

Medición de contaminantes biológicos en aire

Xavier Guardino Solà

PID_00186786



Los textos e imágenes publicados en esta obra están sujetos –excepto que se indique lo contrario– a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada (BY-NC-ND) v.3.0 España de Creative Commons. Podéis copiarlos, distribuirlos y transmitirlos públicamente siempre que citéis el autor y la fuente (FUOC. Fundació para la Universitat Oberta de Catalunya), no hagáis de ellos un uso comercial y ni obra derivada. La licencia completa se puede consultar en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/legalcode.es>

Índice

Introducción.....	5
Objetivos.....	11
1. Aspectos básicos en la medición de agentes biológicos.....	13
1.1. Por qué medir	16
1.2. Qué medir	17
1.3. Dónde y cuándo medir	17
1.4. Cómo medir	19
1.5. Cuántas muestras se han de tomar	20
1.6. Volumen y tiempo de muestreo	21
1.7. Eficacia del muestreo	24
2. Equipos de muestreo de aire.....	26
2.1. Muestreo inercial	26
2.1.1. Muestreador de rendija	26
2.1.2. Muestreador Andersen	27
2.1.3. Muestreadores multiorificio	28
2.1.4. Frascos borboteadores	28
2.1.5. Ciclones lavadores	30
2.1.6. Muestreador RCS	30
2.2. Filtración	31
2.2.1. Filtros capilares	31
2.2.2. Filtros de membrana	32
3. Muestreo de materiales y superficies.....	33
3.1. Frotis de superficies	34
3.2. Muestreo por contacto	34
3.2.1. Placas de contacto	34
3.2.2. Cintas adhesivas	35
4. Selección del muestreador.....	36
5. Análisis de las muestras.....	38
5.1. Transporte y conservación de las muestras	39
5.2. Tipos de estudios	40
5.3. Cultivo de microorganismos. Bacterias y hongos	41
5.3.1. Placa con medio de cultivo	42
5.3.2. Temperatura de incubación	43
5.3.3. Atmósfera de incubación	44
5.3.4. Recuento de colonias	44

5.3.5. Identificación de microorganismos cultivables	45
5.4. Recuento de microorganismos, polen y esporas	47
5.5. Técnicas microscópicas	47
5.6. Bioensayos	49
5.6.1. Inmunoensayo	49
5.6.2. Ensayos de toxicidad	51
5.7. Pruebas genéticas	51
5.8. Ensayos químicos	52
6. Evaluación.....	53
6.1. Ausencia de criterios numéricos de valoración	53
6.1.1. Ausencia de base científica	53
6.1.2. Falta información sobre efectos irritantes, tóxicos o alérgicos	54
6.1.3. Agentes infecciosos	54
6.1.4. Contaminantes de origen biológico analizables	55
6.2. Pautas para la evaluación de la exposición a agentes biológicos	55
6.3. Criterios de interpretación de resultados	57
6.3.1. Virus	58
6.3.2. Bacterias	58
6.3.3. Endotoxinas	59
6.3.4. Hongos	59
6.3.5. Micotoxinas	59
6.3.6. Protozoos	60
6.3.7. Antígenos	60
Ejercicios de autoevaluación.....	63
Solucionario.....	66
Bibliografía.....	67

Introducción

Los agentes biológicos pueden acceder al interior del organismo humano a través de las mismas vías de penetración que los contaminantes químicos, aunque en este caso la vía parenteral, sobre todo, y la digestiva son también importantes. Cuando el agente se halla en suspensión en el aire, solo o depositado en un aerosol, se habla de la existencia de un **bioaerosol**, cuya medición y evaluación tratamos en el presente módulo.

Se define a los **agentes biológicos** como microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad. Se consideran también incluidos los agentes no convencionales asociados con las encefalopatías espongiiformes transmisibles llamados priones.

Un **microorganismo** es toda entidad microbiológica, celular o no, capaz de reproducirse o de transferir material genético, mientras que un **cultivo celular** se define como el resultado del crecimiento *in vitro* de células obtenidas de organismos multicelulares y **parásito** como un ser vivo que vive y se nutre a expensas de otro sin aportar ningún beneficio; cuando el ser vivo parasitado es el hombre, se llama parásito humano.

De la definición de agente biológico cabe remarcar que el daño al organismo afectado no solamente son infecciones, sino también respuestas alérgicas y efectos tóxicos. Por otro lado, y aunque no se indica expresamente en dicha definición, el concepto de contaminante biológico incluye también sustancias generadas por ellos e, incluso, partes de ellos mismos. Finalmente, se llama **vector** al animal que transmite una enfermedad sin padecerla él mismo.

Al abordar la contaminación biológica se incluyen los efectos tóxicos y alérgicos causados por sustancias generadas por organismos vivos, siendo las más importantes las micotoxinas, sustancias provenientes de los hongos que pueden presentar niveles de toxicidad muy elevados, como es el caso de las aflatoxinas, tricotecenos y ocratoxinas. En la propia clasificación formal de los agentes biológicos, se incluye su capacidad de producir toxinas o de generar efectos alérgicos.

Lecturas recomendadas

Véanse las notas técnicas siguientes:

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

“NTP 802: Agentes biológicos no infecciosos: enfermedades respiratorias”

Cabe recordar también que los aspectos legales de los procedimientos a aplicar y la manera de gestionar la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos están establecidos por la legislación, concretamente por el RD 664/97.

La evaluación de riesgos por exposición a agentes biológicos que tratamos aquí se basa en el típico proceso de **identificar, medir, evaluar** y obtener conclusiones con las correspondientes recomendaciones de las correcciones a efectuar en su caso.

En primer lugar, pues, debemos proceder a la **identificación** de los posibles agentes biológicos presentes. En la tabla 1 se resume la clasificación de los agentes biológicos en función de su peligrosidad.

Lectura recomendada

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos durante el Trabajo.

Tabla 1. Clasificación de los agentes biológicos en grupos de peligrosidad

Grupos de riesgo de los agentes biológicos			
Agentes biológicos del grupo de riesgo	Riesgo infeccioso	Riesgo de propagación a la colectividad	Profilaxis o tratamiento eficaz
1	Poco probable que cause enfermedad	No	Innecesario
2	Pueden causar una enfermedad y constituir un peligro para los trabajadores	Poco probable	Posible generalmente
3	Puede provocar una enfermedad grave y constituir un serio peligro para los trabajadores	Probable	Posible generalmente
4	Provocan una enfermedad grave y constituyen un serio peligro para los trabajadores	Elevado	No conocido en la actualidad

El primer paso es comprobar si la presencia de estos agentes en el ambiente de trabajo se puede eliminar por sustitución del agente, proceso o técnica. Dicho de otra manera, si es imprescindible usar el agente concreto en las condiciones en que se usa, o bien si está presente en función del tipo de material tratado o actividad desarrollada. En aquellos casos en que no sea posible prescindir del agente y pueda haber exposición, procederemos a evaluarla, determinando su naturaleza, grado y duración. Esta evaluación deberemos repetirla periódicamente y siempre que, o se produzca un cambio en las condiciones de trabajo, o hayamos detectado una infección, alergia o toxicidad que puedan relacionarse a una exposición.

La **evaluación** se efectuará teniendo en cuenta toda la información disponible y, en particular:

- La naturaleza de los agentes biológicos y el grupo al que pertenecen.
- Las recomendaciones de las autoridades sanitarias.
- La información sobre las enfermedades, así como sus efectos alérgicos o tóxicos.
- La detección de una enfermedad directamente ligada al trabajo.
- El riesgo adicional para los trabajadores especialmente sensibles.

- La concentración de agentes biológicos determinada en aire.

En cuanto al último punto, en muchos casos no se podrá obtener una valoración ambiental cuantitativa semejante a las que se realiza en la evaluación de la exposición a agentes químicos. Ello es debido, por un lado, a los problemas de representatividad asociados al muestreo de bioaerosoles, y por otro, a que no están establecidos criterios de valoración numéricos para este tipo de contaminantes que permitan emitir un juicio rápido sobre la peligrosidad de la situación. La publicación *TLVs. Valores límite para sustancias químicas y agentes físicos en el ambiente de trabajo. BEIs. Índices biológicos de exposición*, de la ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists), justifica las razones que, por el momento, hacen imposible el establecimiento de dichos criterios.

Estas limitaciones hacen que la metodología de evaluación de la exposición a agentes biológicos necesite de un trabajo previo de análisis, en el que, partiendo de la máxima información disponible sobre la actividad laboral en estudio, se puedan definir las herramientas que se van a utilizar para alcanzar el objetivo planteado, que no es otro que evitar o limitar la exposición.

Estas herramientas consisten en:

- Planificación de la medición.
- Diseño de unos criterios de valoración.
- Selección de las medidas de prevención y control de la exposición.

Todas ellas están íntimamente relacionadas por lo que su definición debe ser simultánea. La conclusión final establecerá, prácticamente para cada situación de trabajo, una metodología de evaluación específica que, por lo general, no será extrapolable a otras situaciones de trabajo en las que pueda existir exposición a agentes biológicos, por similares que estas sean.

Una vez realizada la preceptiva evaluación de riesgos, nos podemos encontrar frente a distintas situaciones, que se resumen en la figura 1:

- Si la exposición es deliberada, deberán aplicarse las medidas que se exponen en el presente módulo.
- Si la exposición se refiere a un agente biológico del grupo 1 o a gérmenes vivos atenuados (vacunas), deben observarse los principios de correcta seguridad e higiene profesional, sin ser necesaria la aplicación de otras medidas complementarias.

Lectura recomendada

La publicación anual *ACGIH Threshold Limit Values (TLVs[®]) and Biological Exposure Indices (BEIs[®])*, así como otros documentos relacionados no están disponibles gratuitamente en Internet, pero se pueden adquirir en la página web de ACGIH.

- Si la exposición no implica la intención deliberada de manipular agentes biológicos, pero puede existir una exposición, se actuará en función de los resultados de la evaluación de riesgos. Si de esta se dedujera que con las medidas existentes no fuera suficiente, se aplicarán las medidas que se exponen en el presente módulo. A continuación presentamos un listado de ejemplos de actividades sin intención deliberada de manipulación.

Ejemplos de manipulación deliberada

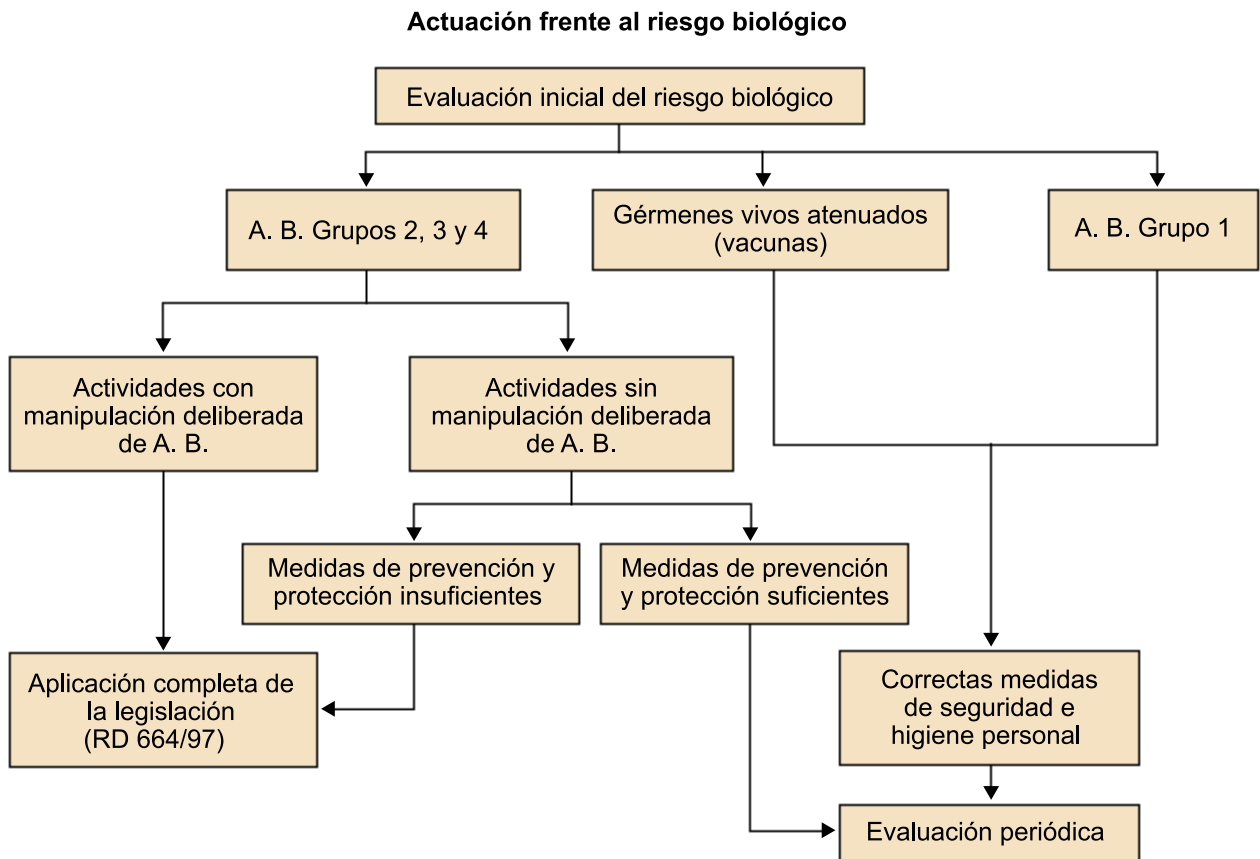
Son ejemplos de manipulación deliberada los laboratorios de diagnóstico microbiológico, los trabajos con animales deliberadamente infectados y en instalaciones industriales que utilicen agentes biológicos en grandes cantidades.

