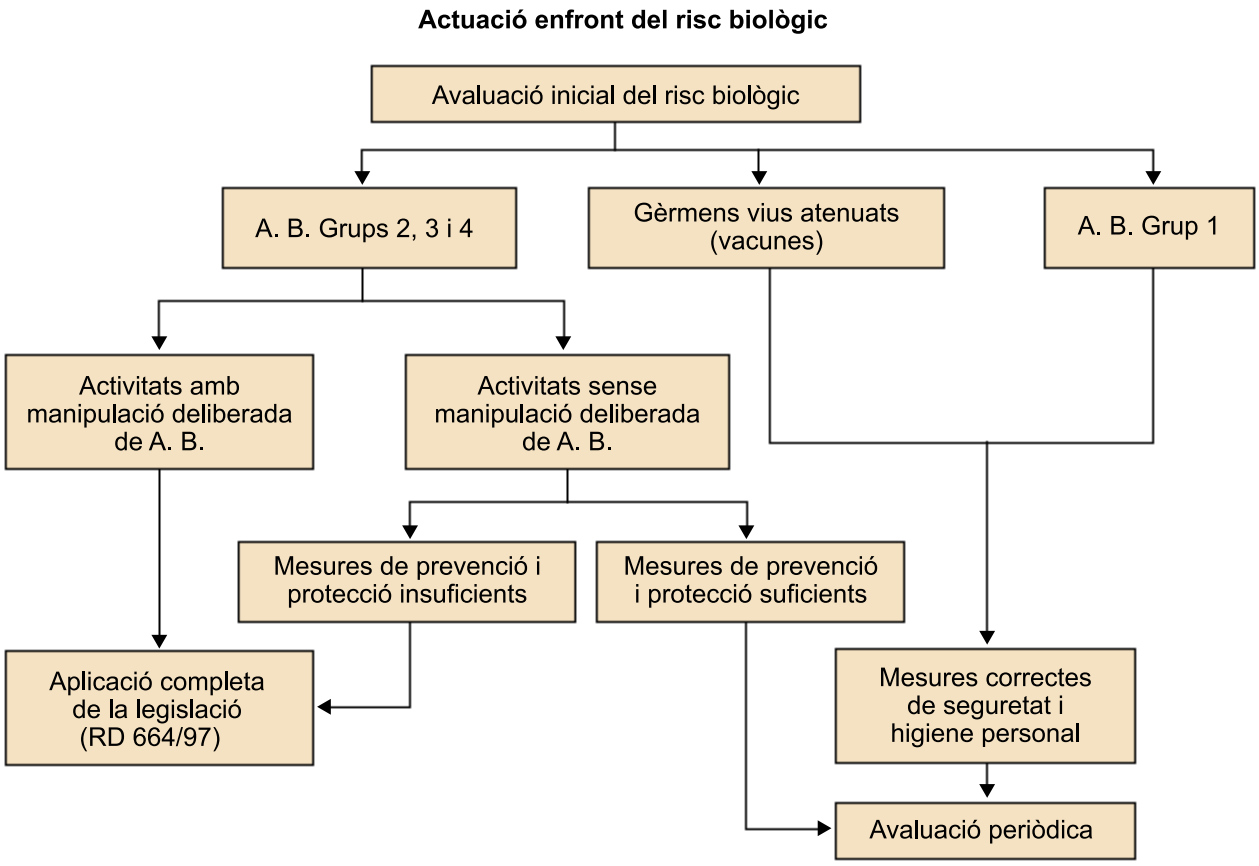
Uns exemples de manipulació deliberada són els laboratoris de diagnòstic microbiològic, els treballs amb animals infectats deliberadament i en instal·lacions industrials que utilitzin agents biològics en grans quantitats.

Llista indicativa d'activitats que es consideren amb intenció no deliberada de manipulació d'agents biològics

- Treballs a centres de producció d'aliments.
- Treballs agraris.
- Activitats en les quals hi ha un contacte amb animals o amb productes d'origen animal.
- Treballs d'assistència sanitària, compresos els desenvolupats en serveis d'aïllament i d'anatomia patològica.
- Treballs a laboratoris clínics, veterinaris, de diagnòstic i de recerca, **a exclusió dels laboratoris de diagnòstic microbiològic, ja que es considera manipulació deliberada**.
- Treballs a unitats d'eliminació de residus.
- Treballs a instal·lacions depuradores d'aigües residuals.

Font: annex I, RD 664/97

Figura 1. Avaluació del risc biològic



En l'apartat corresponent a la reducció de riscos de l'RD 664/97 s'indica que, quan sigui necessària i tècnicament possible, s'haurà de dur a terme la verificació de la presència dels agents biològics utilitzats a la feina fora del confinament físic primari. Recórrer a la **mesura** dels agents biològics a l'aire per a la seva comparació amb criteris de valoració, com hem comentat, no sol ser una mesura gaire freqüent. Igual que ocorre amb els contaminants químics, aquí poden ser aplicables procediments d'avaluació simplificada.

Lectura recomanada

El procediment per a dur a terme una avaluació simplificada del risc biològic s'exposa en la nota tècnica NTP 833:

"NTP 833: Agentes biológicos. Evaluación simplificada"

D'altra banda, també es pot mesurar la presència dels agents biològics en superfícies i en líquids. En aquests casos, es prenen mostres per contacte en el cas de les superfícies i, si es tracta de líquids, es determinen directament en el líquid.

Els procediments usats per a la captació de bioaerosols que es puguin conrear són:

- la **sedimentació**, usant càpsules de **Petri** obertes que recullen els microorganismes per gravetat (de les quals no tractarem aquí per la seva falta d'interès en higiene industrial), o

- la **impactació**, consistent a forçar el contacte d'un volum d'aire conegut amb el mitjà de cultiu en el qual quedaran retinguts. Aquestes plaques, portades a les condicions adequades, provoquen la formació de colònies i el seu recompte posterior; el resultat s'expressa en ufc/m^3 (unitats formadores de colònies per metre cúbic).

Per als agents que es puguin trobar a l'aire en forma d'espores, com, per exemple, el pol·len, se sol utilitzar la **filtració** fent servir diversos materials filtrants i se citen com a microorganismes comptables, la qual cosa dóna com a resultat el seu nombre per metre cúbic. Si la filtració es duu a terme en condicions que garanteixin la supervivència de l'agent, també es pot procedir al seu cultiu posterior.

El segon pas és la **identificació** de les espècies microbianes captades, que s'inicia amb una primera observació macroscòpica de l'aspecte, forma, color, etc. de la colònia. Aquesta observació va seguida, en el cas dels bacteris, d'una tinció de Gram i de l'observació microscòpica, que permetrà la seva classificació en dos grups: bacteris grampositius i gramnegatius. A partir d'aquí s'utilitzen diferents proves que permeten la caracterització del bacteri fins a la seva classificació completa en gènere i espècie. La identificació de fongs, després de l'observació macroscòpica, continua amb l'observació microscòpica d'un tall de la colònia que permetrà identificar l'estructura vegetativa del fong, i també la forma de les seves espores, cosa que conduirà a identificar el gènere i l'espècie.

El tercer pas de la metodologia d'avaluació és la **valoració**, la qual, com que està sotmesa a discussió la utilització de límits quantitatius, presenta dificultats. Quan apareixen espècies patògenes la conclusió és sempre que es tracta d'una situació de risc. Quan es tracta d'espècies banals, la valoració depèn de molts factors, per la qual cosa difícilment pot ser concloent. Una solució operativa és prendre mostres de l'aire proper al lloc estudiat (per exemple, a l'exterior més proper) i fer una comparació qualitativa i quantitativa.

Lectura recomanada

Els criteris de valoració per a l'avaluació de l'exposició a agents biològics basada en la seva determinació qualitativa i quantitativa a l'aire s'exposen en la nota tècnica NTP 409:

"NTP 409: Contaminantes biológicos: criterios de valoración"

Objectius

Amb l'estudi d'aquest mòdul es persegueixen els objectius següents:

1. Conèixer les bases de l'avaluació d'agents biològics.

2. Conèixer la mecànica del procés d'avaluació de l'exposició a agents biològics.

3. Identificar els principals procediments de mesura d'agents biològics a l'aire.

4. Ser capaços de dissenyar una sèrie de mesures per a obtenir un resultat fiable.

5. Conèixer els mecanismes de la determinació d'agents biològics en superfícies i líquids.

6. Conèixer els principals procediments d'anàlisi microbiològica i química de les mostres.

7. Conèixer les limitacions dels mecanismes d'avaluació dels resultats.

8. Ser capaços d'obtenir conclusions raonades sobre el risc per exposició a agents biològics.

1. Aspectes bàsics en la mesura d'agents biològics

La mesura d'agents biològics a l'aire, que implica prendre'n mostres i analitzar-les, ha de proporcionar la informació bàsica per a la presa de decisions i perquè això sigui així, s'ha de tenir la garantia que les mesures fetes són fiables i representatives de l'exposició.

Fins on sigui possible, la proporció relativa d'un agent biològic en una mostra hauria de reflectir la seva proporció en el material original. Per a aconseguir aquest objectiu, la mostra ha de ser manipulada de tal manera que no es deteriori o pugui ser contaminada durant la captació, el transport i l'anàlisi, i que els agents biològics experimentin els mínims canvis possibles. No obstant això, l'experiència ens diu que els resultats obtinguts en una mesura ambiental no són sempre fiables, fàcils d'interpretar i que unes dades incompletes sobre l'exposició a bioaerosols poden confondre i complicar un estudi, cosa que condueix a conclusions errònies.

Per tant, en iniciar l'avaluació d'una possible exposició a agents biològics cal tenir clar de quina manera la mesura en pot ajudar o complicar la resolució. L'experiència professional i el coneixement sobre els agents biològics són la clau a l'hora de decidir efectuar o no la mesura, que no sempre serà possible o necessària.

Si optem per dur a terme la mesura, ha de donar resposta a les diverses qüestions que n'han de guiar la planificació. Partint de la pregunta **per què cal mesurar?**, podrem definir l'objectiu de la mesura per a passar a tractar a continuació la resta de preguntes. Una estratègia de mostreig ha de donar, doncs, resposta a les qüestions següents:

- **Per què** mesurem.
- **Quins** agents biològics dels que componen un bioaerosol s'han de mesurar.
- **On** s'han de prendre les mostres.
- **Quan** s'han de prendre les mostres.
- **Com** s'han de prendre les mostres, és a dir, de quins recursos es disposa per a fer la mesura.
- **Quantes** mostres s'han de prendre per a minimitzar les limitacions que representa el mostreig i que, en línies generals, comprenen el temps, les persones, els equips, els recursos analítics, etc.

És funció de l'higienista expert en agents biològics decidir, cas per cas, com ha d'aconseguir els seus objectius sense comprometre la credibilitat, la representativitat i la integritat de les dades obtingudes. A continuació, exposarem els aspectes que cal considerar en plantejar-se la mesura d'agents biològics a l'aire.

Aspectes per considerar en la mesura d'agents biològics a l'aire

- La naturalesa i els nivells previsibles d'agents biològics.
- La caracterització de l'exposició (concentració mitjana, la pitjor situació, etc.).
- La idoneïtat, el cost i la disponibilitat dels equips de presa de mostres.
- El cost i disponibilitat dels diversos mètodes d'anàlisi.
- Les limitacions que el mètode d'anàlisi pugui imposar al mostreig.
- Les limitacions que poden representar el temps i el transport de les mostres al laboratori.
- L'experiència dels tècnics (prevencionistes, analistes, etc.).

Font: INSHT. *NTP 608: Agentes biológicos: planificación de la medición.*

L'estratègia de mostreig, a més, ha d'incloure les especificacions sobre:

- Els agents biològics que s'estudiaran.
- Els focus de contaminació típics dels agents biològics.
- La concentració previsible.
- La variabilitat en l'espai per a cada agent.
- La variabilitat en el temps per a cada agent.
- Els mètodes analítics que s'utilitzaran per a detectar, quantificar i identificar els agents biològics.
- Els equips i mètodes més idonis per a la captació dels agents biològics.

Exemple 1

En un estudi sobre la qualitat d'aire interior en un edifici d'oficines ventilat mecànicament es planteja la necessitat d'avaluar l'exposició a agents biològics. La informació disponible dirigeix l'estudi cap a la possible presència i dispersió de bacteris i fongs en el sistema de ventilació i climatització.

Això implica tenir en compte gairebé la totalitat dels components d'un bioaerosol, la qual cosa implicarà la selecció (tipus i nombre) dels equips de mostreig que seran necessaris. Aquest aspecte pot quedar condicionat per la disponibilitat d'aquests equips i els mètodes d'anàlisi corresponents per als diferents agents biològics, els quals, al seu torn, poden condicionar la selecció de l'equip més adequat.

Els criteris de valoració, en aquest cas, s'hauran de basar en la comparació (concentracions i tipus d'agents) entre l'ambient problema i un altre considerat com a referència, la qual cosa comportarà definir les zones on es prendran les mostres. Sense esmentar el nombre de mostres que seran necessàries per a assegurar la representativitat del mostreig i per a minimitzar la variabilitat dels resultats, i el cost econòmic que tot això pugui representar.

Exemple 2

En el mateix estudi que en l'exemple anterior, la informació disponible dirigeix l'estudi cap a la possible presència de legionel·la en alguna de les instal·lacions.

En aquest cas, la metodologia canvia. D'una banda, és coneguda la dificultat tècnica que hi ha per a detectar i demostrar la presència d'aquest bacteri a l'aire i, de l'altra, se'n coneixen àmpliament els requisits vitals, focus de contaminació més probables i les mesures que n'impedeixen la proliferació en els focus de contaminació. Tot això fa innecessari ferne una mesura ambiental, però sí que serà necessària una presa de mostres de l'aigua de la instal·lació i de mostres biològiques dels afectats per a confirmar la hipòtesi establerta, és a dir, la presència del bacteri i la possible afectació de les persones exposades.

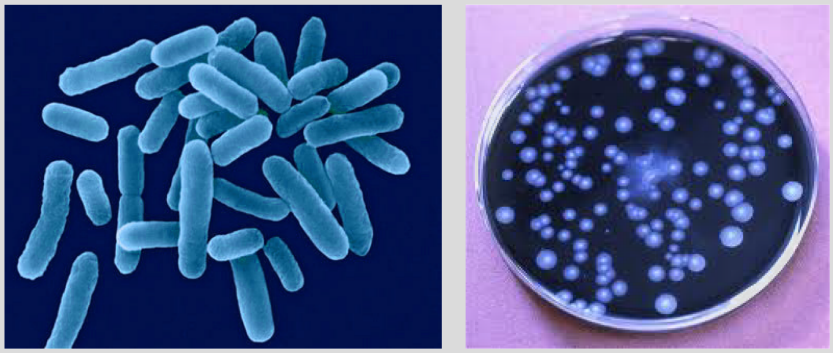
Fins i tot tractant-se d'un mateix lloc de treball les metodologies d'avaluació poden ser diferents segons l'agent biològic buscat.

Legionel·la

L'estiu de 1976 hi va haver un brot epidèmic durant la convenció anual de la Legió Americana, que va tenir lloc en un hotel de Filadèlfia. Entre els 4.000 assistents a la convenció es van detectar 221 casos de pneumònia, que van provocar la mort de 34 persones, com a resultat de l'exposició a un agent infecciós no identificat. La malaltia del legionari, com la va batejar ràpidament la premsa, va comportar un repte per als investigadors. Però no va ser fins a l'any següent que el Centre de Control de Malalties (CDC[1]) va identificar l'agent causal i el va denominar *Legionella pneumophila* (figura 2).

Figura 2. *Legionella pneumophila*

a. **b.**



a) Rocío Guerrero (2010). *Legionella pneumophila* al microscopi electrònic. **b)** GEFOR (2012). Cultiu de *Legionella pneumophila*

El descobriment va posar en marxa diversos estudis retrospectius mitjançant els quals es van poder atribuir a l'agent nou els casos de brots pneumònics ocorreguts en dècades anteriors i que encara romanien sense explicar. L'agent nou va resultar ser un

[1] Sigla de Center for Disease Control.

Lectures recomanades

Consulteu aquests aspectes i d'altres en les notes tècniques següents:

"NTP 538: Legionelosis: medidas de prevención y control en instalaciones de suministro de agua"

"NTP 691: Legionelosis: revisión de las normas reglamentarias (I). Aspectos generales"

"NTP 692: Legionelosis: revisión de las normas reglamentarias (II). Medidas específicas"

Legislació espanyola sobre legionel·losi:

Reial decret 865/2003, pel qual s'estableixen els criteris higienicosanitaris per a la prevenció i per al control de la legionel·losi.

bacteri gramnegatiu de forma bacil·lar, ubic en mitjans aquàtics naturals, llacs, rius, rierols, llots, etc.; que també sobreviu en petites quantitats en els sistemes potabilitzadors d'aigua, i que pot ser transportat per l'aigua als edificis on pot colonitzar les instal·lacions de subministrament d'aigua i els sistemes de condicionament de l'aire.