Lista indicativa de actividades que se consideran con intención no deliberada de manipulación de agentes biológicos

- Trabajos en centros de producción de alimentos.
- Trabajos agrarios.
- Actividades en las que existe contacto con animales o con productos de origen animal.
- Trabajos de asistencia sanitaria, comprendidos los desarrollados en servicios de aislamiento y de anatomía patológica.
- Trabajos en laboratorios clínicos, veterinarios, de diagnóstico y de investigación, **con exclusión de los laboratorios de diagnóstico microbiológico, ya que se considera manipulación deliberada.**
- Trabajos en unidades de eliminación de residuos.
- Trabajos en instalaciones depuradoras de aguas residuales.

Fuente: Anexo I, RD 664/97

Figura 1. Evaluación del riesgo biológico



En el apartado correspondiente a la reducción de riesgos del RD 664/97 se indica que, cuando sea necesaria y técnicamente posible, se llevará a cabo la verificación de la presencia de los agentes biológicos utilizados en el trabajo fuera del confinamiento físico primario. Recurrir a la **medición** de los agentes biológicos en aire para su comparación con criterios de valoración, como ya hemos comentado, no suele ser una medida muy frecuente. Igual que ocurre con los contaminantes químicos, también aquí pueden aplicar procedimientos de evaluación simplificada.

Por otro lado, también se puede medir la presencia de los agentes biológicos en superficies y en líquidos. En estos casos, se toman muestras por contacto en el caso de las superficies y, si se trata de líquidos, se determinan directamente en el líquido.

Los procedimientos empleados para la captación de bioaerosoles que puedan cultivarse son:

- la **sedimentación**, empleando placas **Petri** abiertas que recogen los microorganismos por gravedad (que no trataremos aquí por su falta de interés en higiene industrial), o
- la **impactación**, consistente en forzar el contacto de un volumen de aire conocido con el medio de cultivo en el que quedarán retenidos. Estas placas, llevadas a las condiciones adecuadas, provocan la formación de colonias y su posterior recuento; el resultado se expresa en ufc/m^3 (unidades formadoras de colonias por metro cúbico).

Para aquellos agentes que puedan encontrarse en el aire en forma de esporas, como por ejemplo el polen, se suele emplear la **filtración**, usándose diversos materiales filtrantes y se citan como microorganismos contables, dando como resultado su número por metro cúbico. Si la filtración se lleva a cabo en condiciones que garanticen la supervivencia del agente, también se puede proceder a su cultivo posterior.

El segundo paso es la **identificación** de las especies microbianas captadas, que se inicia con una primera observación macroscópica del aspecto, forma, color, etc. de la colonia. Esta observación va seguida, en el caso de las bacterias, de una tinción de *Gram* y de la observación microscópica, que permitirá su clasificación en dos grupos, bacterias *Gram+* y *Gram-*; a partir de ahí se utilizan distintas pruebas que permiten la caracterización de la bacteria hasta su completa clasificación en género y especie. La identificación de hongos, tras la observación macroscópica, sigue con la observación microscópica de un corte de la colonia que permitirá identificar la estructura vegetativa del hongo, así como la forma de sus esporas lo que conducirá a la identificación del género y la especie.

Lectura recomendada

El procedimiento para llevar a cabo una evaluación simplificada del riesgo biológico se expone en la nota técnica NTP 833:

“NTP 833: Agentes biológicos. Evaluación simplificada”

El tercer paso de la metodología de evaluación es la **valoración**, la cual, al estar sometida a discusión la utilización de límites cuantitativos, presenta dificultades. Cuando aparecen especies patógenas la conclusión es siempre que se trata de una situación de riesgo. Cuando se trata de especies banales, la valoración depende de muchos factores, por lo que difícilmente puede ser concluyente; una solución operativa es tomar muestras del aire próximo al lugar estudiado (por ejemplo en el exterior más cercano) y hacer una comparación cualitativa y cuantitativa.

Lectura recomendada

Los criterios de valoración para la evaluación de la exposición a agentes biológicos basada en su determinación cualitativa y cuantitativa en aire se exponen en la nota técnica NTP 409:

“NTP 409: Contaminantes biológicos: criterios de valoración”

Objetivos

Con el estudio de este módulo se persiguen los objetivos siguientes:

- 1.** Conocer las bases de la evaluación de agentes biológicos.
- 2.** Conocer la mecánica del proceso de evaluación de la exposición a agentes biológicos.
- 3.** Identificar los principales procedimientos de medición de agentes biológicos en aire.
- 4.** Ser capaces de diseñar una serie de mediciones para obtener un resultado fiable.
- 5.** Conocer los mecanismos de la determinación de agentes biológicos en superficies y líquidos.
- 6.** Conocer los principales procedimientos de análisis microbiológico y químico de las muestras.
- 7.** Conocer las limitaciones de los mecanismos de evaluación de los resultados.
- 8.** Ser capaces de obtener conclusiones razonadas sobre el riesgo por exposición a agentes biológicos.

1. Aspectos básicos en la medición de agentes biológicos

La medición de agentes biológicos en aire, que implica la toma de muestras y el análisis de las mismas, debe proporcionar la información básica para la toma de decisiones y para que esto sea así, se debe tener la garantía de que las mediciones realizadas son fiables y representativas de la exposición.

Hasta donde fuera posible, la proporción relativa de un agente biológico en una muestra debería reflejar su proporción en el material original. Para lograr este objetivo, la muestra debe ser manipulada de tal forma que no se deteriore o pueda ser contaminada durante su captación, transporte y análisis, y que los agentes biológicos sufran los mínimos cambios posibles. Sin embargo, la experiencia nos dice que los resultados obtenidos en una medición ambiental no son siempre fiables, fáciles de interpretar y que unos datos incompletos sobre la exposición a bioaerosoles pueden confundir y complicar un estudio, conduciendo a conclusiones erróneas.

Por lo tanto, al iniciar la evaluación de una posible exposición a agentes biológicos hay que tener claro de qué manera la medición puede ayudar o complicar la resolución de la misma. La experiencia profesional y el conocimiento sobre los agentes biológicos son la clave a la hora de decidir efectuar o no la medición, que no siempre va a ser posible o necesaria.

Si optamos por llevar a cabo la medición, esta debe dar respuesta a las diversas cuestiones que deben guiar su planificación. Partiendo de la pregunta, **¿por qué hay que medir?**, podremos definir el objetivo de la medición para, a continuación, pasar a tratar el resto de preguntas. Una estrategia de muestreo debe dar pues respuesta, a las cuestiones siguientes:

- **Por qué** medir.
- **Qué** agentes biológicos de los que componen un bioaerosol se deben medir.
- **Dónde** se deben tomar las muestras.
- **Cuándo** se deben tomar las muestras.
- **Cómo** se deben tomar las muestras, es decir, con qué recursos se cuenta para realizar la medición.
- **Cuántas** muestras se deben tomar para minimizar las limitaciones que supone el muestreo y que, en líneas generales, comprenden: el tiempo, las personas, los equipos, los recursos analíticos, etc.

Es función del higienista experto en agentes biológicos, decidir, caso por caso, cómo alcanzar sus objetivos sin comprometer la credibilidad, la representatividad y la integridad de los datos obtenidos. A continuación se exponen los aspectos por considerar al plantearse la medición de agentes biológicos en aire.

Aspectos a considerar en la medición de agentes biológicos en aire

- La naturaleza y los niveles previsibles de agentes biológicos.
- La caracterización de la exposición (concentración promedio, la peor situación, etc.).
- La idoneidad, coste y disponibilidad de los equipos de toma de muestras.
- El coste y disponibilidad de los diversos métodos de análisis.
- Las limitaciones que el método de análisis pueda imponer al muestreo.
- Las limitaciones que pueden suponer el tiempo y el transporte de las muestras al laboratorio.
- La experiencia de los técnicos (prevencionistas, analistas, etc.).

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

La estrategia de muestreo, además, debe incluir las especificaciones sobre:

- Los agentes biológicos que se van a estudiar.
- Los focos de contaminación típicos de los agentes biológicos.
- La concentración previsible.
- La variabilidad en el espacio para cada agente.
- La variabilidad en el tiempo para cada agente.
- Los métodos analíticos que se van a utilizar para detectar, cuantificar e identificar los agentes biológicos.
- Los equipos y métodos más idóneos para la captación de los agentes biológicos.

Ejemplo 1

En un estudio sobre la calidad de aire interior en un edificio de oficinas ventilado mecánicamente, se plantea la necesidad de la evaluación de la exposición a agentes biológicos. La información disponible dirige el estudio hacia la posible presencia y dispersión de bacterias y hongos en el sistema de ventilación y climatización.

Ello supone tener en cuenta la casi totalidad de los componentes de un bioaerosol, lo que implicará la selección (tipo y número) de los equipos de muestreo que serán necesarios. Este aspecto puede verse condicionado por la disponibilidad de dichos equipos y los correspondientes métodos de análisis para los distintos agentes biológicos, los cuales, a su vez, pueden condicionar la selección del equipo más adecuado.

Los criterios de valoración, en este caso, se deberán basar en la comparación (concentraciones y tipos de agentes) entre el ambiente problema y otro considerado como referencia, lo que supondrá definir las zonas donde se tomarán las muestras. Sin mencionar el número de muestras que serán necesarias para asegurar la representatividad del muestreo y para minimizar la variabilidad de los resultados, y el coste económico que todo ello pueda suponer.

Ejemplo 2

En el mismo estudio que en el ejemplo anterior, la información disponible dirige el estudio hacia la posible presencia de *Legionella* en alguna de las instalaciones.

En este caso, la metodología cambia. Por una parte, es conocida la dificultad técnica que existe de detectar y demostrar la presencia de esta bacteria en el aire y, por otra, se conocen ampliamente sus requisitos vitales, focos de contaminación más probables y las medidas que impiden su proliferación en los focos de contaminación. Todo ello hace innecesaria la medición ambiental de la misma. En cambio, sí será necesaria una toma de muestras del agua de la instalación y de muestras biológicas de los afectados para confirmar la hipótesis establecida, es decir, la presencia de la bacteria y la posible afectación de las personas expuestas.

Incluso tratándose de un mismo lugar de trabajo, las metodologías de evaluación pueden ser diferentes en función del agente biológico buscado.

Legionella

En el verano de 1976 hubo un brote epidémico durante la convención anual de la Legión Americana, celebrada en un hotel de la ciudad de Filadelfia. Entre los 4.000 asistentes a la convención se detectaron 221 casos de neumonía que provocaron la muerte de 34 personas, como resultado de la exposición a un agente infeccioso no identificado. La enfermedad del legionario, como la bautizó rápidamente la prensa, supuso un reto para los investigadores. Pero no fue hasta el año siguiente cuando el Centro de Control de Enfermedades (CDC¹) identificó al agente causal denominándolo *Legionella pneumophila* (figura 2).

Figura 2. *Legionella pneumophila*

a.



b.



a. Rocío Guerrero (2010). *Legionella pneumophila* al microscopio electrónico. b. GEFOR (2012). Cultivo de *Legionella pneumophila*.

⁽¹⁾ Acrónimo de *Center for Disease Control*.

Lecturas recomendadas

Consultar estos y otros aspectos en las notas técnicas siguientes:

“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”

Legislación española sobre legionelosis:

Real Decreto 865/2003, por el que se establecen los criterios higiénico - sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis

El descubrimiento puso en marcha diversos estudios retrospectivos mediante los cuales se pudieron atribuir al nuevo agente los casos de brotes neumónicos ocurridos en décadas anteriores y que todavía permanecían inexplicados. El nuevo agente resultó ser una bacteria *Gram* negativa de forma bacilar, ubicuo en medios acuáticos naturales, lagos, ríos, arroyos, lodos, etc.; que también sobrevive en pequeñas cantidades en los sistemas potabilizadores de agua, pudiendo ser transportada con ella a los edificios donde puede colonizar las instalaciones de suministro de agua y los sistemas de acondicionamiento del aire.