La legionel·la creix en aigua a temperatures compreses entre 20 °C i 50 °C, amb un desenvolupament òptim entre 35 °C i 45 °C. Per sota dels 20 °C roman latent, sense multiplicar-se, i no sobreviu per sobre dels 60 °C. Altres factors que tenen influència en el seu desenvolupament són els següents: el pH de l'aigua (sobreviuen bé en intervals de pH que oscil·len entre 2 i 9,5); necessiten la presència de L-cisteïna i de sals de ferro, i s'ha comprovat que la presència d'altres formes de vida com les algues i els protozous li atorguen, en ser parasitades, un grau de protecció addicional enfront dels tractaments de l'aigua. La seva supervivència a l'aire és curta a causa de la poca resistència que presenten a la dessecació i a l'efecte de la radiació ultraviolada.

S'han identificat, almenys, 35 espècies i 54 serogrups de legionel·la, almenys 20 d'aquestes espècies estan relacionades amb malalties humanes. Més del 80% de tots els casos de legionel·losi han estat causats per *Legionella pneumophila* serogrup 1.

Com que amb certa freqüència n'apareixen brots epidèmics, actualment hi ha una legislació específica per a la seva prevenció i el seu control. A part d'aquesta, també hi ha legislació pròpia en la majoria de comunitats autònomes.

1.1. Per què mesurem

Hi ha diverses raons que poden fer prendre la decisió de mesurar la presència d'agents biològics a l'aire:

- Per a acomplir als requisits legals, com la verificació, quan sigui necessària i tècnicament possible, de la presència dels agents biològics utilitzats a la feina fora del confinament físic primari, tal com estableix l'RD 664/97.
- Per a obtenir dades epidemiològiques.
- Per motius d'interès científic i de recerca.
- Per a conèixer l'existència d'una exposició.
- Per a localitzar focus de contaminació.
- Per a comprovar l'eficàcia de les mesures de control.
- Per a mesurar l'alliberament de bioaerosols, tant si s'ha produït de manera accidental com deliberada.

En termes generals, la mesura serà útil per a comprovar les hipòtesis elaborades per a explicar l'exposició a agents biològics.

1.2. Què mesurem

Els bioaerosols són barreges complexes de microorganismes, de partícules derivades dels microorganismes o que contenen microorganismes, suspeses a l'aire. Inclouen microorganismes vius, cultivables i no cultivables, microorga-

nismes morts, els seus fragments, toxines i partícules producte dels rebutjos de tot tipus de matèria viva, que poden causar determinats efectes adversos per a la salut.

Els bioaerosols són omnipresents en la naturalesa, per la qual cosa les persones estan exposades repetidament, dia rere dia, a una àmplia varietat d'aquests contaminants. No obstant això, depenent de l'activitat desenvolupada, es pot perfilar la composició dels bioaerosols, és a dir, determinar els agents biològics més probables associats al sector d'activitat i les diferents formes en què poden ser presents.

La composició del bioaerosol ens determina quins equips de mostreig seran necessaris, i la disponibilitat de tècniques analítiques apropiades per a detectar els components del bioaerosol ens fixa les limitacions de la mesura.

1.3. On i quan mesurem

La decisió sobre on i quan mesurem depèn també de l'objectiu de la mesura. Normalment, es tracta d'establir les exposicions mitjanes dels treballadors o de caracteritzar l'exposició més adversa.

En general, sol ser necessari conèixer els nivells de fons o de la situació més favorable, que es pot establir mesurant a l'exterior, a zones preses com a control o durant períodes d'inactivitat. Això implica obtenir informació sobre les activitats específiques, els processos, els possibles focus de contaminació i sobre la resta de factors que puguin intervenir en l'exposició.

Per a establir exposicions mitjanes que representin una població, les mostres han de cobrir el rang complet d'exposicions i utilitzar una estratègia que permeti emetre una opinió amb garanties, mentre que per a determinar l'exposició més desfavorable, les mostres s'haurien de prendre prop dels focus de contaminació coneguts o sospitats, dels treballadors simptomàtics, o dels treballadors que poden tenir o es pensa que tenen l'exposició més alta.

A continuació, presentem una estratègia per a la presa de decisions sobre com i quan mesurem.

Estratègia per a planificar on mostregem

- Identificar provisionalment els focus de contaminació i estimar la possibilitat de generació d'aerosols. Intentar predir els gradients espacials i temporals de bioaerosols.

- Identificar les zones en les quals hi pot haver diferències en la composició i concentració dels bioaerosols, per exemple a l'exterior i a l'interior o a les proximitats del focus de contaminació i a les àrees definides com a **control**.

- Identificar els treballadors que poden patir les exposicions més altes i les més baixes.

- Identificar les zones a les quals es pot tenir accés o no.

- Seleccionar almenys una (preferiblement tres) de les localitzacions següents:
  - On s'hagi anticipat una exposició alta.
  - On s'hagi anticipat una exposició baixa.
  - A l'exterior, prop de les preses d'aire de l'edifici.

- Si escau, mostrejar a més les zones següents:
  - A l'exterior, prop de fonts potencials (reservoris) de contaminació que pogués entrar a l'edifici.
  - A l'exterior, en una zona prou allunyada dels focus potencials de contaminació.

Els **límits d'exposició laboral** s'estableixen com a concentracions permissibles per a un temps habitual de vuit hores al dia i quaranta hores setmanals, o de quinze minuts per a exposicions de curta durada, determinats segons si els possibles efectes són de tipus crònic o agut.

Per a l'estudi dels **riscos per a la salut a llarg termini o crònics**, els mètodes de mesura recomanables són els que permetin temps de mostreig llargs, com, per exemple, els equips de presa de mostra en filtres. No obstant això, és obvi que aquest mètode és aplicable a organismes comptables, però no quan es tracta de determinar agents biològics vius i cultivables, ja que la seva supervivència és difícil en mostrejos llargs i, d'altra banda, la instrumentació més habitual està programada per a mostrejos curts. Per a estudiar-ne els **efectes aguts**, el que seria desitjable seria poder caracteritzar els pics d'emissió de la contaminació. És probable, encara que no segur, que aquesta emissió ocorri quan l'activitat sigui màxima, i per tant el mostreig durant la pitjor situació pot ajudar a identificar-los.

Exemples

Planificació del mostreig per a l'avaluació de la contribució del sistema de ventilació a la presència d'espores fúngiques a l'aire interior:

1) Exterior

- En una zona allunyada de les fonts de bioaerosol més òbvies. Això proporciona la línia de base inicial corresponent a la millor qualitat de l'aire exterior.
- En un punt proper a la presa d'aire del sistema de ventilació. Això proporciona la línia de base que correspondria a la qualitat de l'aire que entra a l'edifici.

2) Interior

- En una zona propera als difusors de subministrament d'aire. Això proporciona informació sobre l'aire distribuït pel sistema de ventilació. Es recomana fer el mostreig de la manera següent:
  - Quan el sistema de ventilació hagi estat parat almenys durant una nit (preferiblement, durant un cap de setmana).
  - Immediatament després de posar en marxa el sistema, orientat el mostrejador de tal manera que l'aire entri directament del difusor al suport de captació.
  - Després que el sistema faci uns 30 minuts que funciona.
  - Almenys en tres punts de l'espai ventilat prenent les mostres a l'altura de la zona respiratòria dels ocupants. Això proporciona informació sobre l'exposició dels ocupants.

1.4. Com mesurem

La selecció dels equips de mesura depèn:

- De la naturalesa dels agents biològics que s'hagi decidit mesurar.
- De l'assaig analític per a la seva identificació o quantificació.
- Dels llocs i períodes en els quals s'hagi de prendre la mostra.

Els **equips de presa de mostra** utilitzats més sovint per a la captació de bioaerosols són els impactadors inercials, els flascons rentadors de gasos (*impingers*) i els equips de presa de mostra amb filtre.

Respecte als **mètodes de detecció i assaig** de bioaerosols, els més comuns són el cultiu dels microorganismes, que comporta el recompte de colònies formades i la identificació dels microorganismes crescuts al laboratori, i l'observació al microscopi de grans de pol·len, espores fúngiques i altres partícules característiques.

Altres mètodes d'assaig (biològics, químics o moleculars), alguns en fase de desenvolupament, són els utilitzats per a determinar la concentració d'alguns components del bioaerosol, per exemple al·lèrgens, endotoxines, ergosterol, micotoxines. Aquest tipus d'assajos presenten una sèrie d'avantatges, ja que permeten utilitzar sistemes de presa de mostra més eficaços (**filtració**), la presa de mostres personals, ofereixen més sensibilitat i són menys susceptibles a les interferències.

Al·lèrgens, endotoxines i ergosterol

Al·lèrgens: substàncies que poden induir una reacció d'hipersensibilitat (al·lèrgica) en persones susceptibles, que han estat en contacte prèviament amb l'al·lergen. Uns exemples característics d'al·lèrgens són el pol·len de la gespa, dels arbres i de les herbes; les

espores de la floridura; la caspa del pèl dels gats, gossos i d'altres animals; els enderrocs de les paneroles i els insectes (àcars) de la pols domèstica.

Endotoxines: components de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius constituïda per lípids i polisacàrids.

Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol): és un esterol, precursor biològic (provitamina) de la vitamina D_2.

1.5. Quantes mostres s'han de prendre

El nombre de mostres que s'han de prendre està associat a:

- L'objectiu de la mesura.
- La variabilitat espacial i temporal del paràmetre mesurat.
- Les limitacions de l'equip.
- Les possibilitats logístiques per a efectuar l'estudi. Les mesures i les diferències entre conjunts de mostres són més precisos com més gran sigui la grandària de la mostra, i s'entén com a **grandària** el nombre de mostres.

En la taula 2 es resumeix una proposta sobre el nombre de mostres necessari.

Taula 2. Nombre de mostres que cal prendre

Objectiu de la mesura	Propostes (per a cada punt de mostreig i cada tipus de mostra)
Exposició per inhalació (pitjor de les situacions)	Prendre tres o més mostres no aleatòries. Les mostres han de ser per duplicat, com a mínim per a totes les anàlisis.
Exposició per inhalació (concentració mitjana)	Mostrejar tres o més vegades en un dia, durant tres o més dies consecutius que siguin representatius. Les mostres han de ser per duplicat, com a mínim per a totes les anàlisis.
Estimació de l'interval de confiança de la mitjana	Prendre sis o més mostres.
Estimació de la variància d'un conjunt de mesures	Prendre onze o més mostres.

Font: INSHT. *NTP 608: Agentes biológicos: planificación de la medición.*

Per a caracteritzar completament l'exposició pot ser necessari repetir el mostreig durant diferents estacions climàtiques, ja que això pot afectar la presència i el desenvolupament d'agents biològics, o quan es modifiquin els patrons de l'activitat.

És convenient recordar que el **nombre de mostres** significa quantes mostres s'han de prendre per a cada tipus de paràmetre d'interès que s'hagi decidit mostrejar i no el nombre dels diferents tipus de mostra.

Si s'ha decidit prendre mostres per a caracteritzar l'exposició a fongs toxigènics, en la presa de mostres s'han d'utilitzar equips que permetin la captació per impactació directa en agar, la captació d'espores fúngiques en filtre i la captació de micotoxines; els mètodes d'assaig consisteixen en el recompte de colònies, la identificació al microscopi, l'examen de les espores al microscopi i l'anàlisi de micotoxines.

Tot això significa tres tipus diferents de mesures, cadascuna de les quals requerirà un nombre apropiat de mostres en cada ambient que serà avaluat.

1.6. Volum i temps de mostreig

El **volum d'aire aspirat** i el **temps de mostreig**, que depenen així mateix del cabal, estan relacionats pel mínim volum d'aire necessari per a detectar l'agent d'interès a una concentració determinada.

El **límit inferior de detecció (LID)** per a un mètode de presa de mostra d'un bioaerosol es pot establir segons:

- La mínima quantitat de material que el mètode analític pot detectar, per exemple, 1 ufc[2] per placa.
- L'eficàcia de conservació biològica del mètode d'assaig.
- El cabal d'aire al qual està calibrat el mostrejador.
- El temps màxim de mostreig que permet l'equip.

(2) Unitats formadores de colònies.

El **límit superior de detecció (LSD)** es pot establir de manera similar, però, en aquest cas, prenent en consideració el mínim temps de mostreig possible o si són possibles dilucions de les mostres.

El temps de mostreig òptim hauria de ser aquell prou llarg per a captar material en quantitat detectable i representativa i prou curt per a evitar la sobrecàrrega del suport de captació, que pot donar lloc a un resultat d'**incomptables**, i l'encavalcament, que pot originar colònies d'agregats de microorganismes o l'emmascarament de partícules en preparacions per al microscopi.

Els laboratoris haurien de proporcionar aquests límits juntament amb els resultats de les mostres, especialment el LID quan l'agent d'interès no ha estat trobat en les mostres. En aquest cas, tot el que es podria concloure és que l'agent en qüestió no es troba present al nivell del LID o per sobre d'aquest nivell.

Les variacions espacials i temporals de les concentracions de bioaerosols i els temps de mostreig curts, típics dels mostrejadors per impactació directa en el medi de cultiu, fan recomanable, com a mínim, planificar mostrejos seqüencials o simultanis, per duplicat, per a obtenir estimacions fiables de la concentració del bioaerosol. Quan sigui possible, i a condició que no es vegi afectada la supervivència dels agents biològics, els temps de mostreig llargs permetran reduir la variabilitat que es presenta quan s'utilitzen temps curts. D'altra banda, les mostres seqüencials de curta durada permeten obtenir informació sobre les fluctuacions de concentració i, alhora, estimar concentracions mitjanes.

La densitat de les colònies crescudes en un medi de cultiu afecta la fiabilitat del resultat. Com hem dit, massa colònies **incomptables** són difícils d'examinar i, de la mateixa manera, un recompte escàs pot donar una idea errònia de la concentració present en l'ambient. Quan s'utilitzen equips de mostreig en els quals la captació de les partícules del bioaerosol és per impactació directa en medi de cultiu, és important poder anticipar la concentració del bioaerosol, de manera que el cultiu de les plaques reveli una densitat superficial de colònies adequada.

En general, entre 25 i 250 colònies bacterianes i entre 10 i 60 colònies fúngiques serien el nombre idoni per a poder fer un bon recompte i identificació en plaques de cultiu de 100 mm de diàmetre. Una altra regla general que es pot utilitzar un màxim d'1 colònia per centímetre quadrat.

A tall d'exemple, en la taula 3 s'exposen les concentracions ambientals màxima i mínima adequades per a tres equips de presa de mostra, basades en la densitat òptima de colònies fúngiques i per a diferents temps de mostreig. Òbviament, és possible comptar una única colònia en una placa de cultiu; no obstant això, fins que el recompte no assoleix un valor d'aproximadament 10 colònies, la variabilitat que es presenta entre mostres preses simultàniament és molt gran, per la qual cosa aquestes mostres en les quals el recompte no supera el valor de 10 colònies no s'haurien de prendre en compte.

Taula 3. Intervals de concentració ambiental en diferents temps de mostreig

Equip de mesura	Àrea de la placa (cm^2)	Cabal d'aspiració (l/min)	Temps de captació (min)	Volum captat (m^3)	Concentració ambiental (ufc/m^3)	
					LID (10 ufc/placa)	LSD (1 ufc/cm^2)
Impactador multiorifici	78	28	0,5	0,014	710	5.570
			1,0	0,028	360	2.790
			5,0	0,142	70	549
			10,0	0,283	35	276
Impactador multiorifici	17	90	0,33	0,030	330	567
			0,66	0,059	170	288
			1,0	0,090	110	189
Impactador d'escletxa	177	50	1,0	0,050	200	3.540
			15,0	0,750	10	236
			60,0	3,0	3	59

Font: INSHT. *NTP 608: Agentes biológicos: planificación de la medición.*

Amb les dades del cabal de l'equip i la grandària del suport que utilitza, és possible triar la durada del mostreig sempre que es pugui anticipar com serà el rang de concentracions ambientals que és possible que hi hagi. Quan es desconeix o no es pot anticipar la concentració existent en un ambient, pot ser necessari fer mesures amb un tipus de mostrejador i diferents temps de mostreig per a cobrir els diferents intervals de concentració. Un sistema de càlcul utilitzat és utilitzant l'expressió següent:

$$t = \frac{dA}{C_a Q} \qquad (1)$$

en què t = temps de mostreig òptim (min); d = densitat volguda (ufc/cm^2); A = àrea de captació (cm^2); C_a = concentració ambiental previsible (ufc/m^3) i Q = cabal d'aspiració del mostrejador (l/min).

Una informació detallada sobre procediments d'avaluació d'agents biològics a l'aire es troba en la norma UNE-EN 13098, alguns dels aspectes més rellevants de la qual resumim a continuació.

Norma UNE-EN 13098

Norma UNE-EN 13098. Atmosferes al lloc de treball. Directrius per a la mesura de microorganismes i endotoxines en suspensió a l'aire (maig del 2001). La norma recull les directrius per a l'avaluació de l'exposició a microorganismes, excloent-ne virus, microorganismes patògens específics i toxines diferents de les endotoxines, encara que s'indica que les directrius poden ser les mateixes.

1.7. Eficàcia del mostreig

El disseny de la majoria dels equips per a mostreig de bioaerosols són adaptacions dels utilitzats per a la captació d'agents químics, bàsicament relacionades amb els suports de captació que s'han d'adaptar a les característiques dels agents biològics.

El principal condicionant, quan es tracta de captar microorganismes vius i cultivables, és que el material en el qual es recull el bioaerosol n'ha de permetre la supervivència fins a la seva anàlisi al laboratori. En conseqüència, han de proporcionar aliment i aigua i estar constituïts d'un material que no danyi les cèl·lules durant la captació. Per a això, s'utilitzen medis de cultiu, generalment, semisòlids, elaborats a base d'agar (substància gelatinosa extreta de l'alga agar-agar), a la qual s'afegeixen nutrients i altres productes que per si mateixos defineixen les propietats del medi. El mateix medi és la base dels assajos analítics posteriors per a la identificació de les espècies microbianes.

Quan el que es tracta de captar són formes resistents (espores, grans de pol·len, etc.) o productes (en realitat agents químics, com endotoxines, micotoxines o glucans), el suport de captació utilitzat més sovint és el filtre.

La norma UNE-EN 13098 defineix l'eficàcia tècnica del mostreig (ETM) com a:

$$ETM = EFM \times ECB \qquad (2)$$

en què:

$$EFM = EEA(1 - PE)EZC \qquad (3)$$

Per la qual cosa:

$$ETM = EEA(1 - PE) \times EZC \times ECB \qquad (4)$$

en què:

- ***EFM*** (eficàcia física del mostreig). Capacitat del mostrejador per a captar les partícules d'una grandària determinada que es troben suspeses a l'aire al lloc de treball.

- ***ECB*** (eficàcia de conservació biològica). Capacitat d'un mostrejador per a mantenir la viabilitat dels microorganismes presents a l'aire durant la captació conservant intactes els productes microbiològics.

- ***EEA*** (eficàcia de l'entrada de l'aire).

- ***EZC*** (eficàcia de la zona de captació). Expressada com el diàmetre aerodinàmic de tall d_{ae50}: la grandària de partícula a la qual la meitat de partícules seran captades.

- ***PE*** (pèrdues en altres elements de l'equip).

Per a la determinació experimental d'aquests paràmetres s'utilitzen, com a aerosols, partícules no viables, per exemple partícules de làtex o partícules de colorants, i diferents tipus de microorganismes (*Serratia marsescens*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*) i cambres de tres tipus: estàtiques, dinàmiques i túnels de vent.

2. Equips de mostreig d'aire

Els aerosols són captats en produir-se la separació de les partícules que els formen per l'acció de diferents forces físiques. Aquestes forces constitueixen, així mateix, la base per a la classificació dels mostrejadors en:

- **equips inercials** (impactadors, ciclons, equips centrífugs) i
- **equips de presa de mostra amb filtre**.

2.1. Mostreig inercial

La **inèrcia** de les partícules és la força que majoritàriament intervé en la seva separació de l'aire i és determinada per la massa i la velocitat de la partícula.

A la zona de captació dels equips inercials el corrent d'aire, que ha penetrat pel dispositiu d'entrada, és obligat a canviar de direcció i les partícules que conté, amb prou inèrcia, són separades del flux d'aire i impacten sobre una superfície. En els ciclons i equips centrífugs, l'efecte inercial està potenciat per l'acció centrífuga ocasionada pel disseny del mostrejador.

2.1.1. Mostrejador d'escletxa

En el mostrejador d'escletxa, l'aire penetra per una o quatre escletxes amb fluxos d'aire de 30 l/min i 700 l/min segons el model i és impulsat sobre la superfície d'impactació consistent en una placa amb medi de cultiu, un portaobjectes o una cinta adherent. La placa de cultiu permet la incubació, el recompte de colònies i la identificació de les espècies microbianes, mentre que els portaobjectes i les cintes permeten només l'observació directa al microscopi de les partícules captades. Aquests suports de captació poden ser estàtics o col·locats sobre un suport giratori dotat de diferents velocitats. No permeten obtenir informació sobre la distribució per grandària de partícula. El d_{ae50} calculat és de 0,67 μm. En la figura 3 es mostra un esquema d'aquest tipus de mostrejador.

Figura 3. Mostrejador d'escletxa
L'eficàcia de la zona de captació s'expressa com el diàmetre aerodinàmic de tall (d_{ae50}), que és la grandària de partícula a la qual la meitat de partícules seran captades. Font: INSHT. *NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I).*

2.1.2. Mostrejador Andersen

És un impactador en cascada que capta les partícules en una sèrie de plaques amb medi de cultiu a un cabal d'aire de 28,3 l/min. Sol tenir sis nivells de captació, cadascun separat del següent per un element perforat per 400 orificis, sota el qual es col·loca la placa amb medi de cultiu, amb orificis que van disminuint la grandària en baixar el nivell, la qual cosa provoca un augment de la velocitat de l'aire en passar d'un nivell a un altre. La captació es basa en la inèrcia de les partícules, que són retingudes de més grans a més petites, a mesura que passen d'un nivell al següent.

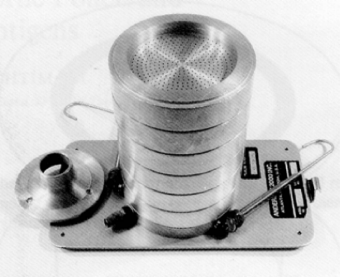
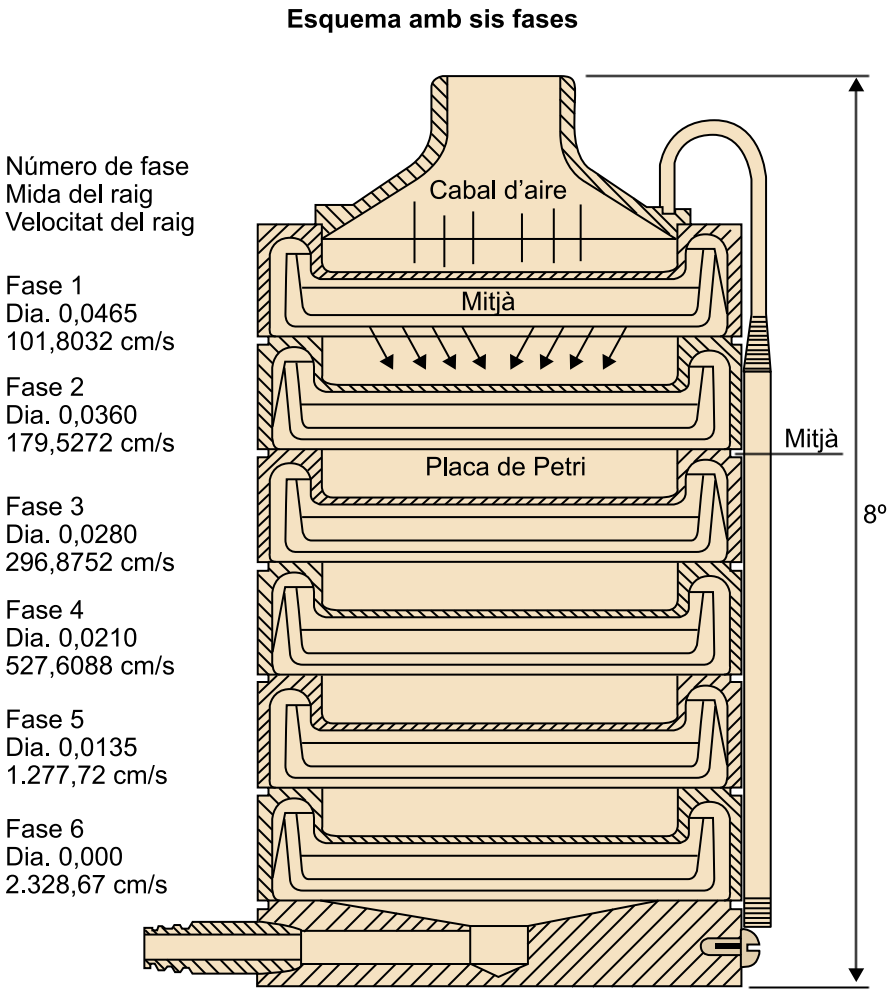


Figura 4. Mostrejador Andersen

El resultat final és una separació per grandària de partícula. Els diàmetres de tall teòrics van de 7 μm a 0,65 μm. També hi ha models amb un o dos nivells. Aquest mostrejador és un dels designats de referència en les proves d'assaig per a la validació d'altres mostrejadors. En la figura 4 es presenta una reproducció i un esquema d'aquest mostrejador.

Figura 5. Mostrejador Andersen



2.1.3. Mostrejadors multiorifici

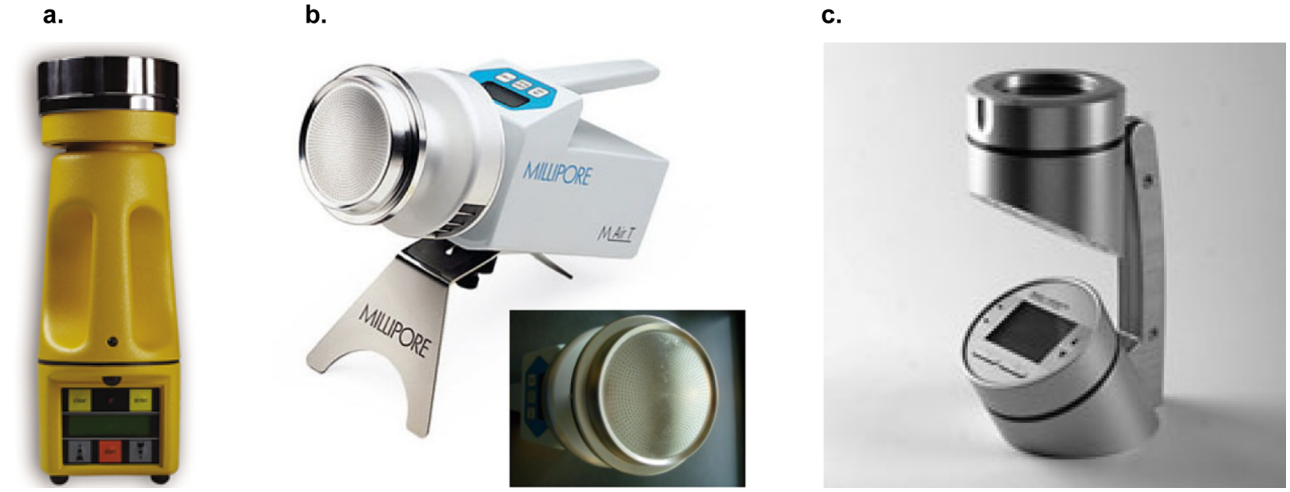
El **mostrejador SAS**[3] és un equip portàtil amb un únic nivell de captació basada en la inèrcia de les partícules. La captació té lloc en una placa RODAC® amb medi de cultiu. Hi ha dos models calibrats a dos cabals d'aire (90 l/min i 180 l/min). L'equip disposa d'un capçal amb 219 orificis, un ventilador i un programador del temps de mostreig (intervals de 20 segons), i permet un mínim de 20 segons i un màxim de 5 minuts. El diàmetre de tall teòric és de 2,0 μm. Alguns estudis comparatius elaborats amb aquest mostrejador i d'altres de referència, com el mostrejador Andersen, mostren una reducció de l'eficàcia de captació del 50%. En la figura 5 es mostren aquest mostrejador i d'altres de característiques similars com és ara el mostrejador **M air T** (Millipore®) o el mostrejador **MAS-100** (Merck®).

(3) *SAS* és la sigla de l'expressió anglesa *surface air system.*

Vegeu també

Podeu veure una placa RODAC® en la figura 12 del subapartat 3.2.1 d'aquest mòdul didàctic.

Figura 6. Mostrejadors multiorifici



a. SAS, **b.** M air T i **c.** MAS-100

2.1.4. Flascons rentadors de gasos

Els **flascons rentadors de gasos**[4] funcionen conduint un corrent d'aire a l'interior d'un flascó que conté un medi de captació, normalment, líquid. Les partícules són transferides al líquid seguint els principis de la impactació inercial ajudada per la dispersió de les partícules en les bombolles formades a la zona d'impactació.

(4) En anglès, *impingers*.

Com a líquid de captació es pot utilitzar qualsevol que sigui compatible amb l'assaig analític i l'agent biològic objecte d'estudi. Els líquids utilitzats més sovint són:

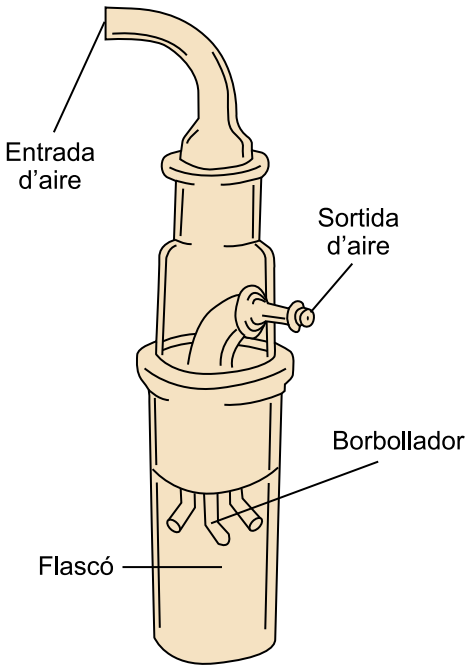
- aigua destil·lada,
- solucions salines tamponades o
- medis de cultiu diluïts.

A aquests líquids s'hi afegeixen els additius que es considerin necessaris per a millorar la supervivència dels microorganismes. També, i per a evitar problemes, a alguns s'hi sol afegir un antiescumejant. El volum de líquid amb el qual treballen habitualment aquests equips oscil·la entre 15 ml i 20 ml. La captació al medi líquid presenta certs avantatges sobre altres tipus d'equips i és que a partir d'una mostra es poden fer diferents assajos o determinar diferents components del bioaerosol. Mitjançant filtració del líquid es poden concentrar les partícules i la mostra pot ser utilitzada en la realització d'altres tipus d'assaig.

Figura 7. Flascó rentador de gasos multinivelll
Font: INSHT. *NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I)*

Un dels models utilitzats més àmpliament en la captació de bioaerosols és l'**AGI-30** (***all glass impinger***), que ha estat seleccionat com a mostrejador de referència. La xifra indica la distància que hi ha entre l'orifici de sortida de l'aire dins del flascó i el fons, i el cabal d'aire és de 12,5 l/min. Una modificació d'aquest mostrejador és el flascó rentador de gasos multinivell. Disposa de tres nivells i proporciona la distribució per grandària de partícula simulant la que ocorre en el sistema respiratori humà. Cada nivell conté un volum conegut de líquid de captació estèril. El disseny d'aquest equip redueix la velocitat d'injecció i minimitza les esquitxades i la formació d'escuma. Els diàmetres de tall teòrics són 1 μm, 4 μm i 10 μm i l'equip treballa a cabals d'aire entre 20 l/min i 55 l/min. Actualment, aquests equips es fabriquen en acer inoxidable. En la figura 8 es mostra un esquema d'aquests mostrejadors.