La *Legionella* crece en agua a temperaturas comprendidas entre 20 °C y 50 °C, con un desarrollo óptimo entre 35 °C y 45 °C. Por debajo de los 20 °C permanece latente, sin multiplicarse, y no sobrevive por encima de los 60 °C. Otros factores que tienen influencia en su desarrollo son: el pH del agua (sobreviven bien en intervalos de pH que oscilan entre 2 y 9,5); precisan de la presencia de L-cisteína y de sales de hierro; y se ha comprobado que la presencia de otras formas de vida como las algas y los protozoos le otorgan, al ser parasitadas, un grado de protección adicional frente a los tratamientos del agua. Su supervivencia en el aire es corta debido a la poca resistencia que presentan a la desecación y a los efectos de la radiación ultravioleta.

Se han identificado, al menos, 35 especies y 54 serogrupos de *Legionella*, por lo menos 20 de esas especies están relacionadas con enfermedades humanas. Más del 80% de todos los casos de legionelosis han sido causados por *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

Debido a que con cierta frecuencia aparecen brotes epidémicos, actualmente existe una legislación específica para su prevención y control. Aparte de esta, también existe legislación propia en la mayoría de Comunidades Autónomas.

1.1. Por qué medir

Varias son las razones que pueden llevar a tomar la decisión de medir la presencia de agentes biológicos en aire:

- Para dar cumplimiento a los requisitos legales, como la verificación, cuando sea necesaria y técnicamente posible, de la presencia de los agentes biológicos utilizados en el trabajo fuera del confinamiento físico primario, tal como establece el RD 664/97.
- Para obtener datos epidemiológicos.
- Por motivos de interés científico e investigación.
- Para conocer la existencia de una exposición.
- Para localizar focos de contaminación.
- Para comprobar la eficacia de las medidas de control.
- Para medir la liberación de bioaerosoles, ya se haya producido de forma accidental o deliberada.

En términos generales, la medición será útil para comprobar las hipótesis elaboradas para explicar la exposición a agentes biológicos.

1.2. Qué medir

Los bioaerosoles son mezclas complejas de microorganismos, de partículas derivadas de los microorganismos o conteniendo microorganismos, suspendidas en aire. Incluyen microorganismos vivos, cultivables y no cultivables, microorganismos muertos, sus fragmentos, toxinas y partículas producto de los desechos de todo tipo de la materia viva, que pueden causar determinados efectos adversos para la salud.

Los bioaerosoles están omnipresentes en la naturaleza, por lo que las personas están expuestas repetidamente, día tras día, a una amplia variedad de estos contaminantes. No obstante, dependiendo de la actividad desarrollada, se puede perfilar la composición de los bioaerosoles, es decir, determinar los agentes biológicos más probables asociados al sector de actividad y las distintas formas en que pueden estar presentes.

La composición del bioaerosol nos determina qué equipos de muestreo serán precisos, y la disponibilidad de técnicas analíticas apropiadas para detectar los componentes del bioaerosol nos fija las limitaciones de la medición.

1.3. Dónde y cuándo medir

La decisión sobre dónde y cuándo medir depende también del objetivo de la medida. Normalmente se trata de establecer las exposiciones promedio de los trabajadores o de caracterizar la exposición más adversa.

En general suele ser necesario conocer los niveles de fondo o de la situación más favorable, que se puede establecer midiendo en el exterior, en zonas tomadas como control o durante períodos de inactividad. Ello implica obtener información sobre las actividades específicas, los procesos, los posibles focos de contaminación y sobre el resto de factores que puedan intervenir en la exposición.

Para establecer exposiciones promedio que representen a una población, las muestras deben cubrir el rango completo de exposiciones y utilizar una estrategia que permita emitir una opinión con garantías, mientras que para determinar la exposición más desfavorable, las muestras se deberían tomar cerca de los focos de contaminación conocidos o sospechados, de los trabajadores sintomáticos, o de aquellos trabajadores que pueden tener o se cree que tienen la exposición más alta.

A continuación se presenta una estrategia para la toma de decisiones sobre cómo y cuándo medir.

Estrategia para planificar dónde muestrear

- Identificar provisionalmente los focos de contaminación y estimar la posibilidad de generación de aerosoles. Tratar de predecir los gradientes espaciales y temporales de bioaerosoles.
- Identificar las zonas en las que pueden haber diferencias en la composición y concentración de los bioaerosoles, por ejemplo: en el exterior y en el interior o en las proximidades del foco de contaminación y en las áreas definidas como **control**.
- Identificar los trabajadores que pueden padecer las exposiciones más altas y las más bajas.
- Identificar las zonas a las que se puede o no tener acceso.
- Seleccionar por lo menos una (preferiblemente tres), de las siguientes localizaciones:
 - Dónde se haya anticipado una exposición alta.
 - Dónde se haya anticipado una exposición baja.
 - En el exterior, cerca de las tomas de aire del edificio.
 - Si fuera de aplicación, muestrear además en las siguientes zonas:
 - En el exterior, cerca de fuentes potenciales (reservorios) de contaminación que pudiera entrar en el edificio.
 - En el exterior, en una zona suficientemente alejada de los focos potenciales de contaminación.

Los **límites de exposición laboral** se establecen como concentraciones permisibles para un tiempo habitual de ocho horas al día y cuarenta horas semanales, o de quince minutos para exposiciones de corta duración, determinados en función de si los posibles efectos son de tipo crónico o agudo.

Para el estudio de los **riesgos para la salud a largo plazo o crónicos**, los métodos de medición recomendables son aquellos que permitan tiempos de muestreo largos, como, por ejemplo los equipos de toma de muestra en filtros. Sin embargo, es obvio que este método es aplicable para organismos contables, pero no cuando se trata de determinar agentes biológicos vivos y cultivables, ya que la supervivencia de estos es difícil en muestreos largos y, por otro lado, la instrumentación más habitual está programada para muestreos cortos. Para estudiar los **efectos agudos**, lo deseable sería poder caracterizar los picos de emisión de la contaminación. Es probable, aunque no seguro, que esta emisión ocurra cuando la actividad sea máxima, por lo tanto el muestreo durante la peor situación puede ayudar a identificarlos.

Ejemplos

Planificación del muestreo para la evaluación de la contribución del sistema de ventilación a la presencia de esporas fúngicas en el aire interior:

1) Exterior

- En una zona alejada de las fuentes de bioaerosol más obvias. Esto proporciona la línea de base inicial correspondiente a la mejor calidad del aire exterior.
- En un punto próximo a la toma de aire del sistema de ventilación. Esto proporciona la línea de base que correspondería a la calidad del aire que entra en el edificio.

2) Interior

- En una zona próxima a los difusores de suministro de aire. Esto proporciona información sobre el aire distribuido por el sistema de ventilación. Se recomienda realizar el muestreo de la siguiente forma:
 - Cuando el sistema de ventilación haya estado parado al menos durante una noche (preferiblemente, durante un fin de semana).
 - Inmediatamente tras la puesta en marcha del sistema, orientado el muestreador de tal forma que el aire entre directamente desde el difusor al soporte de captación.
 - Después de que el sistema lleve funcionando unos 30 minutos.
 - Por lo menos en tres puntos del espacio ventilado tomando las muestras a la altura de la zona respiratoria de los ocupantes. Esto proporciona información sobre la exposición de los ocupantes.

1.4. Cómo medir

La selección de los equipos de medición depende de:

- la naturaleza de los agentes biológicos que se haya decidido medir.
- el ensayo analítico para su identificación y/o cuantificación.
- los lugares y períodos en los que se deba tomar la muestra.

Los **equipos de toma de muestra** más frecuentemente utilizados para la captación de bioaerosoles son los impactadores inerciales, los frascos borboteadores (*impingers*) y los equipos de toma de muestra con filtro.

Respecto a los **métodos de detección y ensayo** de bioaerosoles, los más comunes son: el cultivo de los microorganismos, que supone el recuento de colonias formadas y la identificación de los microorganismos crecidos en el laboratorio, y la observación al microscopio de granos de polen, esporas fúngicas y otras partículas características.

Otros métodos de ensayo (biológicos, químicos o moleculares), algunos en fase de desarrollo, son los utilizados para determinar la concentración de algunos componentes del bioaerosol, por ejemplo: alérgenos, endotoxinas, ergosterol, micotoxinas, etc. Este tipo de ensayos presentan una serie de ventajas ya que permiten la utilización de sistemas de toma de muestra más eficaces (**filtración**), la toma de muestras personales, ofrecen mayor sensibilidad y son menos susceptibles a las interferencias.

Alérgenos, endotoxinas y ergosterol

Alérgenos/alérgenos: Sustancias que pueden inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas susceptibles, que han estado en contacto previamente con el alér-

geno. Son ejemplos característicos de alérgenos: el polen del césped, de los árboles y de las hierbas; las esporas del moho; la caspa del pelo de los gatos, perros y de otros animales; los escombros de las cucarachas y los insectos (ácaros) del polvo doméstico.

Endotoxinas: Componentes de la pared celular de las bacterias *gram* negativas constituida por lípidos y polisacáridos.

Ergosterol: (Ergosta-5,7,22-trien-3b-ol), es un esteroide, precursor biológico (provitamina) de la vitamina D₂.

1.5. Cuántas muestras se han de tomar

El número de muestras que se han de tomar está asociado a:

- El objetivo de la medición.
- La variabilidad espacial y temporal del parámetro medido.
- Las limitaciones del equipo.
- Las posibilidades logísticas para efectuar el estudio. Las mediciones y las diferencias entre conjuntos de muestras son más precisas cuanto mayor sea el tamaño de la muestra, entendiéndose como **tamaño** el número de muestras.

En la tabla 2 se resume una propuesta sobre el número de muestras necesario.

Tabla 2. Número de muestras a tomar

Objetivo de la medición	Propuestas (para cada punto de muestreo y cada tipo de muestra)
Exposición por inhalación (peor de las situaciones)	Tomar 3 o más muestras no aleatorias. Las muestras serán por duplicado, como mínimo para todos los análisis.
Exposición por inhalación (concentración promedio)	Muestrear 3 o más veces en un día, durante 3 o más días consecutivos que sean representativos. Las muestras serán por duplicado, como mínimo para todos los análisis.
Estimación del intervalo de confianza de la media	Tomar 6 o más muestras.
Estimación de la varianza de un conjunto de mediciones	Tomar 11 o más muestras.

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

Para caracterizar completamente la exposición puede ser necesario repetir el muestreo durante diferentes estaciones climáticas, ya que ello puede afectar a la presencia y desarrollo de agentes biológicos, o cuando se modifiquen los patrones de la actividad.

Es conveniente recordar que el **número de muestras** significa cuántas muestras se han de tomar para cada tipo de parámetro de interés que se haya decidido muestrear y no el número de los diferentes tipos de muestra.

Si se ha decidido tomar muestras para caracterizar la exposición a hongos toxigénicos, en la toma de muestras se utilizarán equipos que permitan la captación por impactación directa en agar, la captación de esporas fúngicas en filtro y la captación de micotoxinas; los métodos de ensayo consisten en el recuento de colonias, identificación al microscopio, el examen de las esporas al microscopio y el análisis de micotoxinas.

Todo ello significa tres tipos diferentes de mediciones, cada una de las cuales requerirá de un número apropiado de muestras en cada ambiente que vaya a ser evaluado.

1.6. Volumen y tiempo de muestreo

El **volumen de aire aspirado** y el **tiempo de muestreo**, que dependen asimismo del caudal, están relacionados por el mínimo volumen de aire necesario para detectar el agente de interés a una concentración determinada.

El **límite inferior de detección (LID)** para un método de toma de muestra de un bioaerosol puede establecerse basándose en:

- La mínima cantidad de material que el método analítico puede detectar, por ejemplo, 1 ufc² por placa.
- La eficacia de conservación biológica del método de ensayo.
- El caudal de aire al que está calibrado el muestreador.
- El tiempo máximo de muestreo que permite el equipo.

⁽²⁾Unidades formadoras de colonias.

El **límite superior de detección (LSD)** se puede establecer de forma similar, pero en este caso, tomando en consideración el mínimo tiempo de muestreo posible o si son posibles diluciones de las muestras.

El tiempo de muestreo óptimo debería ser aquel lo suficientemente largo para captar material en cantidad detectable y representativa y lo suficientemente corto para evitar la sobrecarga del soporte de captación, que puede dar lugar a un resultado de **incontables**, y el solapamiento, que puede originar colonias de agregados de microorganismos o el enmascaramiento de partículas en preparaciones para el microscopio.