Figura 8. Mostrejadors per borbolleig



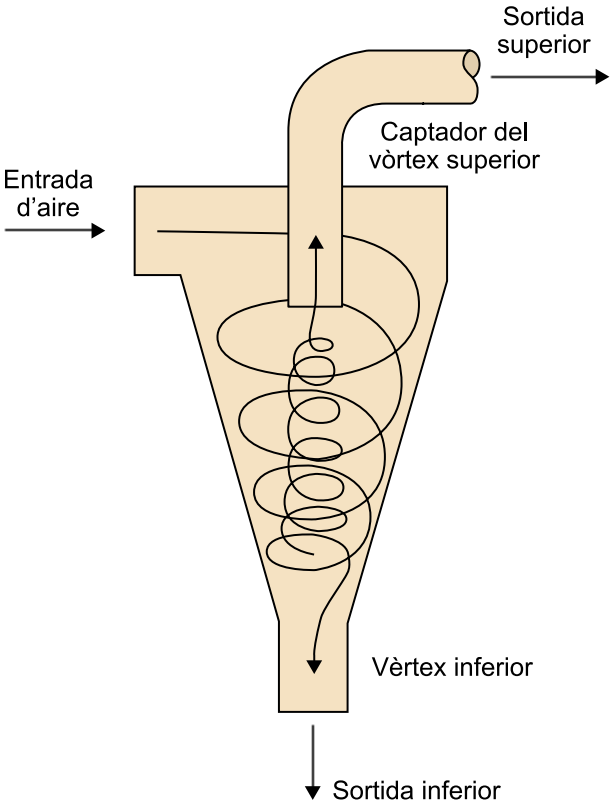
Flascó rentador de gasos.
Font: INSHT. *NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I).*

2.1.5. Ciclons rentadors

La captació de les partícules ocorre per impactació en un medi líquid que banya la superfície interior del cicló, potenciada per l'acció de la força centrífuga. El líquid amb les partícules és enretirat per la part inferior de l'equip. Els assa-

jos fets amb aquests equips per a determinar l'eficàcia de la captació revelen que a cabals de 500 l/min i velocitat de l'aire de 4 m/s, l'eficàcia de captació per a partícules de diàmetre aerodinàmic de 20 μm és entre un 70% i 110%. En la figura 9 es mostra un esquema d'aquests mostrejadors.

Figura 9. Esquema d'un cicló



Un **vòrtex** és un flux turbulent en rotació espiral amb trajectòries de corrent tancades.

2.1.6. Mostrejador RCS

Un **mostrejador RCS**[5] és un equip portàtil en el qual la impactació de les partícules ocorre potenciada per l'acció de la força centrífuga que un ventilador confereix a l'aire aspirat a la zona frontal de l'equip. Les partícules són recollides en cintes flexibles amb vasets que contenen medi de cultiu. El cabal d'aire és de 40 l/min i disposa d'un programador de temps (entre 30 segons i 8 minuts) que determina el volum d'aire mostrejat. La captació ocorre en un únic nivell, per la qual cosa no s'obté informació sobre la distribució per grandària de partícula. Una de les limitacions d'aquest equip és que no es pot precisar amb exactitud el cabal real d'aire, ja que és aspirat des d'una distància de 40 cm i l'aire expulsat ho fa envoltant la columna d'aire d'aspiració. Una versió millorada és l'**RCS plus**, en el qual, a diferència de l'anterior, l'entrada i sortida de l'aire estan separades. Aquest mostrejador opera a un cabal de 50 l/min. En la figura 10 es presenta una reproducció d'aquest mostrejador.

(5)*RCS* és la sigla de l'expressió anglesa *reuter centrifugal sampler*.

Figura 8. Mostrejador RCS

2.2. Filtració

La retenció de les partícules suspeses a l'aire en un material porós quan aquest el travessa és la **filtració**.

La captació d'una partícula depèn del seu diàmetre aerodinàmic, de la grandària del porus del filtre i del cabal d'aire que travessa el filtre. D'acord amb aquestes característiques es poden distingir quatre principis de captació de partícules: **cribatge**, **intercepció**, **impactació** i **difusió**.

La filtració és un dels sistemes que permet prendre mostres personals que representen millor el patró d'exposició dels treballadors. En general, els filtres són els suports de retenció més utilitzats quan es volen mostrejar els components del bioaerosol més resistents (bàsicament espores i pol·len), els productes (endotoxines, micotoxines, etc.) o quan la viabilitat dels microorganismes no és essencial per a l'assaig analític seleccionat.

L'equip de presa de mostres consisteix en una bomba d'aspiració d'aire a la qual s'uneix el portafiltres, en general, cassets de poliestirè, i el filtre. Com en qualsevol sistema de mostreig, la determinació del cabal d'aire i del temps de mostreig (basat en la previsió de la concentració existent) són passos fonamentals per a l'obtenció de mostres útils per a l'anàlisi. Un altre aspecte que cal considerar és si la captació es fa amb el casset obert o tancat; la decisió estarà basada en el tipus de mostra i l'assaig que es durà a terme. En els cassets oberts la distribució de les partícules és més regular, la qual cosa en facilita l'observació i el recompte, mentre que en casset tancat, les partícules tendeixen a acumular-se a la zona central del filtre i en dificulten així l'observació.

Aquests sistemes de mostreig són, a la pràctica, totalment equivalents als que reutilitzen en el mostreig d'aerosols sòlids en general.

2.2.1. Filtres capil·lars

Els **filtres capil·lars** estan fets d'una capa de policarbonat fina. En aquest tipus de filtres els porus consisteixen en cilindres rectes alineats de manera perpendicular a la superfície del filtre. L'eficàcia de captació d'aquests filtres és baixa per a les partícules d'una grandària inferior al porus. L'eficàcia augmenta per a les partícules submicròniques ($< 1\ \mu$m) que són retingudes segons el **principi de difusió**. Lògicament, les partícules de grandària més gran que la del porus són retingudes amb gran eficàcia. El disseny d'aquests filtres fa que es rebleixin abans que d'altres amb la mateixa grandària de porus, la qual cosa limita la quantitat de material que pot recollir. Són filtres molt fins i amb una superfície

molt llisa, cosa que els fa idonis per a l'observació de les partícules captades al microscopi òptic o a l'electrònic de rastreig i facilita el rentatge del filtre i la recuperació de la mostra per a la seva anàlisi.

2.2.2. Filtres de membrana

Aquest tipus de filtres tenen una microestructura complexa que proporciona camins irregulars o tortuosos al flux d'aire. Depenent del **principi de captació**, es pot dir que, en general, l'eficàcia d'aquests elements és bastant elevada, fins i tot per a partícules de grandària inferior a la del porus. Per exemple, l'eficàcia de captació per a partícules de 0,3 μm és del 95% en filtres de membrana amb grandària de porus de 0,5 μm. Els materials dels quals estan fets els filtres són variats; un dels usats més sovint per a la captació de bioaerosols són els **èsters de cel·lulosa**. Els bioaerosols captats es poden tenyir sobre els mateixos filtres per a la seva observació directa al microscopi òptic; el filtre es pot transparentar amb un producte adequat com a fase prèvia a l'observació i aquests filtres es poden col·locar sobre medi de cultiu per a la incubació dels microorganismes captats.

3. Mostreig de materials i superfícies

Hem comentat en la introducció que el mostreig de superfícies és una tècnica que cal tenir en compte també en la determinació d'agents biològics. Aquesta tècnica té un interès especial, atès que permet determinar la possible contaminació per agents biològics de les matèries primeres, de les mateixes persones, dels instruments de feina, les robes, les mans, el mobiliari o els elements de construcció que per les seves característiques es poden convertir en reservoris d'agents biològics.

L'anàlisi de superfícies i de líquids és necessària en alguns casos, en els quals la simple mesura ambiental pot donar com a resultat la inexistència de contaminació microbiològica, i proporcionar falsos negatius. Aquest tipus de mesures permeten identificar els focus de contaminació, que és un dels objectius importants en l'avaluació de l'exposició a agents biològics. La detecció de concentracions elevades de microorganismes en aquestes mostres pot eliminar la necessitat de fer un mostreig ambiental quan és clara la possible aerosolització dels contaminants i per tant l'exposició de les persones a aquests contaminants. En aquestes situacions, les decisions són **quines** mesures correctores són les aconsellables i **quin** és el procediment i calendari d'aplicació.

En general, els mètodes de captació de les mostres consisteixen a prendre una fracció del material, un volum determinat d'un líquid, l'aspiració de la pols continguda en una àrea determinada o el mostreig d'una superfície. La precaució principal és que els contenidors en els quals es recullen les mostres siguin estèrils per a evitar possibles contaminacions. Els mètodes d'assaig dependran dels agents biològics que es vulgui determinar i, igual que en el cas de la mesura de bioaerosols, aquests es poden dividir en:

- **assajos basats en el cultiu de les mostres**, per a detectar microorganismes viables i cultivables, i

- **assajos no basats en el cultiu** com a examen i recompte al microscopi o altres assajos posteriors diferents del cultiu.

Vegeu també

Els assajos no basats en el cultiu es comenten en els subapartats 5.5, 5.6, 5.7 i 5.8 d'aquest mòdul didàctic.

Dels mètodes exposats, el **mostreig de superfícies** és un dels que s'utilitza més àmpliament, entre altres raons, perquè permet prendre la mostra sense trencar o danyar el material. Quant a les tècniques més utilitzades, se'n poden distingir dues: el **rentatge de la superfície** i la **presa de mostra per contacte**.

3.1. Frotis de superfícies

Aquest mètode consisteix en la recollida del material dipositat en les superfícies amb turundes estèrils de cotó o gases (figura 11). Aquests elements poden ser humitejats amb aigua estèril per a facilitar la captació de les partícules. Les mostres preses han de ser manipulades d'una manera asèptica per a evitar qualsevol contaminació. Després del mostreig, es pot procedir a sembrar el material recollit aplicant directament la turunda sobre el medi de cultiu o es pot procedir a rentar els elements utilitzats en la captació amb un diluent estèril i sembrar-hi després el líquid obtingut. En general, aquest mètode no permet fer estimacions quantitatives precises de la contaminació i, bàsicament, s'utilitza per a comprovar la presència d'un microorganisme concret.

Figura 11. Presa de mostres de superfícies

3.2. Mostreig per contacte

És el mètode més utilitzat i consisteix en l'aplicació de plaques de contacte sobre la superfície que es vol mostrejar i sobre les quals s'exerceix una pressió lleugera per a captar les partícules. El resultat del recompte de les colònies que han crescut s'expressa en ufc/cm^2. Una altra tècnica consisteix en la utilització de cintes adhesives que atrapen les partícules.

3.2.1. Plaques de contacte

Les plaques de contacte són plaques de cultiu especials en les quals el medi de cultiu es troba en excés lleuger. Hi ha diferents tipus de plaques de contacte, però les més utilitzades són les plaques RODAC®; a la base d'aquestes plaques hi ha gravada una quadrícula, de superfície determinada, que permetrà el càlcul de la concentració dels microorganismes que han format colònia. El resultat s'expressa en ufc/cm^2. El principal avantatge d'aquest mètode és la seva senzillesa, mentre que el principal inconvenient és que superfícies molt brutes provocaran la sobrecàrrega de la placa i, per tant, en dificulten l'anàlisi. En la figura 12 es mostra una placa RODAC® i les colònies crescudes.

Figura 12. Placa RODAC® amb colònies
Font: INSHT. *NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I).*

3.2.2. Cintes adhesives

L'ús d'aquestes cintes està indicat quan no cal informació sobre els microorganismes viables i cultivables. El mètode és molt senzill i consisteix a atrapar en la cinta les partícules dipositades en una superfície. L'anàlisi consisteix en l'observació al microscopi, per la qual cosa el material de la cinta ha de tenir una bona qualitat òptica i permetre la tinció. Aquest mètode no permet anàlisis quantitatives.

4. Selecció del mostrejador

Els aspectes fonamentals que cal considerar en l'elecció d'un mostrejador són:

- l'agent biològic objecte d'interès,
- la informació que es vol obtenir,
- la concentració previsible de bioaerosol,
- el diàmetre aerodinàmic de les partícules,
- les condicions ambientals,
- les característiques de l'equip i de l'anàlisi a què se sotmetran les mostres.

Òbviament, la informació que els fabricants dels equips proporcionen als usuaris facilita l'elecció de l'equip més apropiat per a cada aplicació.

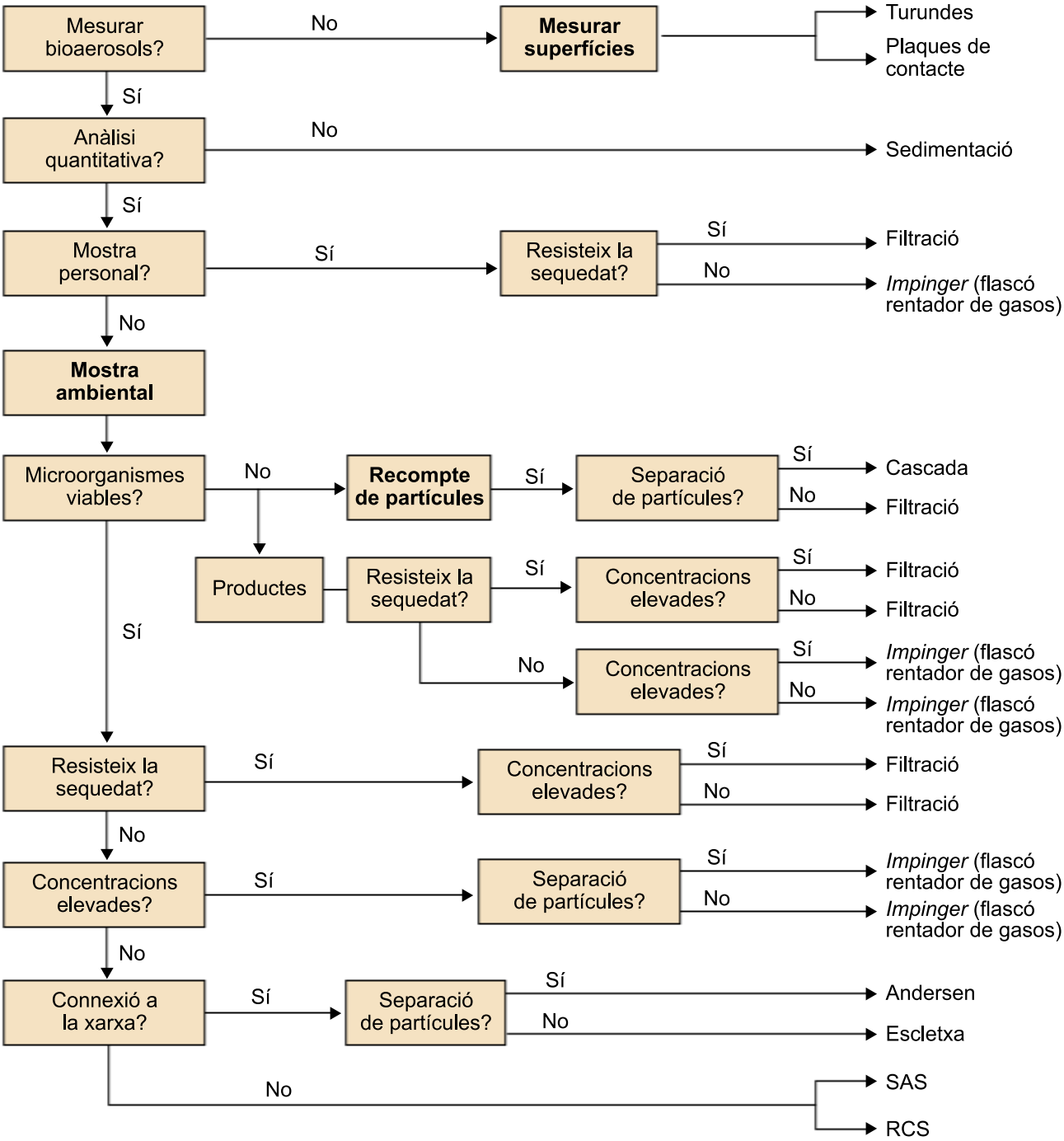
La norma UNE-EN 13098, que ja hem referenciat, en l'annex A inclou les recomanacions bàsiques per a la selecció d'un mètode de mesura d'agents biològics de gran utilitat a l'hora d'efectuar la selecció del mostrejador. Una guia per a l'elecció del mostrejador es presenta en la figura 13.

Característiques d'un mostrejador de bioaerosols basades en l'*NTP 610: Agentes biológicos: equipos de muestreo (II)* de l'INSHT:

- Conduir l'aire cap a l'equip a una velocitat uniforme i provocar les mínimes pèrdues possibles en el dispositiu d'entrada de l'aire.
- Mantenir el cabal d'aire dins d'uns marges raonables tenint en compte les possibles variacions en el subministrament elèctric, càrrega de les bateries o les pèrdues de càrrega en l'equip.
- Permetre l'ús de diversos suports de captació (plaques de cultius de grandària estàndard, portaobjectes, filtres de diferents tipus, diàmetres i grandària de porus, etc.).
- Permetre la col·locació i extracció dels suports de captació de manera senzilla.
- Protegir el suport de captació de possibles contaminacions.
- Minimitzar les fuites d'aire que poden causar errors en la mesura o permetre que l'aire no passi sobre el medi de captació.
- Expulsar l'aire aspirat a prou distància de l'entrada per a evitar el possible reingrés de l'aire ja mostrejat.
- Captar un ampli rang de grandàries de partícules amb una eficàcia consistent; o tenir una eficàcia de captació elevada per a la grandària de partícula volguda, mentre que exclou altres fraccions o les capta amb menys eficàcia.
- Captar les diferents fraccions de grandària de partícula amb eficàcies similars a les existents en el tracte respiratori humà.
- Mantenir la integritat física, química i biològica del material captat.

- Permetre l'anàlisi de les mostres mitjançant l'ús de diferents tècniques analítiques.
- Ser resistent i fàcil de netejar i desinfectar.
- Ser fàcil de manejar, portàtil, fiable i econòmic.

Figura 13. Diagrama per a la selecció del mostrejador



Font: adaptat de la norma UNE-EN 13098

5. Anàlisi de les mostres

Continuant amb el paral·lelisme que hem anat comentant amb els sistemes de presa de mostra i anàlisi aplicats als agents químics, en la taula 4 es recullen les principals característiques dels mètodes de captació i anàlisi utilitzats per a la detecció de microorganismes. Una vegada presa la mostra segons els procediments comentats fins aquí, escau, òbviament, fer-ne una anàlisi, aspecte de què tractem en aquest apartat.

Taula 4. Característiques de la captació i anàlisi d'agents biològics

Agent biològic	Mètode B	Anàlisi	Dades obtingudes
Virus	*Impingers*, ciclons, impactadors, filtres	Cultiu cel·lular	Concentració (nre.-/m^3); identificació
		Immunoassaig (anticòs marcat amb colorant)	Confirmació de presència d'un virus específic
		Microscopi electrònic	Identificació
		Proves genètiques. PCR	Confirmació de presència d'un virus específic
Bacteris	Impactadors, *impingers*, ciclons, filtres. Mostres de superfícies	Microscopi/recompte	Concentració (cèl·lules/m^3 o cm^2 o g)
		Immunoassaig (anticòs marcat amb colorant)	Confirmació de presència d'un bacteri específic
		Proves genètiques. PCR	Confirmació de presència d'un bacteri específic
		Cultiu	Concentració (ufc/m^3 o cm^2 o g)
		Microscopi: morfologia, tinció	Identificació (general)
		Bioquímica	Identificació (específica)
Antígens bacterians	Pols	Immunoassaig (ELISA)	Concentració (μg/g)
Components de la paret bacteriana (endotoxines, d'altres)	Filtres, *impingers*, pols	Bioassaig (LAL)	Activitat biològica (UE/m^3 o g)
		Químic (CG-EM, HPLC)	Concentració (LPS, ng/m^3 o g; àcid muràmic, μg/m^3 o g)
Fongs	Impactadors, *impingers*, ciclons, filtres. Mostres de superfícies	Microscopi/recompte	Concentració (espores/m^3 o cm^2 o g). Identificació
		Cultiu	Concentració (ufc/m^3 o cm^2 o g)
		Microscopi/morfologia	Identificació
Llevats (àcids grassos, lípids)	Impactadors, *impingers*, ciclons, filtres. Mostres de superfícies	Químic (CG)	Identificació

PCR: reacció en cadena de la polimerasa. ELISA: assaig immunoadsorbent lligat a enzim. LAL: lisat d'amebòcits del *Limulus*. UE: unitats d'endotoxina. CG-EM: cromatografia de gasos - espectrometria de masses. HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució. LPS: lipopolisacàrids. CL: cromatografia líquida. COVM: compostos orgànics volàtils d'origen microbià.

Agent biològic	Mètode B	Anàlisi	Dades obtingudes
Al·lèrgens fúngics	Pols	Immunoassaig (ELISA)	Concentració (ng o unitats/g)
Components de la paret fúngica	Filtres, pols	Immunoassaig (LAL)	Activitat biològica (glucà, unitats o $\mu g/m^3$)
		Químic (HPLC, CG-EM)	Concentració (glucà o ergosterol, unitats o $\mu g/g$)
Toxines fúngiques	Impactadors, *impingers*, ciclons, filtres. Mostres de superfícies	Químic (HPLC, CG-EM)	Confirmació de la presència de la toxina, concentració (toxina, ng/m^3 o g)
		Immunoassaig, citotoxicitat	Confirmació de la presencia de la toxina, detecció de l'activitat tòxica (sense identificació)
Endoparàsits (amebes)	Aigua, impactadors, *impingers*	Cultiu	Concentració (nre.-/m^3 o ml)
		Microscopi/morfologia	Identificació
		Immunoassaig (anticòs marcat amb colorant)	Confirmació de la presencia d'amebes específiques
Al·lèrgens/antígens	Pols	Immunoassaig (ELISA)	Concentració (al·lergen/antigen, $\mu g/g$ o unitats d'al·lergen/g o unitats d'antigen/g)
Àcars	Pols	Microscopi/morfologia	Concentració (nre. d'àcars/g de pols o per m^2 de superfície mostrejada), identificació
Al·lèrgens d'àcars	Pols	Immunoassaig (ELISA)	Concentració (al·lergen d'àcars, ng/g de pols o per m^2 de superfície mostrejada)
Guanina	Pols	Colorimetria (CL)	Concentració (guanina/g de pols o per m^2 de superfície mostrejada)
COVM	Adsorbents, bosses d'aire	Químic (CG-EM)	Concentració (compost, mg/m^3, identificació de compostos

PCR: reacció en cadena de la polimerasa. ELISA: assaig immunoadsorbent lligat a enzim. LAL: lisat d'amebòcits del *Limulus*. UE: unitats d'endotoxina. CG-EM: cromatografia de gasos - espectrometria de masses. HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució. LPS: lipopolisacàrids. CL: cromatografia líquida. COVM: compostos orgànics volàtils d'origen microbià.

5.1. Transport i conservació de les mostres

Una vegada conclosa la captació, cal prendre tota classe de precaucions per a evitar que les mostres s'alterin o modifiquin abans d'arribar al laboratori: deshidratació, mort dels agents, contaminacions, vessaments o trencaments. Aquestes precaucions, i també les instruccions pertinents per a cada tipus de captació i agent, s'han de trobar, detallades fins a l'últim extrem, en el **procediment** o **mètode analític** disponible a aquest efecte. Com a recomanacions generals podem indicar les següents:

- Precintar les mostres o tancar-les perfectament.

- Col·locar les mostres en caixes o recipients adequats, fixant-les correctament.

- Incloure amb cada lot homogeni de mostres una mostra **blanca**, que és una mostra que ha estat manipulada exactament com les altres anàlogues del mateix lot, però amb la qual no s'ha efectuat captació de contaminant.

- No col·locar en un mateix recipient mostres ambientals i materials o productes que les poguessin alterar o contaminar.

- Evitar alteracions de les mostres per escalfament excessiu o exposició intensa a la llum solar i seguir les instruccions específiques per a cada tipus de mostra.

- No demorar l'enviament de les mostres al laboratori.

- No obrir les mostres fins al moment en què en comenci l'anàlisi o el tractament.

- Emmagatzemar les mostres fins a la seva anàlisi en llocs específics que compleixin les condicions específicament establertes per a això.

- Tant si es guarden les mostres en frigorífics com en altres llocs d'emmagatzematge, és recomanable que siguin específics per a aquesta comesa sense que continguin cap altre tipus de mostres o materials que les poguessin alterar o contaminar.

- No sobrepassar en cap cas la data límit per a l'anàlisi que ha d'estar clarament especificada en el procediment o mètode d'anàlisi.

5.2. Tipus d'estudis

Depenent de l'objectiu de la mesura es poden agrupar els estudis en generals, d'indicadors i focalitzats.

- **Estudis generals**. Es tracta de conèixer, de la manera més àmplia que sigui possible, els diferents tipus d'agents biològics que poden ser-hi presents i per això s'utilitzen quan es desconeix la composició (tipus i concentracions) d'agents biològics lligats a l'activitat laboral. Els mètodes usats més comunament estan basats en el cultiu dels microorganismes en medi gelatinós (agar), en l'observació directa al microscopi o en l'avaluació de la diversitat microbiana.

- **Estudis d'indicadors**. En aquest cas, sabem l'agent biològic que ens interessa, encara que utilitzem per a la seva anàlisi un indicador que pot ser representatiu de la presència d'un grup de microorganismes.

- **Estudis focalitzats**. Aquests estudis permeten documentar la presència d'un agent biològic associat a efectes concrets. A més de les tècniques de cultiu de microorganismes poden comprendre la detecció d'antígens o la comprovació de l'existència de títols elevats d'anticossos en mostres de sang. L'elecció d'aquest tipus d'estudis parteix d'una hipòtesi sobre l'existència d'un agent específic en un ambient, hipòtesi que pot estar basada tant en l'observació d'efectes concrets associats a l'agent com en l'existència de determinades condicions ambientals que permetin sospitar la seva presència.

Estudis d'indicadors

Uns exemples d'aquest tipus d'estudis són la determinació de glucans o ergosterol com a indicadors de la biomassa fúngica i la determinació de guanina com a indicador de la presència d'àcars a la pols domèstica.

Estudis focalitzats

Durant l'estudi d'un brot de legionel·losi, els mètodes d'assaig estaran dirigits a la detecció de legionel·la en mostres d'aigua i clíniques, incloent-hi el cultiu i aïllament del bacteri en les mostres d'aigua de les instal·lacions implicades i en mostres biològiques obtingudes de les persones potencialment infectades.

5.3. Cultiu de microorganismes. Bacteris i fongs

El **cultiu de microorganismes** en medi sòlid és l'assaig estàndard. La possibilitat d'efectuar el recompte de colònies i relacionar-lo amb un volum d'aire l'han convertit en una tècnica per a quantificar microorganismes, sense deixar de banda les limitacions que el mètode presenta.

El **recompte de colònies** és la proporció de la població mostrejada que manté la capacitat de créixer en el medi de cultiu seleccionat i en les condicions d'incubació establertes.

Evidentment, no solament són aquests els microorganismes que poden causar efectes adversos a les persones, sinó que els poden causar microorganismes no viables i fins i tot morts, i aquesta informació resulta parcial; tampoc no inclou els efectes tòxics i al·lèrgics.

També operativament, l'estrès físic que poden patir els microorganismes durant la generació de l'aerosol, la seva permanència a l'aire i durant la seva captació, els poden danyar i impedir així el desenvolupament en cultiu i, en conseqüència, provocar la infravaloració de la concentració. D'altra banda, no tots els microorganismes seran cultivables i el fet que no formin colònies no significa necessàriament que l'organisme no estigui en la mostra o que estigui mort. Les principals raons per les quals un microorganisme no forma una colònia són:

- La mort o alteració dels processos de desenvolupament per l'acció de les forces que s'exerceixen sobre la cèl·lula durant la generació de l'aerosol, la seva captació i la manipulació i el transport de les mostres.

- L'acció tòxica o el desequilibri dels elements químics que constitueixen el mitjà de cultiu.

- La competitivitat entre espècies.

Aquesta tècnica permet l'aïllament de microorganismes en cultius purs, cosa que constitueix un pas necessari en els procediments d'identificació de les espècies captades. Depenent del tipus de mostreig fet, els microorganismes impacten directament sobre el medi de cultiu (**captació ambiental**), o són posteriorment inoculats en un medi de cultiu a partir de fraccions de la mostra presa (aigua, materials o superfícies).

En bona part dels casos, l'anàlisi comença en la presa de les mostres amb l'elecció del suport de captació.

5.3.1. Placa amb medi de cultiu

El **medi de cultiu** és el material en què es multiplicaran els microorganismes i formaran colònies, per la qual cosa ha de reunir les condicions que en permetin i n'afavoreixin el desenvolupament.

Les característiques pròpies del medi de cultiu permetran la formació de les colònies d'uns tipus de microorganismes, i faran que d'altres passin inadvertits. En conseqüència, s'empraran diferents varietats de medis de cultiu segons l'objectiu de l'anàlisi. Una pràctica habitual al laboratori és utilitzar en les sembres diferents medis de cultiu i condicions d'incubació per a poder posar de manifest el nombre més gran de microorganismes que sigui possible.

Els medis utilitzats habitualment per a la captació ambiental de microorganismes es poden classificar en:

- **Generals**: són els que permeten el creixement d'una àmplia varietat de microorganismes, tant bacteris com fongs.

- **Selectius**: els que s'han preparat per a inhibir el creixement de determinats microorganismes i permetre el d'altres.

- **Diferencials**: els que permeten el creixement de diversos microorganismes, però que contenen ingredients que produeixen diferències d'aparença d'alguns d'ells.

La utilització d'aquests medis constitueix la base dels mètodes clàssics de la identificació bacteriana. En formular el medi de cultiu de la major part de microorganismes, és necessari aportar fonts de magnesi, ferro, calci, potassi, en

Medis diferencials

Un medi de cultiu que és alhora selectiu i diferencial és l'**agar eosina - blau de metilè**, que s'utilitza per a identificar bacteris del grup entèric. És selectiu perquè la presència del blau de metilè inhibeix el creixement dels bacteris grampositius, i diferencial ja que, dels gramnegatius, *Escherichia coli*, *Klebsiella* i *Enterobacter* formen colònies de color blau porpra amb lluentor metàl·lica, mentre que *Shigella*, *Salmonella* o *Pseudomonas* formen colònies incolores o rosades.

forma iònica (Mg^{++}, Fe^{++}, Ca^{++} i K^{+}), que són necessaris com a activadors enzimàtics o formant part de molècules o elements de l'organisme. Altres minerals que contenen coure, manganès, zinc, etc., així mateix necessaris, són aportats normalment a bastament per l'aigua de subministrament. Molts microorganismes són capaços de sintetitzar tots els seus components essencials quan disposen dels elements esmentats anteriorment. Però, de vegades (per exemple, per una mutació genètica), el microorganisme perd la capacitat de síntesi d'algun component que encara li és imprescindible. En aquests casos, cal subministrar-lo amb el medi i es denominen *factors de creixement*, que variaran segons les espècies i les pèrdues en la capacitat de síntesi que s'hagin produït.

En la figura 14 es presenten exemples de plaques en les quals s'han conreat bacteris totals (figura 14a) i fongs totals (figura 14b).

Figura 14. Bacteris totals després d'una incubació

Font: Xavier Solans (2012). INSHT

5.3.2. Temperatura d'incubació

La **temperatura d'incubació** es pot utilitzar per a aïllar selectivament microorganismes tenint en compte el següent:

- Hi ha nombrosos fongs i bacteris lliures que creixen de manera òptima a temperatures que oscil·len entre 18 °C i 25 °C.

- Hi ha nombrosos fongs que no creixen bé a temperatures per sobre de 35 °C amb l'excepció de l'*Aspergillus fumigatus*, de manera que aquest fong es pot aïllar d'una manera selectiva si s'incuben les mostres a 35-40 °C.

- La temperatura òptima d'incubació per a microorganismes patògens és de 37 °C, que és la temperatura del cos humà.

- Els actinomicets termofílics tenen una temperatura d'incubació superior a 50 °C, la qual cosa exclou el desenvolupament de qualsevol altre microorganisme que no sigui termotolerant.

5.3.3. Atmosfera d'incubació

L'**atmosfera d'incubació** és un altre factor important. Moltes de les anàlisis basades en el cultiu estan limitades a l'estudi de les espècies aeròbies (obligades o facultatives), és a dir, les que solament es desenvolupen en presència d'oxigen o que es poden desenvolupar tant en presència com en absència d'oxigen. No obstant això, en l'ambient es poden trobar les espores (formes resistents de vida) d'espècies anaeròbies o les formes vegetatives, que creixen a zones on no hi ha oxigen, per la qual cosa l'anàlisi dels bacteris anaerobis requereix atmosferes sense oxigen, habitualment amb nitrogen i diòxid de carboni.

S'afegeix al cultiu una quantitat d'una solució diluïda de sals amb un agent reductor, com el tioglicolat i un indicador redox el canvi de color del qual indicarà contaminació per oxigen. Altres mitjans per a aconseguir condicions anaeròbiques consisteixen en la utilització de medis de cultiu que continguin agents reductors (cisteïna o tioglicolat) i l'ús de cabines per al cultiu d'anaerobis.

5.3.4. Recompte de colònies

L'obtenció de la concentració de microorganismes es basa en la relació entre el nombre de colònies que s'han comptabilitzat i el volum d'aire aspirat, funció del cabal al qual estigui calibrat el mostrejador i el temps de mostreig. El recompte de colònies de vegades no és un procés senzill pels motius següents:

- És difícil identificar com a separades colònies formades per agregats microbians.
- També és difícil diferenciar colònies de morfologia similar.
- Una espècie determinada pot segregar productes que inhibeixen el creixement d'altres microorganismes.
- La morfologia o grandària d'unes colònies n'obscureixen completament d'altres.