Los laboratorios deberían proporcionar estos límites junto con los resultados de las muestras, en especial el LID cuando el agente de interés no ha sido encontrado en las muestras. En ese caso, todo lo que se podría concluir es que el agente en cuestión no se encuentra presente al nivel del LID o por encima de él.

Las variaciones espaciales y temporales de las concentraciones de bioaerosoles y los tiempos de muestreo cortos, típicos de los muestreadores por impactación directa en medio de cultivo, hacen recomendable, como mínimo, planificar muestreos secuenciales o simultáneos, por duplicado, para obtener estimaciones fiables de la concentración del bioaerosol. Cuando sea posible, y a condición de que no se vea afectada la supervivencia de los agentes biológicos, los tiempos de muestreo largos permitirán reducir la variabilidad que se presenta cuando se utilizan tiempos cortos. Por otra parte, las muestras secuenciales de corta duración permiten obtener información sobre las fluctuaciones de concentración y, a la vez, estimar concentraciones promedio.

La densidad de las colonias crecidas en un medio de cultivo afecta a la fiabilidad del resultado. Como ya hemos dicho, demasiadas colonias **incontables** son difíciles de examinar y, de igual forma, un recuento escaso puede dar una idea errónea de la concentración presente en el ambiente. Cuando se utilizan equipos de muestreo en los que la captación de las partículas del bioaerosol es por impactación directa en medio de cultivo, es importante poder anticipar la concentración del bioaerosol, de manera que el cultivo de las placas revele una adecuada densidad superficial de colonias.

En general, entre 25 y 250 colonias bacterianas y entre 10 y 60 colonias fúngicas serían el número idóneo para poder realizar un buen recuento e identificación en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Otra regla general que se puede utilizar es un máximo de 1 colonia por centímetro cuadrado.

A título de ejemplo, en la tabla 3 se exponen las concentraciones ambientales máxima y mínima adecuadas para tres equipos de toma de muestra, basadas en la densidad óptima de colonias fúngicas y para diferentes tiempos de muestreo. Obviamente, es posible contar una única colonia en una placa de cultivo, sin embargo hasta que el recuento no alcanza un valor de aproximadamente 10 colonias, la variabilidad que se presenta entre muestras tomadas simultáneamente es muy grande, por lo que esas muestras en las que el recuento no supera el valor de 10 colonias no deberían tomarse en cuenta.

Tabla 3. Intervalos de concentración ambiental a diferentes tiempos de muestreo

Equipo de medición	Área de la placa (cm ²)	Caudal de aspiración (l/min)	Tiempo de captación (min)	Volumen captado (m ³)	Concentración ambiental (ufc/m ³)	
					LID (10 ufc/placa)	LSD (1 ufc/cm ²)
Impactador multiorificio	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 multiorificio	17	90	0,33	0,030	330	567
			0,66	0,059	170	288
			1,0	0,090	110	189
Impactador de rendija	177	50	1,0	0,050	200	3.540
			15,0	0,750	10	236
			60,0	3,0	3	59

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

Con los datos del caudal del equipo y el tamaño del soporte que utiliza, es posible escoger la duración del muestreo siempre que se pueda anticipar cuál será el rango de concentraciones ambientales que es posible que exista. Cuando se desconoce o no se puede anticipar la concentración existente en un ambiente, puede ser necesario realizar mediciones con un tipo de muestreador y diferentes tiempos de muestreo para cubrir los distintos intervalos de concentración. Un sistema de cálculo utilizado es empleando la expresión siguiente:

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

donde t = tiempo de muestreo óptimo (min); d = densidad deseada (ufc/cm²); A = área de captación (cm²); C_a = concentración ambiental previsible (ufc/m³) y Q = caudal de aspiración del muestreador (l/min).

Información detallada sobre procedimientos de evaluación de agentes biológicos en aire se encuentra en la Norma UNE-EN 13098, algunos de cuyos aspectos más relevantes resumimos a continuación.

Norma UNE-EN 13098

Norma UNE-EN 13098. Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire (mayo 2001). La norma recoge las directrices para la evaluación de la exposición a microorganismos, excluyendo de la misma, virus, microorganismos patógenos específicos y toxinas distintas de las endotoxinas, aunque se indica que las directrices pueden ser las mismas.

1.7. Eficacia del muestreo

El diseño de la mayoría de los equipos para muestreo de bioaerosoles son adaptaciones de los utilizados para la captación de agentes químicos, básicamente relacionadas con los soportes de captación que deben adaptarse a las características de los agentes biológicos.

El principal condicionante, cuando se trata de captar microorganismos vivos y cultivables, es que el material en el que se recoge el bioaerosol debe permitir la supervivencia de aquellos hasta su análisis en el laboratorio. En consecuencia, deben proporcionar alimento y agua y estar constituidos de un material que no dañe a las células durante la captación. Para ello se utilizan medios de cultivo, generalmente, semi-sólidos, elaborados a base de agar (sustancia gelatinosa extraída del alga *Agar agar*), a la que se añaden nutrientes y otros productos que por sí mismos definen las propiedades del medio. El propio medio es la base de los ensayos analíticos posteriores para la identificación de las especies microbianas.

Cuando lo que se trata de captar son formas resistentes (esporas, granos de polen, etc.) o productos (en realidad agentes químicos, como endotoxinas, micotoxinas, glucanos, etc.), el soporte de captación más frecuentemente utilizado es el filtro.

La norma UNE-EN 13098 define la eficacia técnica del muestreo (*ETM*) como:

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

siendo:

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

por lo que:

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

donde:

- **EFM** (eficacia física del muestreo). Capacidad del muestreador para captar las partículas de un tamaño determinado que se encuentran suspendidas en el aire en el lugar de trabajo.
- **ECB** (eficacia de conservación biológica). Capacidad de un muestreador para mantener la viabilidad de los microorganismos presentes en el aire durante la captación conservando intactos los productos microbiológicos.

- **EEA** (eficacia de la entrada del aire).
- **EZC** (eficacia de la zona de captación). Expresada como el diámetro aerodinámico de corte d_{ac50} : el tamaño de partícula al que la mitad de partículas serán captadas.
- **PE** (pérdidas en otros elementos del equipo).

Para la determinación experimental de estos parámetros se utilizan, como aerosoles, partículas no viables, por ejemplo: partículas de látex o partículas de colorantes; y distintos tipos de microorganismos (*Serratia marsescens*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*) y cámaras de tres tipos: estáticas, dinámicas y túneles de viento.

2. Equipos de muestreo de aire

Los aerosoles son captados al producirse la separación de las partículas que lo forman por la acción de distintas fuerzas físicas. Estas fuerzas constituyen, asimismo, la base para la clasificación de los muestreadores en:

- **equipos inerciales** (impactadores, ciclones, equipos centrífugos) y
- **equipos de toma de muestra con filtro.**

2.1. Muestreo inercial

La **inercia** de las partículas es la fuerza que mayoritariamente interviene en su separación del aire y está determinada por la masa y la velocidad de la partícula.

En la zona de captación de los equipos inerciales la corriente de aire, que ha penetrado a través del dispositivo de entrada, es obligada a cambiar de dirección y las partículas contenidas en ella, con suficiente inercia, son separadas del flujo de aire impactando sobre una superficie. En los ciclones y equipos centrífugos, el efecto inercial está potenciado por la acción centrífuga ocasionado por el diseño del muestreador.

2.1.1. Muestreador de rendija

En el muestreador de rendija, el aire penetra a través de una o cuatro rendijas con flujos de aire de 30 l/min y 700 l/min según el modelo y es impulsado sobre la superficie de impactación consistente en una placa con medio de cultivo, un portaobjetos o una cinta adherente. La placa de cultivo permite la incubación, recuento de colonias e identificación de las especies microbianas, mientras que los portaobjetos y las cintas, permiten solamente la observación directa al microscopio de las partículas captadas. Estos soportes de captación pueden ser estáticos o colocados sobre un soporte giratorio dotado de distintas velocidades. No permiten obtener información sobre la distribución por tamaño de partícula. El d_{ae50} calculado es de 0,67 μm . En la figura 3 se muestra un esquema de este tipo de muestreador.



Figura 3. Muestreador de rendija
La eficacia de la zona de captación se expresa como el diámetro aerodinámico de corte (d_{ae50}) que es el tamaño de partícula al que la mitad de partículas serán captadas.
Fuente: INSHT. *NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I)*

2.1.2. Muestreador Andersen

Es un impactador en cascada que capta las partículas en una serie de placas con medio de cultivo a un caudal de aire de 28,3 l/min. Suele tener seis niveles de captación, cada uno separado del siguiente por un elemento perforado por 400 orificios, debajo del cual se coloca la placa con medio de cultivo, con orificios que van disminuyendo el tamaño al bajar el nivel, lo que provoca un aumento de la velocidad del aire al pasar de un nivel a otro. La captación se basa en la inercia de las partículas, que son retenidas de mayor a menor tamaño, a medida que pasan de un nivel al siguiente.

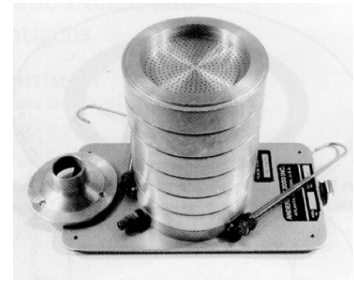
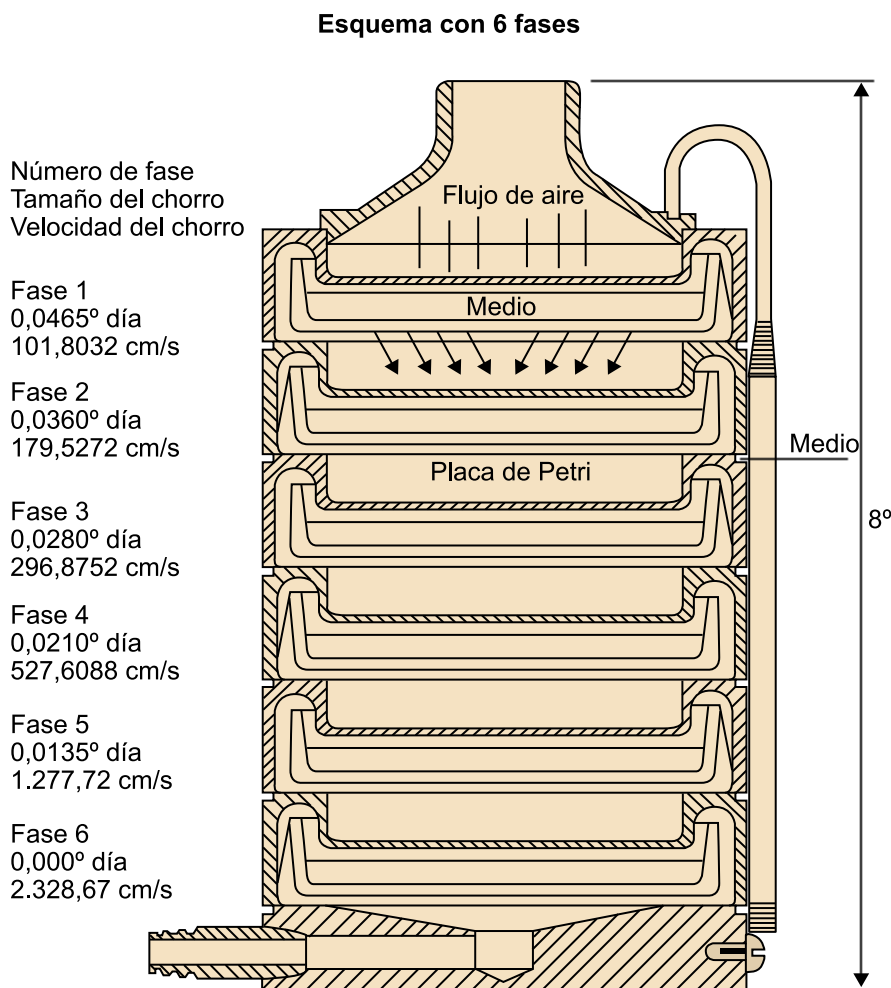


Figura 4. Muestreador Andersen

El resultado final es una separación por tamaño de partícula. Los diámetros de corte teóricos van de 7 μm a 0,65 μm . También hay modelos con 1 o 2 niveles. Este muestreador es uno de los designados como de referencia en las pruebas de ensayo para la validación de otros muestreadores. En la figura 4 se presenta una reproducción y un esquema de este muestreador.