En la figura 15 es mostra un model de lupa per a facilitar el recompte. En la figura 16 es mostra una placa de cultiu en la qual s'aprecien els senyals de la impactació de les partícules després del procés de mostreig.

Figura 15. Lupa per al recompte

Figura 16. Placa amb senyals d'impactació

Font: INSHT. *NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras.*

Per a evitar la infravaloració de les colònies crescudes, quan la captació ha estat feta amb un impactador multiorifici, cal fer un ajustament estadístic sobre el nombre de colònies comptades que prevegi la probabilitat que més d'una partícula hagi impactat al mateix lloc. La fórmula bàsica per al càlcul de la correcció per coincidència és la següent:

$$P_r = N\left[\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \ldots \frac{1}{N-(r+1)}\right]$$

en què P_r és el nombre estimat de partícules cultivables; r és el nombre de colònies comptades en la placa i N és el nombre total d'orificis per plataforma de l'impactador.

5.3.5. Identificació de microorganismes cultivables

La **taxonomia** és la ciència que permet classificar les formes vives establint les relacions que hi ha entre un grup d'organismes i un altre, i també diferenciar-los.

Els mètodes que fa servir la taxonomia per a establir aquestes relacions o diferències són diversos; el més clàssic de tots consisteix en l'observació de les característiques de les colònies crescudes en cultiu: la seva **forma**, **grandària**, **olor** i **pigmentació**.

A escala cel·lular, la forma, la grandària, l'agrupació de les cèl·lules bacterianes i la presència o absència de flagels, càpsula o endòspores, són les característiques que defineixen les diferents classes de microorganismes. Moltes vegades, per a l'observació al microscopi d'aquests aspectes cal utilitzar colorants. Una de les

primeres proves que es duen a terme per a identificar les espècies bacterianes és la tinció de Gram, que es basa en les diferències físiques que hi ha entre les parets cel·lulars dels bacteris.

El resultat de la prova permet classificar tots els bacteris en dos grups que es denominen **grampositius** i **gramnegatius**. En aquesta prova s'utilitzen dos colorants: el cristall violeta, que tenyeix de blau els bacteris grampositiu, mentre que els negatius romanen incolors, i un colorant de contrast, la safranina, que tenyeix lleugerament de rosa els bacteris gramnegatius i permet reconèixer-los i diferenciar-los al microscopi.

Un pas més permet identificar els bacteris a escala de gènere, espècie i fins i tot subespècie. En aquest cas, són les proves bioquímiques, fisiològiques o nutricionals les que permeten avaluar els constituents de les parets bacterianes, les seves inclusions, els antígens, el rang de temperatures a les quals creixen, i el seu òptim, els requeriments d'oxigen, la tolerància al pH, sals o pressions osmòtiques, la sensibilitat als antibiòtics, les fonts d'energia, carboni i nitrogen, els productes de fermentació i el tipus de metabolisme. Al mercat hi ha disponibles diferents sistemes que permeten l'assaig múltiple de diversos d'aquests aspectes. En la figura 16 es mostra el resultat obtingut en aplicar-hi alguns d'aquests sistemes.

Figura 17. Assaig múltiple d'identificació
Font: INSHT. *NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras.*

La identificació dels fongs es basa en l'observació de la morfologia de les seves espores, encara que també es poden utilitzar proves de tinció.

En la figura 18 es mostren els resultats de la incubació de tres espècies de fongs: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger*.

Lectura recomanada

Alguns dels detalls instrumentals sobre els procediments de captació, cultiu i identificació de bacteris i fongs a l'aire es troben detallats en l'NTP 299:
NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire.

Figura 18. Resultats de la incubació de diferents espècies de fongs *Aspergillus*

a. **b.** **c.**

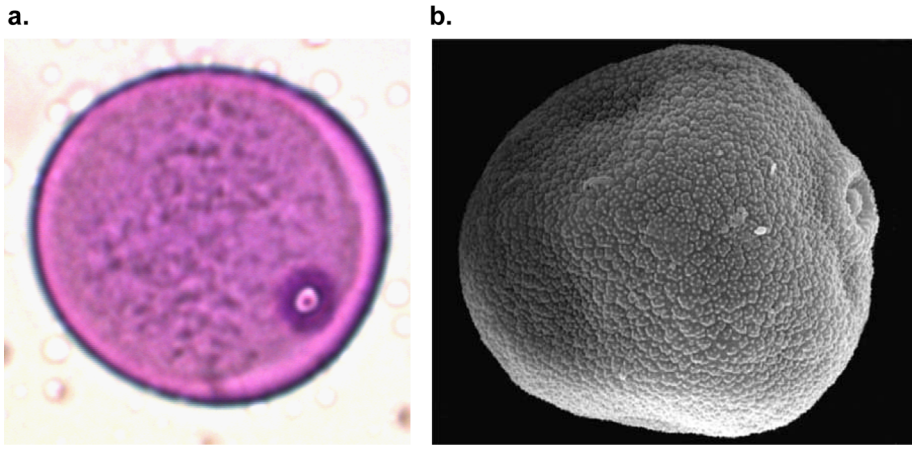
a. *Aspergillus flavus*. **b.** *Aspergillus fumigatus*. **c.** *Aspergillus niger*
Font: Xavier Solans (2012). INSHT

5.4. Recompte de microorganismes, pol·len i espores

Un procés teòricament més simple és la identificació i quantificació de microorganismes comptables, encara que la diferenciació entre espècies concretes de pòl·lens i espores pot ser altament complicada i solament a l'abast d'experts en taxonomia. Recórrer a les tècniques microscòpiques que comentem a continuació és imprescindible, i cal recórrer, en molts casos, a la microscòpia elec-

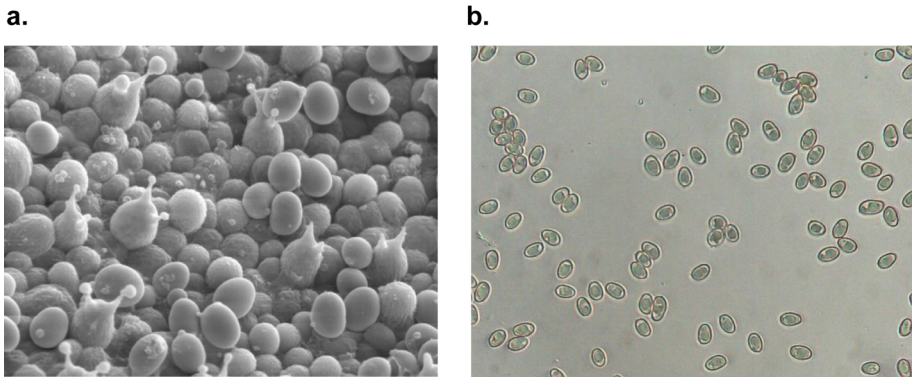
trònica a causa de la petita grandària d'aquestes espècies. En les figures 19 i 20 es presenten imatges de pòl·lens i espores. En el cas de les espores de fongs o de microorganismes amb capacitat de formar espores, evidentment hi ha la possibilitat del seu cultiu, independentment o amb posterioritat, del seu recompte.

Figura 19. Pòl·lens



a. Gra de pol·len vist al microscopi òptic. **b.** Gra de pol·len vist al microscopi electrònic de rastreig.
Font: J. Belmonte (2003). UAB

Figura 20. Espores



a. Espores vistes al microscopi òptic. **b.** Espores vistes al microscopi electrònic de rastreig

5.5. Tècniques microscòpiques

L'ús del microscopi és una tècnica fonamental per al recompte del nombre total de microorganismes, com hem vist en les figures 19 i 20. Ajuda a identificar les espècies, permet reconèixer la forma de les cèl·lules, observar el resultat de les proves de tinció o la mobilitat dels bacteris. Els tipus de microscopis més usats els resumim a continuació.

1) Microscopi òptic

Es tracta d'un microscopi convencional en el qual l'observació es basa en la il·luminació dels espècimens que destaquen contra un fons fosc. L'examen microscòpic de mostres ambientals permet el recompte total de fongs i bacteris.

En el cas de fongs i les seves espores, es pot fer directament, reconeixent-ne la forma o utilitzant mètodes de tinció. Com hem dit, hi ha dificultats per a identificar espores d'espècies de fongs que tenen una gran similitud morfològica, per exemple les espores d'*Aspergillus* i *Penicillium*, que sovint són comptades com un únic grup. La solució, en aquests casos, és el cultiu dels microorganismes captats.

Per a l'observació de bacteris és necessari servir-se de colorants i especialment dels fluorescents. Actualment, es disposa de kits comercials de tinció de Gram fluorescent i de reactius que permeten destriar entre formes vives i mortes.

2) Microscopi de contrast de fases

Es basa en la difracció de la llum que en incidir sobre els espècimens provoca diferents graus de lluentor i de contrast, i s'utilitza la immersió de la mostra en líquids de diferent índex de refracció. És una tècnica apropiada per a l'observació d'espècies que presenten dificultats d'identificació en el microscopi òptic i per a l'estudi de les endòspores bacterianes, que tenen índexs de refracció diferents dels de les formes vegetatives.

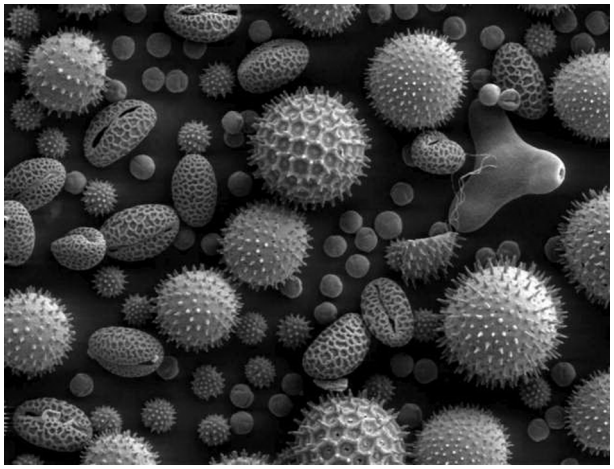
3) Microscopi de fluorescència

Es basa en l'observació de la fluorescència emesa per determinats fluorocroms (taronja d'acridina) lligats a les cèl·lules quan són excitats per la llum ultraviolada d'una longitud d'ona determinada. Aquesta tècnica s'utilitza per al recompte directe de partícules.

4) Microscopi electrònic

En aquests casos, en lloc de llum s'utilitza un feix d'electrons. Es tracta d'una tècnica ja molt més complexa, que requereix una instrumentació relativament sofisticada, però amb uns nivells de resolució molt més elevats. Encara que hi ha molts tipus de microscòpia electrònica, els més esmentats per a la identificació d'agents biològics són els de transmissió i de rastreig. En la figura 20 mostrem uns grans de pol·len mitjançant microscòpia electrònica de rastreig.

Figura 21. Grans de pol·len per microscòpia electrònica de rastreig



5.6. Bioassajos

El terme **bioassaig** fa referència als mètodes quantitatius,*in vivo* o *in vitro*, l'objectiu dels quals és un efecte observable en un sistema biològic o en algun organisme.

Exemples de bioassajos

- Els cultius cel·lulars per a la detecció de virus i bacteris.
- L'exposició de cèl·lules o organismes complets a mostres que puguin contenir toxines.
- L'immunoassaig basat en la resposta de les molècules biològiques (anticossos) enfront d'un antigen.
- L'assaig del lisat d'amebòcits de *Limulus* per a la detecció d'endotoxines.
- Els assajos d'infectivitat.

Els **virus** són paràsits cel·lulars obligats (no poden sobreviure gaire temps fora de cèl·lules vives), per la qual cosa la seva anàlisi implica la inoculació de cultius cel·lulars o d'animals. En el cultiu cel·lular cada partícula viral es revela com un focus d'infecció i aquesta s'evidencia per la formació d'una lesió. Aquest mètode proporciona informació sobre el nombre de partícules víriques que van ser capaces d'infectar el tipus de cèl·lules del cultiu. L'ús d'aquest mètode per a mostres ambientals té moltes limitacions, ja que altres microorganismes poden créixer en el cultiu cel·lular i alterar-ne els resultats.

5.6.1. Immunoassaig

L'immunoassaig és un mètode basat en la reacció específica que ocorre entre l'antigen i l'anticòs i un marcador (enzims, molècules fluorescents o radioactives [radioimmunoassaig: RIA]) que faci detectable i quantificable el resultat de l'assaig.

Aquesta especificitat ha estat utilitzada en un gran nombre d'aplicacions, entre les quals hi ha la detecció d'al·lèrgens d'àcars, al·lèrgens d'origen animal o vegetal, antígens microbians, glucans fúngics, aflatoxines o làtex. Les tècniques habituals d'immunoassaig són les següents:

1) *Enzyme-linked inmunosorbent assay* (ELISA)

Un dels assajos utilitzat més àmpliament per a determinar la concentració d'al·lèrgens en pols és el test ELISA[6] (assaig per immunoabsorció lligat a enzims). En l'assaig, les parets dels vasets d'una placa estan recobertes per l'anticòs de captura que és específic per a antígens concrets. Les mostres preses són cribades fins a obtenir la fracció fina de la qual s'extrauran les proteïnes solubles (al·lergen); aquest extracte es dilueix de manera seriada. El mateix procés es duu a terme amb l'al·lergen patró. Alíquotes d'ambdós extractes són afegides als vasets que contenen l'anticòs de captura. Les plaques són incubades de manera que es produeix la reacció antigen-anticòs; posteriorment, es procedeix a rentar-les per a eliminar-ne els materials no lligats. El complex antigen-anticòs es detecta utilitzant un segon anticòs al qual va unit un enzim que reconeix aquest complex i, finalment, s'afegeix una substància cromògena que canvia de color en reaccionar amb l'enzim i es llegeix el canvi de color. La concentració dels antígens buscats s'obté per comparació de les lectures de les mostres amb les corbes generades per concentracions conegudes dels patrons.

(6)Sigla d'*enzyme-linked inmunosorbent assay.*

2) Anticossos fluorescents

En aquest cas, els anticossos estan lligats a compostos orgànics fluorescents, com rodamina B (fluorescència vermella) o isotiocianat de fluoresceïna (fluorescència groga verdosa), que no alteren l'especificitat de l'anticòs, però permeten la detecció de l'antigen en observar el preparat amb el microscopi de fluorescència. Les aplicacions d'aquesta tècnica són múltiples, i s'utilitza per al diagnòstic de la legionel·losi mitjançant la tinció d'una biòpsia de teixit pulmonar amb anticossos fluorescents. També són utilitzats en el diagnòstic d'infeccions víriques o en el recompte de determinats tipus cel·lulars en mescles complexes.

3) Radioimmunoassaig

El radioimmunoassaig (RIA) utilitza isòtops radioactius com a conjugats dels anticossos. L'isòtop I^{125} és el més utilitzat com a sistema de detecció, ja que les proteïnes es poden iodar amb facilitat sense alterar-ne l'especificitat. L'assaig directe consisteix en una tècnica en dos passos. Primer, s'afegeixen els anticossos antigen radioactius específics de l'antigen a una sèrie de vasets que contenen concentracions conegudes d'antigen pur. Després, es mesura la radioactivitat en cadascun dels vasets, i es genera una gràfica patró. A continuació, es deixa que la mostra en la qual es vol detectar l'antigen es lligui en un altre vaset amb els anticossos radioactius i se'n mesura la radioactivitat. La concentració d'antigen s'obté en comparar la mesura de l'assaig amb la gràfica estàndard preparada.

La utilitat clínica més important d'aquesta prova és la detecció de proteïnes. El RIA presenta el mateix rang de sensibilitat i rapidesa que l'ELISA, que l'està substituint progressivament, ja que implica una instal·lació de manteniment costós, perquè es tracta d'una instal·lació radioactiva i de gestió de residus radioactius.

5.6.2. Assajos de toxicitat

L'assaig de toxicitat més representatiu és el del **lisat d'amebòcits de *Limulus*** (**LAL**[7]), en el qual els efectes observables són la coagulació, l'augment de la terbolesa o una reacció cromogènica. Es fa servir per a determinar endotoxines bacterianes i mesurar glucans.

(7)Abreugem *lisat d'amebòcits de Limulus* amb la sigla *LAL*.

Les **endotoxines** són un component de la paret cel·lular dels bacteris gram-negatius. Es tracta d'agregats macromoleculars de prop d'1 milió de daltons (endotoxina lliure). En forma pura, les endotoxines són lipopolisacàrids (LPS[8]) la fracció lipídica dels quals (lípid A) és la responsable de la toxicitat característica de la molècula. S'ha observat que les propietats toxicològiques de les endotoxines són diferents segons les espècies i l'estadi de desenvolupament dels bacteris. En escalfar les endotoxines, el seu efecte tòxic augmenta, ja que les proteïnes es desnaturalitzen i, en conseqüència, les endotoxines accedeixen més fàcilment als receptors cel·lulars.