Figura 5. Muestreador Andersen



2.1.3. Muestreadores multiorificio

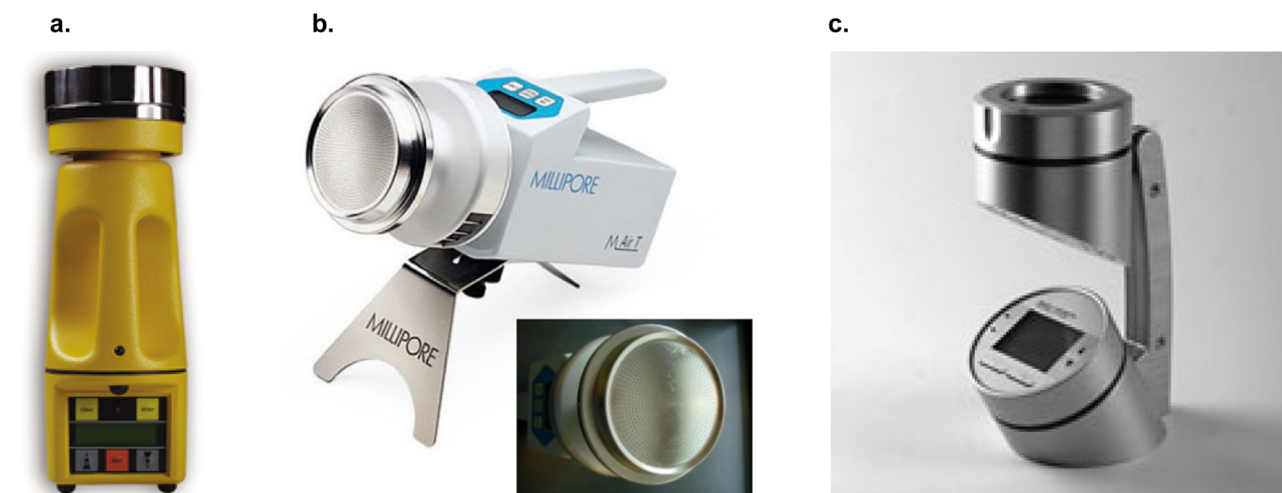
El **muestreador SAS³** es un equipo portátil con un único nivel de captación basada, en la inercia de las partículas. La captación tiene lugar en una placa RODAC[®] con medio de cultivo. Existen dos modelos calibrados a dos caudales de aire (90 l/min y 180 l/min). El equipo dispone de un cabezal con 219 orificios, un ventilador y un programador del tiempo de muestreo (intervalos de 20 segundos), permitiendo un mínimo de 20 segundos y un máximo de 5 minutos. El diámetro de corte teórico es de 2,0 µm. Estudios comparativos realizados con este muestreador y otros de referencia, como el muestreador Andersen, muestran una reducción de la eficacia de captación del 50%. En la figura 5 se muestran este muestreador y otros de características similares como son: el muestreador **M air T** (Millipore[®]) o el muestreador **MAS-100** (Merck[®]).

⁽³⁾SAS es la sigla de la expresión inglesa *surface air system*.

Ved también

Podéis ver una placa RODAC[®] la figura 12 del subapartado 3.2.1 de este módulo didáctico.

Figura 6. Muestreadores multiorificio



a. SAS, b. M air T y c. MAS 100.

2.1.4. Frascos borboteadores

Los **frascos borboteadores⁴** funcionan conduciendo una corriente de aire al interior de un frasco que contiene un medio de captación, normalmente líquido. Las partículas son transferidas al líquido siguiendo los principios de la impactación inercial ayudada por la dispersión de las partículas en las burbujas formadas en la zona de impactación.

Como líquido de captación puede utilizarse cualquiera que sea compatible con el ensayo analítico y el agente biológico objeto de estudio. Los líquidos más frecuentemente utilizados son:

- agua destilada,
- soluciones salinas tamponadas o
- medios de cultivo diluidos.

⁽⁴⁾En inglés, *impingers*.

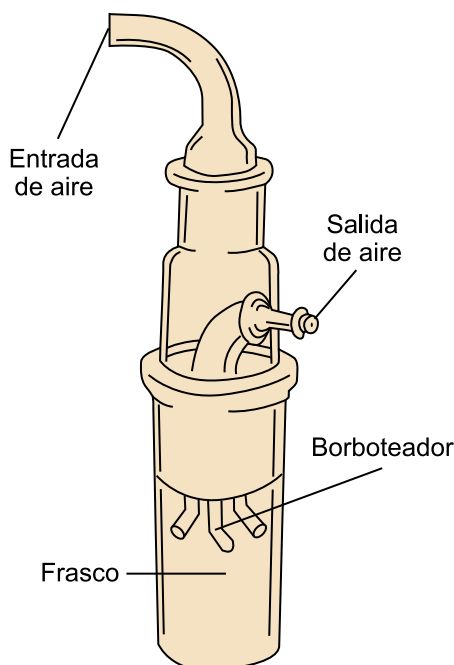
A estos líquidos se les añaden los aditivos que se consideren necesarios para mejorar la supervivencia de los microorganismos. También, y para evitar problemas, a algunos se les suele añadir un antiespumante. El volumen de líquido con el que habitualmente trabajan estos equipos oscila entre 15 ml y 20 ml. La captación en medio líquido presenta ciertas ventajas sobre otros tipos de equipos y es que a partir de una muestra se pueden realizar diferentes ensayos o determinar diferentes componentes del bioaerosol. Mediante filtración del líquido se pueden concentrar las partículas y la muestra puede ser utilizada en la realización de otros tipos de ensayo.

Uno de los modelos más ampliamente utilizados en la captación de bioaerosoles es el AGI-30 (*all glass impinger*) que ha sido seleccionado como muestreador de referencia. La cifra indica la distancia que hay entre el orificio de salida del aire dentro del frasco y el fondo del mismo, y el caudal de aire es de 12,5 l/min. Una modificación de este muestreador es el frasco borboteador multinivel. Dispone de tres niveles y proporciona la distribución por tamaño de partícula simulando la que ocurre en el sistema respiratorio humano. Cada nivel contiene un volumen conocido de líquido de captación estéril. El diseño de este equipo reduce la velocidad de inyección y minimiza las salpicaduras y la formación de espuma. Los diámetros de corte teóricos son 1 μm , 4 μm y 10 μm y el equipo trabaja a caudales de aire entre 20 y 55 l/min. Actualmente estos equipos se fabrican en acero inoxidable. En la figura 8 se muestra un esquema de estos muestreadores.



Figura 7. Frasco borboteador multinivel
Fuente: INSHT. NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I)

Figura 8. Muestreadores por borboteo

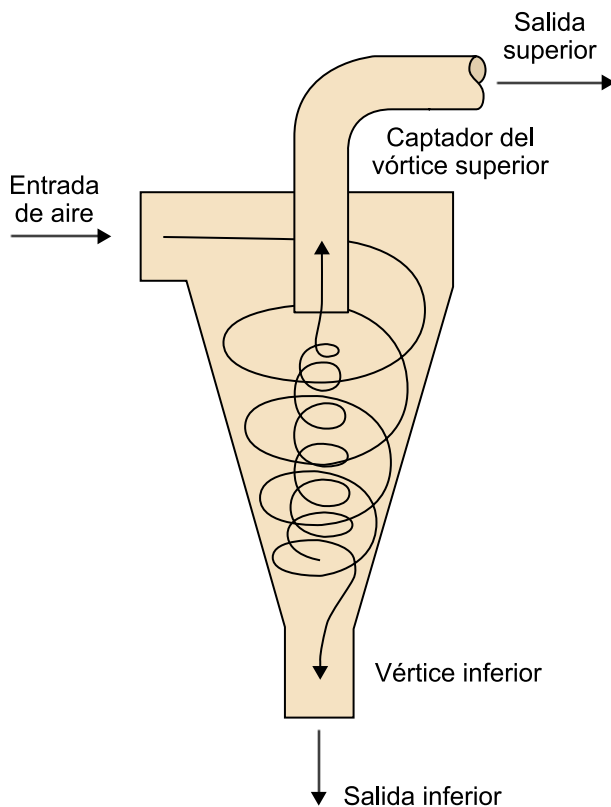


Frasco borboteador.
Fuente: INSHT. NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I)

2.1.5. Ciclones lavadores

La captación de las partículas ocurre por impactación en un medio líquido que baña la superficie interior del ciclón, potenciada por la acción de la fuerza centrífuga. El líquido con las partículas es retirado por la parte inferior del equipo. Los ensayos realizados con estos equipos para determinar la eficacia de la captación revelan que a caudales de 500 l/min y velocidad del aire de 4 m/s, la eficacia de captación para partículas de diámetro aerodinámico de 20 μm es de entre un 70% y 110%. En la figura 9 se muestra un esquema de estos muestreadores.

Figura 9. Esquema de un ciclón



Un **vórtice** es un flujo turbulento en rotación espiral con trayectorias de corriente cerradas.

2.1.6. Muestreador RCS

Un **muestreador RCS**⁵ es un equipo portátil en el que la impactación de las partículas ocurre potenciada por la acción de la fuerza centrífuga que un ventilador confiere al aire aspirado en la zona frontal del equipo. Las partículas son recogidas en cintas flexibles con pocillos que contienen medio de cultivo. El caudal de aire es de 40 l/min y dispone de un programador de tiempo (entre 30 segundos y 8 minutos) que determina el volumen de aire muestreado. La captación ocurre en un único nivel por lo que no se obtiene información sobre la distribución por tamaño de partícula. Una de las limitaciones de este equipo es que no se puede precisar con exactitud el caudal real de aire, ya que este es aspirado desde una distancia de 40 cm y el aire expulsado lo hace rodeando

⁽⁵⁾RCS es la sigla de la expresión inglesa *reuter centrifugal sampler*.



Figura 10. Muestreador RCS

la columna de aire de aspiración. Una versión mejorada es el **RCS plus**, en el que, a diferencia del anterior, la entrada y salida del aire están separadas. Este muestreador opera a un caudal de 50 l/min. En la figura 10 se presenta una reproducción de este muestreador.

2.2. Filtración

La retención de las partículas suspendidas en el aire en un material poroso cuando este lo atraviesa, es la **filtración**.

La captación de una partícula depende de su diámetro aerodinámico, del tamaño del poro del filtro y del caudal de aire que atraviesa el filtro. En base a estas características se pueden distinguir cuatro principios de captación de partículas: **tamizado**, **interceptación**, **impactación** y **difusión**.

La filtración es uno de los sistemas que permite tomar muestras personales que representan mejor el patrón de exposición de los trabajadores. En general, los filtros son los soportes de retención más utilizados cuando se pretende muestrear los componentes del bioaerosol más resistentes (básicamente esporas y polen), los productos (endotoxinas, micotoxinas, etc.) o cuando la viabilidad de los microorganismos no es esencial para el ensayo analítico seleccionado.

El equipo de toma de muestras consiste en una bomba de aspiración de aire a la que se une el portafiltro, en general, casetes de poliestireno, y el filtro. Como en cualquier sistema de muestreo, la determinación del caudal de aire y del tiempo de muestreo (basado en la previsión de la concentración existente) son pasos fundamentales para la obtención de muestras útiles para el análisis. Otro aspecto a considerar es si la captación se realiza con el casete abierto o cerrado, la decisión estará basada en el tipo de muestra y el ensayo que se vaya a realizar. En los casetes abiertos la distribución de las partículas es más regular, lo que facilita su observación y recuento, mientras que en casete cerrado, las partículas tienden a acumularse en la zona central del filtro dificultando así su observación.

Estos sistemas de muestreo son, en la práctica, totalmente equivalentes a los que reemplazan en el muestreo de aerosoles sólidos en general.

2.2.1. Filtros capilares

Los **filtros capilares** están hechos de una fina capa de policarbonato. En este tipo de filtros los poros consisten en cilindros rectos alineados de forma perpendicular a la superficie del filtro. La eficacia de captación de estos filtros es baja para las partículas de un tamaño inferior al poro. La eficacia aumenta para las partículas submicrónicas ($< 1 \mu\text{m}$) que son retenidas según el **principio de difusión**. Lógicamente, las partículas de tamaño mayor que el del poro

son retenidas con gran eficacia. El diseño de estos filtros hace que se colmaten antes que otros con el mismo tamaño de poro, lo que limita la cantidad de material que puede recoger. Son filtros muy finos y con una superficie muy lisa lo que los hace idóneos para la observación de las partículas captadas al microscopio óptico o al electrónico de barrido, y facilita el lavado del filtro y la recuperación de la muestra para su análisis.

2.2.2. Filtros de membrana

Este tipo de filtros tienen una microestructura compleja que proporciona caminos irregulares o tortuosos al flujo de aire. Dependiendo del **principio de captación**, se puede decir que, en general, la eficacia de estos elementos es bastante elevada, incluso para partículas de tamaño inferior que el del poro. Por ejemplo, la eficacia de captación para partículas de 0,3 μm es del 95% en filtros de membrana con tamaño de poro de 0,5 μm . Los materiales de los que están hechos los filtros son variados, uno de los usados con mayor frecuencia para la captación de bioaerosoles son los **esteres de celulosa**. Los bioaerosoles captados se pueden teñir sobre los mismos filtros para su observación directa al microscopio óptico; el filtro se puede transparentar con un producto adecuado como fase previa a la observación y estos filtros se pueden colocar sobre medio de cultivo para la incubación de los microorganismos captados.

3. Muestreo de materiales y superficies

Ya hemos comentado en la introducción que el muestreo de superficies es una técnica a tener en cuenta también en la determinación de agentes biológicos. Esta técnica tiene un interés especial puesto que permite determinar la posible contaminación por agentes biológicos de las materias primas, de las propias personas, de los instrumentos de trabajo, las ropas, las manos, el mobiliario o los elementos de construcción que por sus características pueden convertirse en reservorios de agentes biológicos.

El análisis de superficies y de líquidos es necesario en algunos casos en los que la simple medición ambiental puede dar como resultado la inexistencia de contaminación microbiológica, proporcionando falsos negativos. Este tipo de mediciones permiten identificar los focos de contaminación, que es uno de los objetivos importantes en la evaluación de la exposición a agentes biológicos. La detección de elevadas concentraciones de microorganismos en estas muestras puede eliminar la necesidad de realizar un muestreo ambiental cuando es clara la posible aerosolización de los contaminantes y por tanto la exposición de las personas a los mismos. En estas situaciones, las decisiones son: **qué** medidas correctoras son las aconsejables y **cuál** es el procedimiento y calendario de aplicación.

En general, los métodos de captación de las muestras consisten en tomar una fracción del material, un volumen determinado de un líquido, la aspiración del polvo contenido en un área determinada o el muestreo de una superficie. La precaución principal es que los contenedores en los que se recogen las muestras sean estériles para evitar posibles contaminaciones. Los métodos de ensayo dependerán de los agentes biológicos que se pretenda determinar y, al igual que en el caso de la medición de bioaerosoles, estos se pueden dividir en:

- **ensayos basados en el cultivo de las muestras**, para detectar microorganismos viables y cultivables, y
- **ensayos no basados en el cultivo**, como examen y recuento al microscopio u otros ensayos posteriores distintos del cultivo.

De los métodos expuestos, el **muestreo de superficies** es uno de los que más ampliamente se utiliza, entre otras razones, porque permite tomar la muestra sin romper o dañar el material. En cuanto a las técnicas más utilizadas, se pueden distinguir dos: el **lavado de la superficie** y la **toma de muestra por contacto**.

Ved también

Los ensayos no basados en el cultivo se comentan en los subapartados 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 de este módulo didáctico.

3.1. Frotis de superficies

Este método consiste en la recogida del material depositado en las superficies con torundas estériles de algodón o gasas (figura 11). Estos elementos pueden ser humedecidos con agua estéril para facilitar la captación de las partículas. Las muestras tomadas deben ser manipuladas en un modo aséptico para evitar cualquier contaminación. Tras el muestreo se puede proceder a la siembra del material recogido aplicando directamente la torunda sobre el medio de cultivo o se puede proceder al lavado de los elementos utilizados en la captación con un diluyente estéril y sembrar después el líquido obtenido. En general, este método no permite realizar estimaciones cuantitativas precisas de la contaminación y, básicamente, se utiliza para comprobar la presencia de un microorganismo concreto.

Figura 11. Toma de muestras de superficies



3.2. Muestreo por contacto

Es el método más utilizado y consiste en la aplicación de placas de contacto sobre la superficie que se desea muestrear y sobre las que se ejerce una ligera presión para captar las partículas. El resultado del recuento de las colonias que han crecido se expresa en ufc/cm². Otra técnica consiste en la utilización de cintas adhesivas que atrapan las partículas.

3.2.1. Placas de contacto

Las placas de contacto son placas de cultivo especiales en las que el medio de cultivo está en ligero exceso. Existen diferentes tipos de placas de contacto, pero las más utilizadas son las placas RODAC[®]. En la base de estas placas está grabada una cuadrícula de superficie determinada, que permitirá el cálculo de la concentración de los microorganismos que han formado colonia. El resultado se expresa en ufc/cm². La principal ventaja de este método es su sencillez; mientras que el principal inconveniente es que superficies muy sucias van a provocar la sobrecarga de la placa y, por tanto, dificultar el análisis de la misma. En la figura 12 se muestra una placa RODAC[®] y las colonias crecidas.

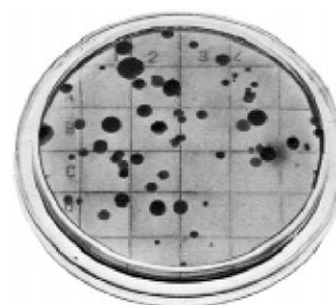


Figura 12. Placa RODAC[®] con colonias
Fuente: INSHT. NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (1)

3.2.2. Cintas adhesivas

El uso de estas cintas está indicado cuando no se precisa información sobre los microorganismos viables y cultivables. El método es muy sencillo y consiste en atrapar en la cinta las partículas depositadas en una superficie. El análisis consiste en la observación al microscopio, por lo que el material de la cinta debe tener una buena calidad óptica y permitir la tinción. Este método no permite análisis cuantitativos.

4. Selección del muestreador

Los aspectos fundamentales a considerar en la elección de un muestreador son:

- el agente biológico objeto de interés,
- la información que se pretende obtener,
- la concentración previsible de bioaerosol,
- el diámetro aerodinámico de las partículas,
- las condiciones ambientales,
- las propias características del equipo y del análisis al que se van a someter las muestras.

Obviamente, la información que los fabricantes de los equipos proporcionan a los usuarios facilita la elección del equipo más apropiado para cada aplicación.

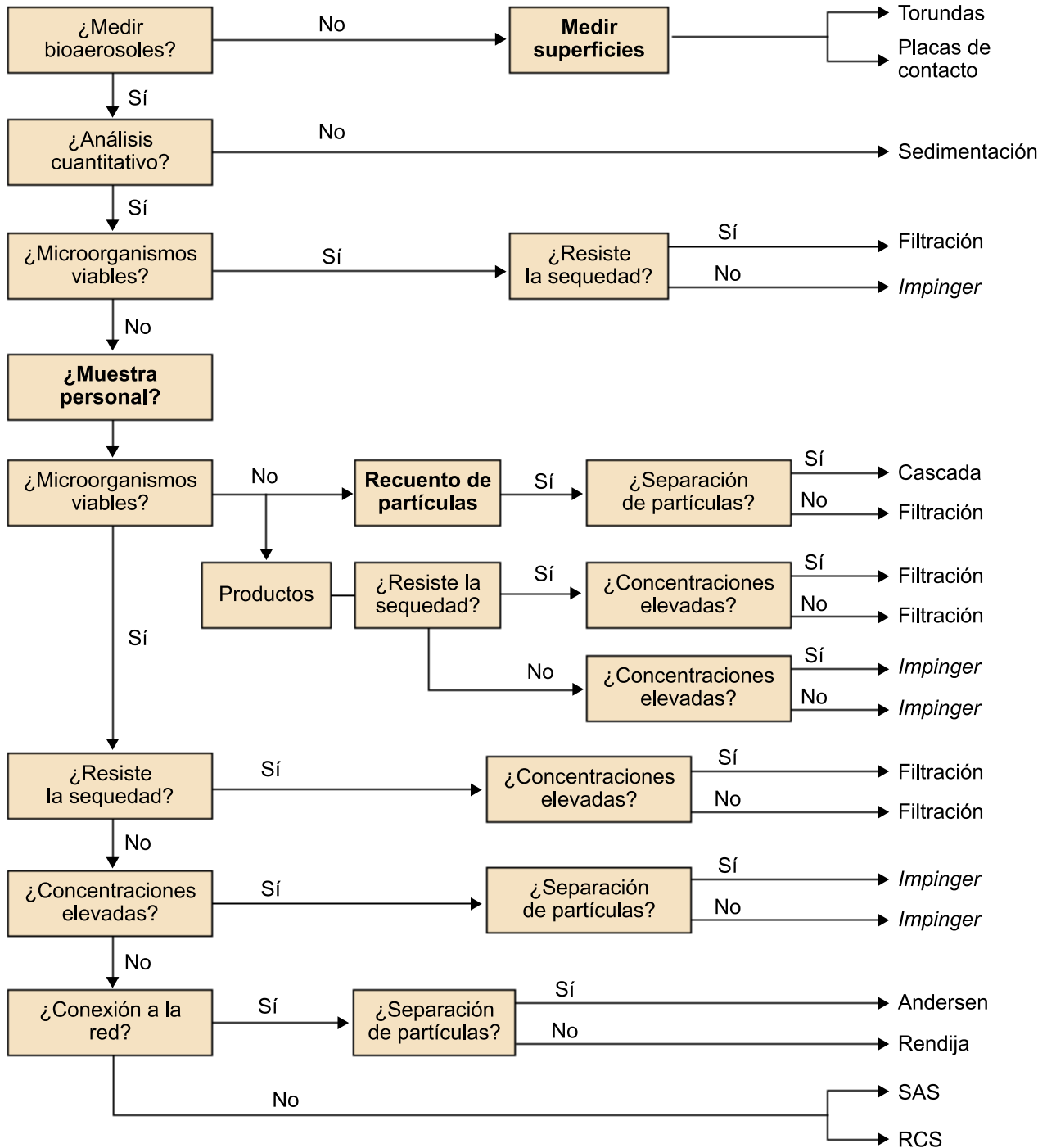
La Norma UNE-EN 13098, que ya hemos referenciado, en su anexo A incluye las recomendaciones básicas para la selección de un método de medición de agentes biológicos de gran utilidad a la hora de efectuar la selección del muestreador. Una guía para la elección del muestreador se presenta en la figura 13.

Características de un muestreador de bioaerosoles basadas en la *NTP 610: Agentes biológicos: equipos de muestreo (II)* de INSHT:

- Conducir el aire hacia el equipo a una velocidad uniforme y provocar las mínimas pérdidas posibles en el dispositivo de entrada del aire.
- Mantener el caudal de aire dentro de unos márgenes razonables teniendo en cuenta las posibles variaciones en el suministro eléctrico, carga de las baterías o las pérdidas de carga en el equipo.
- Permitir el uso de diversos soportes de captación (placas de cultivos de tamaño estándar, portaobjetos, filtros de distintos tipos, diámetros y tamaño de poro, etc.).
- Permitir la colocación y extracción de los soportes de captación de forma sencilla.
- Proteger el soporte de captación de posibles contaminaciones.
- Minimizar las fugas de aire que pueden causar errores en la medición o permitir que el aire no pase sobre el medio de captación.
- Expulsar el aire aspirado a suficiente distancia de la entrada para evitar el posible reingreso del aire ya muestreado.
- Captar un amplio rango de tamaños de partículas con una eficacia consistente; o tener una elevada eficacia de captación para tamaño de partícula deseado, mientras que excluye otras fracciones o las capta con menor eficacia.
- Captar las distintas fracciones de tamaño de partícula con eficacias similares a las existentes en el tracto respiratorio humano.

- Mantener la integridad física, química y biológica del material captado.
- Permitir el análisis de las muestras mediante el uso de diferentes técnicas analíticas.
- Ser resistente y fácil de limpiar y desinfectar.
- Ser de fácil manejo, portátil, fiable y económico.

Figura 13. Diagrama para la selección del muestreador



Fuente: adaptado de Norma UNE-EN 13098

5. Análisis de las muestras

Siguiendo con el paralelismo que hemos ido comentando con los sistemas de toma de muestra y análisis aplicados a los agentes químicos, en la tabla 4 se recogen las principales características de los métodos de captación y análisis utilizados para la detección de microorganismos). Una vez tomada la muestra según los procedimientos comentados hasta aquí, procede, obviamente, llevar a cabo su análisis, aspecto que tratamos en el presente apartado.