(8)Abreugem *lipopolisacàrids* amb la sigla *LPS*.

La captació es fa en filtres, que es tracten amb aigua destil·lada, i es preparen una sèrie de dilucions amb les quals s'efectua l'assaig que es basa en l'activació de la cadena enzimàtica de coagulació de la limfa del cranc *Limulus polyphemus*.

5.7. Proves genètiques

Les proves anomenades **genètiques** es basen en el reconeixement de seqüències d'àcid desoxiribonucleic (ADN[9]), cosa que permet detectar de manera ràpida i fiable la presència d'una espècie determinada.

(9)Abreugem *àcid desoxiribonucleic* amb la sigla *ADN*.

La hibridació d'àcids nucleics detecta la presència o absència de seqüències d'ADN específiques que són associades a un organisme. L'element clau en l'anàlisi és disposar d'una sonda d'àcid nucleic per a un microorganisme, una sola cadena d'ADN que contingui seqüències característiques de l'organisme. Quan en una mostra un microorganisme conté seqüències d'ADN complementàries a les de la sonda, es produeix la **hibridació**, i es forma una molècula de doble cadena. Per a detectar la reacció es marca la sonda amb molècules indicadores (enzims, isòtops radioactius o compostos fluorescents).

La tècnica genètica més característica és la reacció en cadena de la polimerasa (PCR[10]), que és un mètode *in vitro* de síntesi de seqüències d'àcids nucleics seleccionats, pel qual segments concrets d'ADN són específicament replicats.

(10)Sigla de *polymerase chain reaction*.

L'ADN es barreja amb bases de nucleòtids i l'enzim polimerasa i s'incuba en condicions de temperatura controlada. En el procés les cadenes se separen, es copien, es tornen a separar i es tornen a copiar; d'aquesta manera en molt poc temps s'obtenen milions de còpies de molècules d'ADN preparades per a l'assaig, al qual s'afegeixen sondes seleccionades d'ADN amb un marcador fluorescent o radioactiu capaços d'hibridar-se amb regions específiques de l'ADN buscat. La sonda es pot hibridar en quantitats detectables si l'organisme d'interès és present en la mostra inicial i si el segment d'ADN és amplificat.

És un mètode sensible, molt específic, ràpid i capaç de detectar microorganismes difícils de conrear o no conreables, amb l'avantatge afegit de no haver de manipular microorganismes perillosos, sinó una part. S'ha de tenir en compte, no obstant això, que és un mètode qualitatiu i només detecta agents biològics predeterminats.

5.8. Assajos químics

Consisteixen a determinar molècules biològiques que formen part estructural dels microorganismes o que són produïts per ells mitjançant tècniques instrumentals típiques de l'anàlisi química com la **cromatografia líquida d'alta resolució** (**HPLC**[11]), la **cromatografia de gasos** (**CG**[12]) i l'**espectrometria de masses** (**EM**[13]), usades de manera independent o en combinació.

(11) Abreugem *cromatografia líquida d'alta resolució* amb la sigla *HPLC*.

(12) Abreugem *cromatografia de gasos* amb la sigla *CG*.

(13) Abreugem *espectrometria de masses* amb la sigla *EM*.

Les molècules d'origen biològic determinades més sovint són:

- **Molècules estructurals de les membranes i parets dels microorganismes**, per exemple carbohidrats (peptoglúcids o betaglucans), àcids grassos, lípids (ergosterol de les membranes fúngiques) o lipopolisacàrids (endotoxines de la paret dels bacteris gramnegatius).

- **Productes metabòlics**, per exemple micotoxines fúngiques, aldehids, alcohols i altres compostos orgànics volàtils.

- **Macromolècules segregades**, per exemple enzims específics i altres proteïnes.

- **Macromolècules excretades**, per exemple la guanina continguda en els excrements dels àcars.

6. Avaluació

Com hem exposat al principi del mòdul, el tercer pas de la metodologia d'avaluació, la **valoració**, no és tan senzill com en el cas dels contaminants químics, ja que la utilització de límits quantitatius està sotmesa a discussió. En aquest apartat, resumim les principals referències existents, i també les raons exposades per l'ACGIH per a justificar l'**absència de valors de referència**.

6.1. Absència de criteris numèrics de valoració

La comissió per als bioaerosols de l'ACGIH exposa una sèrie de raons per explicar que **no és possible establir criteris numèrics de valoració**. Els resumim a continuació.

6.1.1. Absència de base científica

Establir un valor límit d'exposició general per a la concentració en ufc dels bioaerosols cultivables (fongs i bacteris totals que poden créixer en cultius de laboratori) o comptables (els grans de pol·len, espores de fongs, cèl·lules bacterianes i altres materials) que poden ser identificats i explicats per microscòpia, no té justificació científica perquè:

- Els bioaerosols són barreges complexes de diferents classes de partícules.

- Les respostes dels éssers humans als bioaerosols varien des d'efectes innocus fins a malalties greus, depenent de l'agent específic i dels factors de susceptibilitat de cada persona.

- Les concentracions mesurades dels bioaerosols cultivables i comptables depenen del mètode de presa de mostra i anàlisi. No és possible recollir i avaluar tots els components dels bioaerosols utilitzant un únic mètode de mostreig.

- Actualment, la informació que relaciona concentracions de bioaerosols cultivables o comptables amb efectes sobre la salut és, en general, insuficient per a descriure les relacions exposició-resposta.

6.1.2. Manca d'informació sobre efectes irritants, tòxics o al·lèrgics

La informació disponible sobre efectes irritants, tòxics o al·lèrgics habitualment només conté dades qualitatives de l'exposició. Les dades epidemiològiques que hi ha són insuficients per a descriure les relacions exposició-resposta per les raons següents:

a) La major part de les dades disponibles de concentracions de bioaerosols específics procedeixen més de mesures indicadores que de la determinació dels agents causants reals. Per exemple, la determinació de fongs cultivables s'utilitza per a representar l'exposició als al·lèrgens. A més, la major part de les determinacions procedeixen de punts d'acumulació d'aquests agents (reservoris) o de mostres ambientals. És poc probable que aquestes dades representin realment l'exposició humana als agents causants reals.

b) Els components i les concentracions dels bioaerosols varien àmpliament. Els mostrejadors d'aire utilitzats més comunament només prenen mostres en períodes curts que difícilment representen l'exposició humana. Les mostres puntuals en períodes curts poden contenir una quantitat d'un bioaerosol, concretament en ordres de magnitud molt superiors o inferiors a la concentració mitjana ambiental. Alguns organismes alliberen aerosols com a **concentracions d'irrupció**, que rarament es poden detectar utilitzant mostres puntuals. Aquests episodis de generació de bioaerosols poden produir efectes significatius per a la salut dels exposats.

c) En els estudis de llocs de treball individuals, el nombre de persones afectades per exposició a agents biològics pot ser petit si la contaminació està localitzada, i afectar d'aquesta manera només una part dels ocupants del local. No obstant això, les dades de diferents estudis rares vegades es poden combinar per a aconseguir xifres significatives de l'assaig a causa de la diversa especificitat dels tipus d'agents biològics responsables de malalties relacionades amb els bioaerosols que sovint difereixen molt d'un estudi a un altre. Aquests factors contribueixen a obtenir una potència estadística baixa a l'hora d'avaluar conjuntament les relacions causa-efecte entre l'exposició a agents biològics específics i les queixes de salut que hi estan relacionades.

6.1.3. Agents infecciosos

Les dades de les relacions dosi-resposta en humans estan disponibles per a uns quants bioaerosols infecciosos. Actualment, els protocols per al mostreig a l'aire d'agents infecciosos són limitats i adequats solament per a treballs de recerca. A la pràctica, les mesures típiques de salut pública, com la immunització activa (vacunació), la detecció de casos i el tractament mèdic, continuen essent les defenses primàries contra bioaerosols infecciosos.

Les instal·lacions associades a un risc més gran per a la transmissió de malalties infeccioses a l'aire (per exemple, els laboratoris de microbiologia, els estabularis i els establiments sanitaris) han de fer servir els controls tècnics, com aïllament per zones, ventilació controlada i d'altres per a minimitzar les concentracions d'agents infecciosos a l'aire. A més, aquestes instal·lacions han de considerar la necessitat d'aplicar controls administratius, com restriccions d'entrada o permisos de treball, i equips de protecció personal adequats per a prevenir l'exposició dels treballadors a aquests bioaerosols.

6.1.4. Contaminants d'origen biològic analitzables

Els contaminants de procedència biològica que són analitzables són substàncies produïdes per la matèria viva, que, com hem vist, es poden detectar utilitzant diferents tipus d'assajos (químics, immunològics o biològics) i comprenen les endotoxines, micotoxines, al·lèrgens i compostos orgànics volàtils. Les proves existents no confirmen l'establiment de valors límit d'exposició per a cap d'aquestes substàncies analitzables. Els mètodes d'assaig per a certs al·lèrgens comuns presents a l'aire i endotoxines estan millorant constantment, al mateix temps que progressen les validacions sobre el terreny d'aquests mètodes.

També, les tècniques moleculars modernes permeten analitzar la concentració d'organismes específics, detectats normalment només per cultiu o recompte. En alguns estudis experimentals i epidemiològics s'han observat relacions dosi-resposta per a alguns bioaerosols analitzables. Per tant, és previsible que en un futur es puguin aplicar límits d'exposició per a determinats contaminants d'origen biològic analitzables.

6.2. Pautes per a l'avaluació de l'exposició a agents biològics

L'RD 664/1997, en l'article 4, dóna les pautes següents per poder avaluar l'exposició a contaminants biològics:

1) Identificats un o més riscos relacionats amb l'exposició a agents biològics durant la feina, s'ha de procedir, per als que no s'hagin pogut evitar, a avaluar-los determinant la naturalesa, el grau i la durada de l'exposició dels treballadors.

2) Quan es tracti de treballs que impliquin l'exposició a diverses categories d'agents biològics, els riscos s'han d'avaluar basant-se en el perill que representin tots els agents biològics presents. Vegeu la classificació dels agents biològics en grups, inclosos exemples d'agents classificats en cada grup, en la taula 5.

Taula 5. Classificació dels agents biològics en funció del risc d'infecció

Categoria	Definició	Exemples
Grup 1	Agent biològic que resulti poc probable que causi una malaltia en l'home.	La classificació comunitària no inclou els agents biològics del grup 1; el fet que un agent biològic no estigui classificat en els grups de risc 2 a 4 d'aquesta classificació no significa que estiguin implícitament classificats en el grup 1.
Grup 2	Agent patogen que pugui causar una malaltia en l'home i pugui comportar un perill per als treballadors; és poc probable que es propagui a la col·lectivitat, i hi ha, generalment, profilaxi o tractaments eficaços.	Bacteris: *Legionella pneumophila* Virus: virus de la grip Fongs: *Penicillium* sp.
Grup 3	Agent patogen que pugui causar una malaltia en l'home i presenti un perill seriós per als treballadors; hi ha el risc que es propagui a la col·lectivitat, però hi ha, generalment, profilaxi o tractaments eficaços.	Bacteris: *Mycobacterium tuberculosis* Virus: virus de l'hepatitis B Fongs: *Histoplasma capsulatum*
Grup 4	Agent patogen que causi una malaltia greu en l'home i representi un perill seriós per als treballadors; hi ha moltes possibilitats que es propagui a la col·lectivitat, i no hi ha, generalment, profilaxi o tractament eficaços.	Bacteris: no n'hi ha cap de classificat en aquest grup Virus: virus d'Ebola Fongs: no n'hi ha cap de classificat en aquest grup

INSHT. *NTP 409: Contaminantes biológicos: criterios de valoración.*

3) Aquesta avaluació s'ha de repetir periòdicament i, en tot cas, cada vegada que es produeixi un canvi en les condicions que pugui afectar l'exposició dels treballadors a agents biològics.

4) Així mateix, s'ha de procedir a una nova avaluació del risc quan s'hagi detectat en algun treballador una infecció o malaltia que se sospiti que sigui conseqüència d'una exposició a agents biològics a la feina.

5) Aquesta avaluació s'ha de fer tenint en compte tota la informació disponible i, en particular:

- La naturalesa dels agents biològics als quals estiguin o puguin estar exposats els treballadors i el grup al qual pertanyen. Si un agent no consta en la taula, l'empresari, després de consultar-ho als representants dels treballadors, n'ha d'estimar el risc d'infecció tenint en compte les definicions previstes, per tal d'assimilar-lo provisionalment als inclosos en un dels quatre grups previstos. En cas de dubte entre dos grups, s'ha de considerar en el de perillositat superior.

- Les recomanacions de les autoritats sanitàries sobre la conveniència de controlar l'agent biològic a fi de protegir la salut dels treballadors que estiguin o puguin estar exposats a aquest agent per la seva feina.

- La informació sobre les malalties susceptibles de ser contretes pels treballadors com a resultat de la seva activitat professional.

- Els efectes potencials, tant al·lèrgics com tòxics, que es puguin derivar de l'activitat professional dels treballadors.

- El coneixement d'una malaltia que s'hagi detectat en un treballador i que estigui directament lligada a la seva feina.

- El risc addicional per als treballadors especialment sensibles segons les seves característiques personals o de l'estat biològic conegut, a causa de circumstàncies com patologies prèvies, medicació, trastorns immunitaris, embaràs o lactància.

6.3. Criteris d'interpretació de resultats

La Comissió per Bioaerosols de l'ACGIH ha desenvolupat unes guies per a l'avaluació de l'exposició a contaminants biològics en ambients interiors que tenen en compte la valoració mèdica dels símptomes, l'avaluació del funcionament del local i el criteri del professional expert.

Lectura recomanada

Les guies de l'ACGIH no estan disponibles gratuïtament a Internet, però es poden adquirir a la pàgina web d'ACGIH.

En absència de criteris numèrics de valoració, cal decidir amb antelació els criteris d'interpretació que seran utilitzats per a determinar si un ambient està contaminat o no.

En termes generals, es podrien considerar els criteris d'interpretació següents dels resultats obtinguts:

- Els tipus i freqüències relatius dels contaminants biològics en l'ambient amb problemes i en un ambient **control** (l'exterior o un altre local sense problemes).

- L'evidència mèdica que una infecció o al·lèrgia ha estat causada per un contaminant biològic específic.

- Les relacions existents entre l'ambient interior i l'ambient control poden indicar possibles amplificacions.

- L'avaluació dels reservoris i les possibilitats d'amplificació i de disseminació.

A continuació, i a tall d'exemple, resumirem les guies per a la interpretació dels resultats, classificades segons els grups d'organismes més freqüents en la composició dels bioaerosols.

6.3.1. Virus

Moltes de les malalties associades als virus presenten símptomes ben definits, per la qual cosa l'existència d'una malaltia és la demostració que el virus hi va ser present. No es coneix el nombre de partícules necessàries per a causar una

infecció en un individu susceptible, encara que algunes proves suggereixen que un únic virus és capaç d'iniciar la infecció. Actualment, no hi ha prou proves que l'exposició a virus pugui causar intoxicacions o sensibilitzacions.

El fet que els virus siguin paràsits obligats (necessiten un ésser viu per a desenvolupar-se) i, per tant, siguin les persones les que actuen com a amplificadors i disseminadors (la parla, els esternuts o la tos) fa innecessària l'avaluació de l'ambient control. Factors com l'augment de l'ocupació o una renovació escassa de l'aire poden contribuir a l'augment de la taxa de contagi.

6.3.2. Bacteris

En general, en ambients en els quals no s'ha detectat cap amplificació específica, els bacteris dominants haurien de ser els corresponents a la flora bacteriana normal humana, és a dir, bacteris grampositius pertanyents als gèneres *Micrococcus* i *Staphilococcus*. Les concentracions ambientals elevades d'aquests tipus de bacteris, que es troben en la pell i en les secrecions respiratòries, indiquen nivells d'ocupació alts o que la renovació de l'aire és insuficient.

Si els bacteris dominants són gramnegatius, això indicaria l'existència de focus de contaminació inusuals; per exemple, nivells elevats de bacteris gramnegatius, oxidasa negativa i fermentadors de la glucosa suggereixen un focus de contaminació d'origen gastrointestinal (extraccions dels lavabos); si els bacteris oposats són gramnegatius, oxidasa positiva i les seves colònies són de color groc, el focus de contaminació més probable són aigües estancades i contaminades.

Alguns autors han suggerit la xifra de 4.500 ufc/m^3 com a límit superior de concentració de bacteris totals per a interiors i en climes subàrtics. Aquesta xifra només és aplicable per a organismes d'origen humà i se n'exclou qualsevol tipus de patògens. Tampoc no és aplicable per a climes més càlids.

6.3.3. Endotoxines

Les endotoxines són components (lipopolisacàrids) de les membranes externes dels bacteris gramnegatius. Són compostos altament tòxics que poden causar febre i malestar, alteracions en el nombre de leucòcits, alteracions respiratòries, etc. Alguns autors suggereixen nivells entre 100 i 1.000 vegades superiors als nivells mesurats en els ambients control.

6.3.4. Fongs

L'origen dels fongs que habitualment es troben en els ambients interiors és majoritàriament de l'exterior, per la qual cosa s'utilitzarà preferentment com a ambient control.

Les diferències en les relacions entre els fongs de l'interior i de l'exterior depenen, fonamentalment, del sistema de ventilació disponible. Aquesta relació és pràcticament idèntica quan l'edifici està ventilat de manera natural, mentre que, en edificis ventilats de manera mecànica, fins i tot en els edificis amb un sistema de filtració deficient, la concentració de fongs oposats a l'interior hauria de ser inferior a la present a l'exterior. En tot cas, els diferents tipus de fongs oposats de l'interior haurien de correspondre a les espècies de l'exterior pròpies de l'estació climàtica.

Els nivells de fins a 100 ufc/m^3 de fongs sapròfits poden ser considerats normals, sempre que es tracti d'ambients en els quals no hi hagi població amb deficiències o malalties del sistema immunitari.

6.3.5. Micotoxines

Durant els processos de destrucció de la matèria orgànica, utilitzada com a font d'energia pels fongs, es produeixen metabòlits secundaris; alguns són tòxics per als bacteris (antibiòtics), mentre que d'altres ho són per als animals i els éssers humans (micotoxines: tricotecens i aflatoxines).

L'exposició a aquests compostos es relaciona, bàsicament, amb ambients agrícoles i l'emmagatzematge de gra. Els efectes per a la salut que han estat descrits són la seva potencialitat per a induir processos cancerígens, la deterioració del sistema immunitari i danys en diversos òrgans com és ara el cor, el fetge o els ronyons.

Actualment, es disposa d'algunes dades sobre les dosis a les quals algunes micotoxines produeixen efectes adversos per a la salut. Diversos tricotecens es caracteritzen perquè tenen dosis letals per al 50% dels individus exposats inferiors a 1 mg/kg (via digestiva). L'aparició d'efectes crònics (càncer) en relació amb l'exposició a aflatoxines pot ocórrer a dosis de l'ordre de μg/kg. És bastant probable que els efectes crònics causats per l'exposició a micotoxines siguin amplificats quan la via d'entrada en l'organisme sigui la inhalatòria.

La identificació i avaluació dels riscos causats per l'exposició a micotoxines és complexa i requereix, en general, un mostreig tant dels fongs que les produeixen com de cada tipus de micotoxines. El fet de trobar fongs productors de micotoxines en mostres ambientals no sempre és una prova que hi hagi una exposició.

Moltes de les soques dels fongs denominats *toxigènics* no produeixen micotoxines d'una manera rutinària i algunes només les produeixen en condicions de laboratori. En mostrejos ambientals amb medis de cultiu inespecífics, alguns d'aquests fongs no poden competir amb altres espècies de fongs, per la qual

cosa els nivells de fongs toxigènics són inferiors als nivells ambientals reals. No obstant això, el fet de trobar nivells inusuals de fongs toxigènics hauria d'anar acompanyat del mostreig ambiental de toxines específiques.

6.3.6. Protozous

La grandària d'aquests organismes fa que la seva presència en els bioaerosols sigui menys freqüent, ja que tendeixen a sedimentar ràpidament. Si hi hagués proves d'efectes relacionables amb organismes patògens d'aquest grup, se n'haurien d'analitzar els reservoris (humidificadors, aigües estancades), per a poder determinar l'origen dels problemes i eliminar els focus de contaminació.

6.3.7. Antígens

Les al·lèrgies a la pols domèstica són conegudes des de fa anys. En les últimes dècades s'ha fet un progrés considerable en la identificació, purificació i caracterització dels al·lèrgens produïts pels àcars de la pols domèstica, sobretot els produïts per les espècies de l'àcar *Dermatophagoides* (DerπI i II, Der f I i II i Der m I i II).

Lectures recomanades

Per a més informació sobre els àcars, consulteu les NTP de l'INSHT següents:

"NTP 652: Sensibilización laboral por exposición a ácaros (I): ácaros en el ambiente laboral"

"NTP 653: Sensibilización laboral por exposición a ácaros (II): técnicas de muestreo y prevención"

Alguns autors han proposat els valors d'antigen d'àcars en pols que poden causar sensibilització i l'aparició de símptomes en persones sensibilitzades (taula 6).

Taula 6. Concentracions d'antigen d'àcars en pols i risc associat

Concentració mg DerπI/ g o Der f I/g de pols	Nivell de risc
< 2	Baix
2^{-10}	Significatiu
> 10	Alt

INSHT. *NTP 409: Contaminantes biológicos: criterios de valoración.*

No obstant això, encara no s'han proposat valors límit de concentració per a altres antígens ambientals; tanmateix, com que els individus sensibilitzats reaccionen enfront de dosis molt baixes d'antigen, no s'hauria d'acceptar cap valor de concentració com a segur per a aquestes persones.

D'altra banda, uns nivells molt baixos d'antigen, probablement, no constitueixen un risc de sensibilització per a pacients nous. De tot això es desprèn que l'aplicació de totes les mesures de control disponibles que rebaixin els nivells ambientals d'antigen poden fer que un edifici sigui segur per als ocupants no sensibilitzats, però no per a totes les persones que hagin desenvolupat la malaltia a conseqüència de la seva permanència a l'edifici.

Exercicis d'autoavaluació

Exercicis

1. Quin és el mínim nombre total de mostres que cal prendre per a determinar una concentració mitjana en avaluar una exposició per inhalació a agents biològics?

2. Quin és el mínim nombre total de mostres que cal prendre per a determinar l'interval de confiança de la mitjana i la seva variància?

3. Quin és el volum d'aire, m^3, captat en les condicions de cabal i temps de mostreig següents?

a) 30 l/min durant 6 min.

b) 60 l/min durant 3 min.

c) 80 l/min durant 2 min.

4. Quin seria el temps de mostreig adequat per a una determinació de bacteris a l'aire si es vol tenir una densitat mínima de 50 ufc/cm^2, en què l'àrea de captació del mostrejador és de 100 cm^2, el cabal del mostrejador de 10 l/min i la concentració estimada de bacteris a l'aire de 100 ufc/m^3?

5. Calculeu l'eficàcia tècnica d'un mostreig en el qual l'eficàcia de conservació biològica va ser del 95%, l'eficàcia de l'entrada de l'aire del 90% i el diàmetre aerodinàmic de tall de 0,7. No es reconsideren pèrdues en altres elements de l'equip.

Preguntes obertes

6. Assenyaleu quins són els principals arguments que expliquen la no-existència de valors límit d'agents biològics a l'aire.

7. Quines són les alternatives a la determinació d'agents biològics a l'aire per a l'avaluació de riscos per a la protecció dels treballadors?

Elecció múltiple

8. L'estratègia de mostreig, ha d'incloure les especificacions sobre...

a) la concentració esperada de l'agent biològic a l'aire.
b) els mètodes analítics que s'utilitzaran per a detectar, quantificar i identificar els agents biològics.
c) els focus de contaminació típics dels agents biològics.
d) Totes les anteriors.

9. Conèixer els agents biològics que s'estudiaran és...

a) una condició imprescindible per a iniciar el mostreig.
b) una bona ajuda, encara que no imprescindible, per a iniciar el mostreig.
c) important solament per a preparar el cultiu per a la seva anàlisi.
d) important solament quan es tracta d'organismes cultivables.

10. Conèixer la variabilitat dels agents biològics en l'espai i el temps...

a) és útil per a preparar les mesures de prevenció i protecció.
b) és fonamental per a l'estratègia de mostreig.
c) és una informació que només s'usa científicament.
d) en general no interessa a causa de la mateixa complexitat dels bioaerosols.

11. Escollir els equips i mètodes més idonis per a la captació dels agents biològics a l'aire...

a) és una funció de l'higienista especialista en agents biològics.
b) forma part de l'estratègia del mostreig.
c) a) i b) són certes.
d) Cap de les anteriors no és certa.

12. Per a controlar o evitar una contaminació per legionel·la de l'aigua corrent sanitària és recomanable...

a) mantenir-la a temperatura ambient.
b) mantenir-la entre 40 °C i 60 °C.
c) mantenir-la per sobre de 60 °C sempre.
d) no barrejar mai l'aigua calenta amb la freda.

13. No és una raó per a prendre la decisió de mesurar la presència d'agents biològics a l'aire:

a) localitzar focus d'emissió.
b) obtenir dades epidemiològiques.
c) comprovar l'eficàcia de mesures de control.
d) certificar una malaltia professional.

14. Comprovar les hipòtesis elaborades per a explicar una exposició a agents biològics...

a) és un bon argument per a dur-ne a terme la determinació a l'aire.
b) forma part de la higiene operativa biològica.
c) és funció de la higiene teòrica.
d) és responsabilitat dels epidemiòlegs, no dels higienistes.

15. El nombre de mostres que cal prendre...

a) depèn de l'experiència de l'higienista. Com més experiència tingui, menys mostres.
b) és fixat per la norma UNE corresponent, sense possibilitat de modificar-lo.
c) és fixat en l'RD 664/97.
d) Cap de les anteriors.

16. El volum de mostreig està relacionat amb...

a) el LID.
b) el cabal.
c) el temps de mostreig.
d) Totes les anteriors.

17. El paràmetre d_{ae50} significa...

a) el diàmetre aerodinàmic de tall.
b) la grandària de partícula a la qual la meitat de partícules seran captades.
c) a) i b) són certes.
d) Cap de les anteriors.

18. Les espores...

a) es determinen sempre com a organismes comptables.
b) es determinen sempre com a organismes cultivables.
c) se solen determinar com a organismes comptables, encara que poden ser també cultivables.
d) solament es troben a l'aire a la primavera.

19. Quins captadors usats per a agents biològics són equivalents als utilitzats per a agents químics?

a) Els ciclons humits.
b) Els filtres.
c) Els flascons rentadors de gasos.
d) b) i c) són certes.

20. Prendre com a referència per a emetre una opinió sobre una contaminació biològica en un local la contaminació a l'exterior...

a) és una pràctica relativament habitual.
b) s'usa solament a centres sanitaris.
c) no té cap sentit.
d) es pot dur a terme si a l'exterior tenim garanties que no hi ha contaminació ambiental per agents químics, la qual cosa distorsionaria el resultat.

21. La microscòpia electrònica permet...

a) determinar espècies de fongs una vegada cultivats.
b) determinar colònies de bacteris una vegada cultivats.
c) complementar i, en alguns casos, substituir la microscòpia òptica.
d) Cap de les anteriors.

22. El RIA implica sempre...

a) un cultiu previ en agar-agar.
b) disposar d'un laboratori especialment equipat.
c) no poder aplicar un ELISA.
d) dur a terme abans un control dels microorganismes "comptables".

Solucionari

Exercicis d'autoavaluació

1. Solució: 18 mostres (vegeu la taula 2).

3 (o més vegades en un dia) × 3 (o més dies consecutius) × 2 (duplicats sempre) = 18.

2. Solució: 11 mostres (vegeu la taula 2).

3. a) 0,180 m^3

b) 0,180 m^3

c) 0,160 m^3

Volum = cabal × temps.

4. t = (50 × 100) / (100 × 10) = **5 min** (vegeu l'equació (1)).

5. *ETM* = 0,9 × (1 – 0) × 0,7 × 0,95 = 0,6; és a dir, **60%** (vegeu l'equació (4)).

6.
- Els bioaerosols són mescles complexes de diferents classes de partícules.
- Les respostes dels éssers humans als bioaerosols són molt variables.
- Les concentracions mesurades dels bioaerosols cultivables i comptables són poc fiables, ja que depenen totalment del mètode de presa de mostra i anàlisi.
- La informació que relaciona concentracions de bioaerosols amb efectes sobre la salut sol ser insuficient per a descriure les relacions exposició-resposta.

7.
- Aïllament per zones.
- Control de la ventilació.
- Restriccions d'entrada al personal (zones restringides).
- Permisos de treball.
- Ús i gestió adequats dels equips de protecció personal adequats per a prevenir l'exposició dels treballadors als bioaerosols.

8. d

9. a

10. b

11. c

12. c

13. d

14. a

15. d

16. d

17. c

18. c

19. d

20. a

21. c

22. b

Bibliografia

ACGIH (1989). *Commitee Activities and Reports. Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment*. Cincinnati, Ohio, EUA: ACGIH.

ACGIH (1999). *Bioaerosols. Assessment and control*. Cincinnati, Ohio, EUA: ACGIH.

ACGIH (2012). *Thresold limit values for chemical and physical Agentes & Biological exposure indices*. Cincinnati, Ohio, EUA: ACGIH.

AIHA (2005). *Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples* [en línia]. Disponible a: https://webportal.aiha.org/Purchase/ProductDetail.aspx?Product_code=2a9e0a5a-4778-de11-96b0-0050568361fd.

AIHA (2007). *Aerosol Sampling: Science, Standards, and Instrumentation and Applications* [en línia]. Disponible a: https://webportal.aiha.org/Purchase/ProductDetail.aspx?Product_code=AF40FF53-4778-DE11-96B0-0050568361FD.

Baur, X. (2005). "Enzymes as occupatinal and environmental respiratory sensitisers". *Int. arch. Occup. Environ. Health* (vol. 78, núm. 4).

Douwers, S. J. i alters (2003). "Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects". *Ann. Occup. Hyg.* (vol. 47, núm. 3).

Dutkiewicz, J. (1997). "Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard". *Ann. Agric. Environ. Med.* (vol. 4, *keynote reviews*).

INSHT (2002). *Higiene industrial* (2a. ed.). Madrid: INSHT.

INSHT (2006). *Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos* [en línea]. Disponible a: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/agen_bio.pdf.

INSHT. *NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire*.

INSHT. *NTP 351: Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales*.

INSHT. *NTP 409: Contaminantes biológicos: criterios de valoración*.

INSHT. *NTP 538: Legionelosis: medidas de prevención y control en instalaciones de suministro de agua*.

INSHT. *NTP 608: Agentes biológicos: planificación de la medición*.

INSHT. *NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I)*.

INSHT. *NTP 610: Agentes biológicos: equipos de muestreo (II)*.

INSHT. *NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras*.

INSHT. *NTP 652: Sensibilización laboral por exposición a ácaros (I): ácaros en el ambiente laboral*.

INSHT. *NTP 653: Sensibilización laboral por exposición a ácaros (II): técnicas de muestreo y prevención*.

INSHT. *NTP 691: Legionelosis: revisión de las normas reglamentarias (I). Aspectos generales*.

INSHT. *NTP 692: Legionelosis: revisión de las normas reglamentarias (II). Medidas específicas*.

INSHT. *NTP 802: Agentes biológicos no infecciosos: enfermedades respiratorias*.

INSHT. *NTP 807: Agentes biológicos: glosario*.

INSHT. *NTP 833: Agentes biológicos. Evaluación simplificada*.

IRRSST. *Les bioaérosols en millieu de travail: guide de'évaluation, de contrôle et de prévention* [en línia]. Disponible a: http://www.irsst.qc.ca/fr/_publicationirsst_810.html.

Lacey, J.; Crook, B. (1988). "Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens". *Ann. Occup. Hyg.* (vol. 32, núm. 4).

Reial decret 664/1997, de 12 de maig, sobre la protecció dels treballadors contra els riscos relacionats amb l'exposició a agents biològics durant la feina [en línia]. Disponible a: http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/doc.php?id=BOE-A-1997-11144.

Reial decret 909/2001, de 27 de juliol, pel qual s'estableixen els criteris higienicosanitaris per a la prevenció i el control de la legionel·losi [en línia]. Disponible a: http://www.boe.es/boe/dias/2001/07/28/pdfs/A27750-27759.pdf.

UNE-EN 481, de gener de 1995, atmosferes al lloc de treball. Definició de les fraccions per la grandària de partícules per a la mesura d'aerosols.

UNE-EN 482, de novembre del 2007, atmosferes al lloc de treball. Requisits generals relatius al funcionament dels procediments per a la mesura d'agents químics.

UNE-EN 689, de març de 1996, atmosferes al lloc de treball. Directrius per a l'avaluació d'agents químics per a la comparació amb els valors límit i estratègia de mostreig.

UNE-EN 13098, de maig del 2001, atmosferes al lloc de treball. Directrius per a la mesura de microorganismes i endotoxines suspesos a l'aire.

Xunta de Galicia (2001). *Riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos: su evaluación y control*. Xunta de Galicia, Centro de Seguridad e Higiene en el Trabajo Pontevedra.