Tabla 4. Características de la captación y análisis de agentes biológicos

Agente biológico	Método B	Análisis	Datos obtenidos
Virus	<i>Impingers</i> , ciclones, impactadores, filtros	Cultivo celular	Concentración (n.º-/m ³); indentificación
		Inmunoensayo (anticuerpo marcado con colorante)	Confirmación de presencia de un virus específico
		Microscopio electrónico	Identificación
		Pruebas genéticas. PCR	Confirmación de presencia de un virus específico
Bacterias	Impactadores, <i>impingers</i> , ciclones, filtros. Muestras de superficies	Microscopio/recuento	Concentración (células/m ³ o cm ² o g)
		Inmunoensayo (anticuerpo marcado con colorante)	Confirmación de presencia de una bacteria específica
		Pruebas genéticas. PCR	Confirmación de presencia de una bacteria específica
		Cultivo	Concentración (ufc/m ³ o cm ² o g)
		Microscopio: morfología, tinción	Identificación (general)
		Bioquímica	Identificación (específica)
Antígenos bacterianos	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (µg/g)
Componentes de la pared bacteriana (endotoxinas, otros)	Filtros, <i>impingers</i> , polvo	Bioensayo (LAL)	Actividad biológica (UE/m ³ o g)
		Químico (CG-EM, HPLC)	Concentración (LPS, ng/m ³ o g; ácido murámico, µg/m ³ o g)
Hongos	Impactadores, <i>impingers</i> , ciclones, filtros. Muestras de superficies	Microscopio/recuento	Concentración (esporas/m ³ o cm ² o g). Identificación
		Cultivo	Concentración (ufc/m ³ o cm ² o g)
		Microscopio/morfología	Identificación

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. LAL: Lisado de amebocitos del *Limulus*. UE: Unidades de Endotoxina. CG-EM: Cromatografía de gases - Espectrometría de masas. HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución. LPS: Lipopolisacáridos. CL: Cromatografía líquida. COVM: Compuestos orgánicos volátiles de origen microbiano.

Agente biológico	Método B	Análisis	Datos obtenidos
Levaduras (ácidos grasos, lípidos)	Impactadores, <i>impingers</i> , ciclones, filtros. Muestras de superficies	Químico (CG)	Identificación
Alérgenos fúngicos	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (ng o unidades/g)
Componentes de la pared fúngica	Filtros, polvo	Inmunoensayo (LAL)	Actividad biológica (glucano, unidades o $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
		Químico (HPLC, CG-EM)	Concentración (glucano o ergosterol, unidades o $\mu\text{g}/\text{g}$)
Toxinas fúngicas	Impactadores, <i>impingers</i> , ciclones, filtros. Muestras de superficies	Químico (HPLC, CG-EM)	Confirmación de la presencia de la toxina, concentración (toxina, ng/m^3 o g)
		Inmunoensayo, citotoxicidad	Confirmación de la presencia de la toxina, detección de la actividad tóxica (sin identificación)
Endoparásitos (amebas)	Agua, impactadores, <i>impingers</i>	Cultivo	Concentración ($\text{n}^\circ/\text{m}^3$ o ml)
		Microscopio/morfología	Identificación
		Inmunoensayo (anticuerpo marcado con colorante)	Confirmación de la presencia de amebas específicas
Alérgenos/antígenos	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (alérgeno/antígeno, $\mu\text{g}/\text{g}$ o unidades de alérgeno/g o unidades de antígeno/g)
Ácaros	Polvo	Microscopio/morfología	Concentración (n° de ácaros/g de polvo o por m^2 de superficie muestreada), identificación
Alérgenos de ácaros	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (alérgeno de ácaros, ng/g de polvo o por m^2 de superficie muestreada)
Guanina	Polvo	Colorimetría (CL)	Concentración (guanina/g de polvo o por m^2 de superficie muestreada)
COVM	Adsorbentes, bolsas de aire	Químico (CG-EM)	Concentración (compuesto, mg/m^3 , identificación de compuestos)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. LAL: Lisado de amebocitos del *Limulus*. UE: Unidades de Endotoxina. CG-EM: Cromatografía de gases - Espectrometría de masas. HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución. LPS: Lipopolisacáridos. CL: Cromatografía líquida. COVM: Compuestos orgánicos volátiles de origen microbiano.

5.1. Transporte y conservación de las muestras

Una vez ha concluido la captación, hay que tomar toda clase de precauciones para evitar que las muestras se alteren o modifiquen antes de llegar al laboratorio: deshidratación, muerte de los agentes, contaminaciones, derrames o roturas. Dichas precauciones, así como las instrucciones pertinentes para cada tipo de captación y agente, deben hallarse, detalladas hasta el último extremo, en el **procedimiento** o **método analítico** disponible al efecto. Como recomendaciones generales podemos indicar las siguientes:

- Precintar las muestras o cerrarlas perfectamente.
- Colocar las muestras en cajas o recipientes adecuados, fijándolas correctamente.
- Incluir con cada lote homogéneo de muestras una muestra **blanco**, que es una muestra que ha sido manipulada exactamente como las otras análogas del mismo lote, pero con la que no se ha efectuado captación de contaminante.
- No colocar en un mismo recipiente muestras ambientales y materiales o productos que las pudieran alterar o contaminar.
- Evitar alteraciones de las muestras por calentamiento excesivo o exposición intensa a la luz solar y seguir las instrucciones específicas para cada tipo de muestra.
- No demorar el envío de las muestras al laboratorio.
- No abrir las muestras hasta el momento en el que vaya a dar comienzo su análisis o tratamiento.
- Almacenar las muestras hasta su análisis en lugares específicos que cumplan las condiciones específicamente establecidas para ello.
- Tanto si se guardan las muestras en frigoríficos como otros lugares de almacenamiento, es recomendable que sean específicos para este cometido sin que contengan ningún otro tipo de muestras o materiales que las pudieran alterar o contaminarlas.
- No sobrepasar en ningún caso la fecha límite para el análisis que debe estar claramente especificada en el procedimiento o método de análisis.

5.2. Tipos de estudios

Dependiendo del objetivo de la medición se pueden agrupar los estudios en: generales, de indicadores y focalizados.

- **Estudios generales.** Se trata de conocer, de la forma más amplia que sea posible, los diferentes tipos de agentes biológicos que pueden estar presentes y por ello se utilizan cuando se desconoce la composición (tipos y concentraciones) de agentes biológicos ligados a la actividad laboral. Los métodos más comúnmente empleados están basados en el cultivo de los microorganismos en medio gelatinoso (agar), en la observación directa al microscopio o en la evaluación de la diversidad microbiana.

- **Estudios de indicadores.** En este caso sabemos el agente biológico que nos interesa, aunque empleamos para su análisis un indicador que puede ser representativo de la presencia de un grupo de microorganismos.
- **Estudios focalizados.** Estos estudios permiten documentar la presencia de un agente biológico asociado a efectos concretos. Además de las técnicas de cultivo de microorganismos, pueden comprender la detección de antígenos o la comprobación de la existencia de títulos elevados de anticuerpos en muestras de sangre. La elección de este tipo de estudios parte de una hipótesis sobre la existencia de un agente específico en un ambiente, hipótesis que puede estar basada tanto en la observación de efectos concretos asociados al agente como en la existencia de determinadas condiciones ambientales que permitan sospechar su presencia.

Estudios de indicadores

Serían ejemplos de este tipo de estudios la determinación de glucanos o ergosterol como indicadores de la biomasa fúngica y la determinación de guanina como indicador de la presencia de ácaros en el polvo doméstico.

Estudios focalizados

Durante el estudio de un brote de legionelosis, los métodos de ensayo estarán dirigidos a la detección de *Legionella* en muestras de agua y clínicas, incluyendo el cultivo y aislamiento de la bacteria en las muestras de agua de las instalaciones implicadas y en muestras biológicas obtenidas de las personas potencialmente infectadas.

5.3. Cultivo de microorganismos. Bacterias y hongos

El **cultivo de microorganismos** en medio sólido es el ensayo estándar. La posibilidad de efectuar el recuento de colonias y relacionarlo con un volumen de aire lo han convertido en una técnica para cuantificar microorganismos, sin olvidar las limitaciones que el método presenta.

El **recuento de colonias** es la proporción de la población muestreada que mantiene la capacidad de crecer en el medio de cultivo seleccionado y en las condiciones de incubación establecidas.

Evidentemente, no solamente son estos los microorganismos que pueden causar efectos adversos a las personas. Microorganismos no viables e incluso muertos pueden causarlos y esta información resulta parcial, tampoco incluye los efectos tóxicos y alérgicos.

También a nivel operativo, el estrés físico que pueden sufrir los microorganismos durante la generación del aerosol, su permanencia en el aire y durante su captación, pueden dañarlos impidiendo así su desarrollo en cultivo y en consecuencia provocar la infravaloración de la concentración. Por otro lado, no todos los microorganismos serán cultivables y el hecho de que no formen colonias no necesariamente significa que el organismo no esté en la muestra o que esté muerto. Las principales razones por las que un microorganismo no forma una colonia, son:

- La muerte o alteración de los procesos de desarrollo por la acción de las fuerzas que se ejercen sobre la célula durante la generación del aerosol, su captación y la manipulación y transporte de las muestras.

- La acción tóxica o desequilibrio de los elementos químicos que constituyen el medio de cultivo.
- La competitividad entre especies.

Esta técnica permite el aislamiento de microorganismos en cultivos puros lo que constituye un paso necesario en los procedimientos de identificación de las especies captadas. Dependiendo del tipo de muestreo realizado, los microorganismos impactan directamente sobre el medio de cultivo (**captación ambiental**), o son posteriormente inoculados en un medio de cultivo a partir de fracciones de la muestra tomada (agua, materiales o superficies).

En buena parte de los casos, el análisis empieza en la toma de las muestras con la elección del soporte de captación.

5.3.1. Placa con medio de cultivo

El **medio de cultivo** es el material donde se multiplicarán los microorganismos formando colonias, por lo que debe reunir las condiciones que permitan y favorezcan el desarrollo.

Las características propias del medio de cultivo permitirán la formación de las colonias de unos tipos de microorganismos, mientras que harán que otros pasen inadvertidos. En consecuencia, se emplearán diferentes variedades de medios de cultivo en función del objetivo del análisis. Una práctica habitual en el laboratorio es utilizar en las siembras diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para poder poner de manifiesto el mayor número de microorganismos que sea posible.

Los medios habitualmente utilizados para la captación ambiental de microorganismos se pueden clasificar en:

- **Generales:** son aquellos que permiten el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, tanto bacterias como hongos.
- **Selectivos:** aquellos que se han preparado para inhibir el crecimiento de determinados microorganismos y permitir el de otros.

- **Diferenciales:** los que permiten el crecimiento de varios microorganismos, pero que contienen ingredientes que producen diferencias de apariencia de algunos de ellos.

La utilización de estos medios constituye la base de los métodos clásicos de la identificación bacteriana. Al formular el medio de cultivo de la mayor parte de microorganismos, es necesario aportar fuentes de magnesio, hierro, calcio, potasio, en forma iónica (Mg^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} y K^+) que son necesarios como activadores enzimáticos o formando parte de moléculas o elementos del organismo. Otros minerales conteniendo cobre, manganeso, zinc, etc., asimismo necesarios, son aportados normalmente en cantidad suficiente por el agua de suministro. Muchos microorganismos son capaces de sintetizar todos sus componentes esenciales cuando disponen de los elementos anteriormente mencionados. Pero en ocasiones (por ejemplo, por una mutación genética) el microorganismo pierde la capacidad de síntesis de algún componente que todavía le es imprescindible. En esos casos hay que suministrarlo con el medio y se denominan factores de crecimiento que variarán en función de las especies y de las pérdidas en la capacidad de síntesis que se hayan producido.

En la figura 14 se presentan ejemplos de placas en las que se han cultivado bacterias totales (figura 14a) y hongos totales (figura 14b).

Figura 14



a. Bacterias totales después de una incubación.
b. Hongos totales después de una incubación.
Fuente: Xavier Solans (2012). INSHT.

5.3.2. Temperatura de incubación

La **temperatura de incubación** se puede utilizar para aislar selectivamente microorganismos teniendo en cuenta lo siguiente:

- Numerosos hongos y bacterias libres crecen de manera óptima a temperaturas que oscilan entre 18 °C y 25 °C.
- Numerosos hongos no crecen bien a temperaturas por encima de 35 °C con la excepción de *Aspergillus fumigatus*, de manera que este hongo puede aislarse de forma selectiva si se incuban las muestras a 35-40 °C.

Medios diferenciales

Un medio de cultivo que es a la vez selectivo y diferencial es el **Agar Eosina - Azul de metileno** que se utiliza para identificar bacterias del grupo entérico. Es selectivo porque la presencia del azul de metileno inhibe el crecimiento de las bacterias *Gram* positivo, y diferencial puesto que, de las *Gram* negativo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* forman colonias de color azul púrpura con brillo metálico, mientras que *Shigella*, *Salmonella* o *Pseudomonas* forman colonias incoloras o rosadas.

- La temperatura óptima de incubación para microorganismos patógenos es de 37 °C, que es la temperatura del cuerpo humano.
- Los actinomicetes termofílicos tienen una temperatura de incubación superior a 50 °C, lo que excluye el desarrollo de cualquier otro microorganismo que no sea termotolerante.

5.3.3. **Atmósfera de incubación**

La **atmósfera de incubación** es otro factor importante. Muchos de los análisis basados en el cultivo están limitados al estudio de las especies aerobias (obligadas o facultativas), es decir, aquellas que solo se desarrollan en presencia de oxígeno o a las que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia del mismo. Sin embargo, en el ambiente se pueden encontrar las esporas (formas resistentes de vida) de especies anaerobias o las formas vegetativas, que crecen en zonas donde no hay oxígeno por lo que el análisis de las bacterias anaerobias requiere atmósferas sin oxígeno, habitualmente con nitrógeno y dióxido de carbono.

Se añade al cultivo una cantidad de una solución diluida de sales con un agente reductor, como el tioglicolato y un indicador redox cuyo cambio de color indicará contaminación por oxígeno. Otros medios para lograr condiciones anaeróbicas consisten en la utilización de medios de cultivo que contengan agentes reductores (cisteína o tioglicolato) y el uso de cabinas para el cultivo de anaerobios.

5.3.4. **Recuento de colonias**

La obtención de la concentración de microorganismos se basa en la relación entre el número de colonias que se han contabilizado y el volumen de aire aspirado, función del caudal al que esté calibrado el muestreador y el tiempo de muestreo. El recuento de colonias a veces no es un proceso sencillo por los motivos siguientes:

- Es difícil identificar como separadas colonias formadas por agregados microbianos.
- También es difícil diferenciar colonias de similar morfología.
- Una determinada especie puede segregar productos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos.
- La morfología y/o tamaño de unas colonias oscurecen completamente otras.

En la figura 15 se muestra un modelo de lupa para facilitar el recuento. En la figura 16 se muestra una placa de cultivo en la que se aprecian las señales de la impactación de las partículas tras el proceso de muestreo.



Figura 15. Lupa para recuento

Figura 16. Placa con señales de impactación



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

Para evitar la infravaloración de las colonias crecidas, cuando la captación ha sido hecha con un impactador multiorificio, es preciso realizar un ajuste estadístico sobre el número de colonias contadas que contemple la probabilidad de que más de una partícula haya impactado en el mismo lugar. La fórmula básica para el cálculo de la corrección por coincidencia es la siguiente:

$$P_r = N \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \dots + \frac{1}{N-(r+1)} \right] \quad (5)$$

donde P_r es el número estimado de partículas cultivables; r es el número de colonias contadas en la placa y N es el número total de orificios por plataforma del impactador.

5.3.5. Identificación de microorganismos cultivables

La **taxonomía** es la ciencia que permite la clasificación de las formas vivas, estableciendo las relaciones que existen entre un grupo de organismos y otro, y también diferenciarlos.

Los métodos de que se sirve la taxonomía para establecer esas relaciones o diferencias son diversos; el más clásico de todos ellos consiste en la observación de las características de las colonias crecidas en cultivo: su **forma**, **tamaño**, **olor** y **pigmentación**.

A nivel celular, la forma, tamaño, la agrupación de las células bacterianas y la presencia o ausencia de flagelos, cápsula o endosporas, son las características que definen las distintas clases de microorganismos. Para la observación al microscopio de estos aspectos, es preciso en muchas ocasiones utilizar co-

lorantes. Una de las primeras pruebas que se realizan para la identificación de las especies bacterianas es la tinción de *Gram*, que se basa en las diferencias físicas que existen entre las paredes celulares de las bacterias.

El resultado de la prueba permite clasificar todas las bacterias en dos grupos que se denominan: **Gram positivo** y **Gram negativo**. En esta prueba se utilizan dos colorantes: el cristal violeta que tiñe de azul las bacterias *Gram* positivo, mientras que las negativas permanecen incoloras, y un colorante de contraste, la safranina, que tiñe ligeramente de rosa las bacterias *Gram* negativo y permite reconocerlas y diferenciarlas al microscopio.

Un paso más permite identificar las bacterias a nivel de género, especie e incluso subespecie. En este caso, son las pruebas bioquímicas, fisiológicas o nutricionales las que permiten evaluar los constituyentes de las paredes bacterianas, sus inclusiones, los antígenos, el rango de temperaturas a las que crecen, y su óptimo, sus requerimientos de oxígeno, la tolerancia al pH, sales o presiones osmóticas, su sensibilidad a los antibióticos, sus fuentes de energía, carbono y nitrógeno, los productos de fermentación y el tipo de metabolismo. En el mercado se encuentran disponibles diferentes sistemas que permiten el ensayo múltiple de varios de los aspectos mencionados.

En la figura 17 se muestra el resultado obtenido aplicando unos de estos sistemas.

La identificación de los hongos se basa en la observación de la morfología de sus esporas, aunque también se pueden utilizar pruebas de tinción.

En la figura 18 se muestran los resultados de la incubación de tres especies de hongos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*.

Figura 18. Resultados de la incubación de diferentes especies de hongos *Aspergillus*



a. *Aspergillus flavus*. b. *Aspergillus fumigatus*. c. *Aspergillus niger*.
Fuente: Xavier Solans (2012). INSH.



Figura 17. Ensayo múltiple de identificación
Fuente: INSH. NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras.

Lectura recomendada

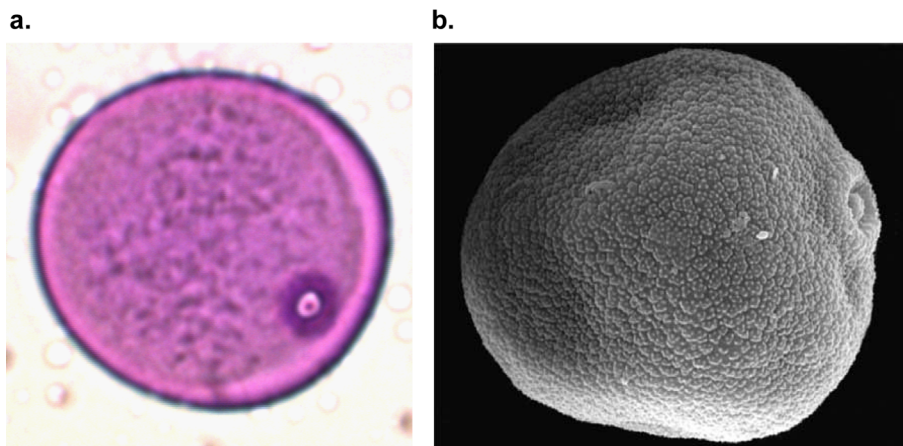
Detalles instrumentales sobre los procedimientos de captación, cultivo e identificación de bacterias y hongos en aire pueden encontrarse en:

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

5.4. Recuento de microorganismos, polen y esporas

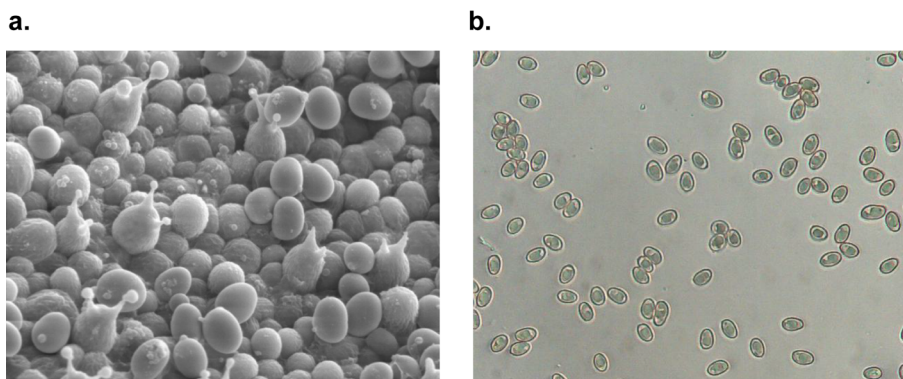
Un proceso teóricamente más simple es la identificación y cuantificación de microorganismos contables, aunque la diferenciación entre especies concretas de pólenes y esporas puede ser altamente complicada y solamente al alcance de expertos en taxonomía. Recurrir a las técnicas microscópicas que comentamos a continuación es imprescindible, acudiendo en muchos casos a la microscopía electrónica, debido al pequeño tamaño de estas especies. En las figuras 19 y 20, se presentan imágenes de pólenes y esporas. En el caso de las esporas de hongos o de microorganismos con capacidad de formar esporas, existe evidentemente la posibilidad de su cultivo, independientemente o con posterioridad, de su recuento.

Figura 19. Pólenes



a. Grano de polen visto al microscopio óptico. b. Grano de polen visto al microscopio electrónico de barrido.
Fuente: J. Belmonte (2003). UAB.

Figura 20. Esporas



a. Esporas vistas al microscopio óptico. b. Esporas vistas al microscopio electrónico de barrido.

5.5. Técnicas microscópicas

El uso del microscopio es una técnica fundamental para el recuento del número total de microorganismos, como hemos visto en las figuras 19 y 20. Ayuda en la identificación de las especies, permite reconocer la forma de las células, observar el resultado de las pruebas de tinción o la movilidad de las bacterias. Los tipos de microscopios más usados los resumimos a continuación.

1) Microscopio óptico

Se trata de un microscopio convencional en el que la observación se basa en la iluminación de los especímenes que destacan contra un fondo oscuro. El examen microscópico de muestras ambientales permite el recuento total de hongos y bacterias.

En el caso de hongos y sus esporas puede realizarse directamente, reconociendo su forma o utilizando métodos de tinción. Como ya hemos dicho, existen dificultades para identificar esporas de especies de hongos que tienen una gran similitud morfológica, por ejemplo: las esporas de *Aspergillus* y *Penicillium*, que a menudo son contadas como un único grupo. La solución en estos casos, es el cultivo de los microorganismos captados.

Para la observación de bacterias es necesario servirse de colorantes y en especial de los fluorescentes. Actualmente se dispone de kits comerciales de tinción de *Gram* fluorescente y de reactivos que permiten discernir entre formas vivas y muertas.

2) Microscopio de contraste de fases

Se basa en la difracción de la luz que al incidir sobre los especímenes provoca distintos grados de brillo y de contraste, utilizándose la inmersión de la muestra en líquidos de distinto índice de refracción. Es una técnica apropiada para la observación de especies que presentan dificultades de identificación en el microscopio óptico y para el estudio de las endosporas bacterianas, que tienen índices de refracción distintos a los de las formas vegetativas.

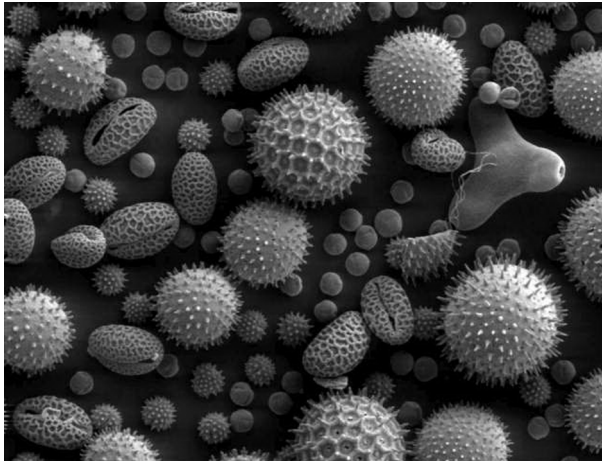
3) Microscopio de fluorescencia

Se basa en la observación de la fluorescencia emitida por determinados fluorocromos (naranja de acridina) ligados a las células cuando son excitados por la luz ultravioleta de una determinada longitud de onda. Esta técnica se utiliza para el recuento directo de partículas.

4) Microscopio electrónico

En estos casos, en lugar de luz se utiliza un haz de electrones. Se trata de una técnica ya mucho más compleja que requiere una instrumentación relativamente sofisticada, pero con unos niveles de resolución muchísimo más elevados. Aunque existen muchos tipos de microscopía electrónica, los más citados para la identificación de agentes biológicos son los de transmisión y de barrido. En la figura 20 mostramos unos granos de polen mediante microscopía electrónica de barrido.

Figura 20. Granos de polen por microscopía electrónica de barrido



5.6. Bioensayos

El término **bioensayo** hace referencia a los métodos cuantitativos, *in vivo* o *in vitro*, cuyo objetivo es un efecto observable en un sistema biológico o en algún organismo.

Los **virus** son parásitos celulares obligados (no pueden sobrevivir mucho tiempo fuera de células vivas), por lo que su análisis supone la inoculación de cultivos celulares o de animales. En el cultivo celular cada partícula viral se revela como un foco de infección y esta se evidencia por la formación de una lesión. Este método proporciona información sobre el número de partículas víricas que fueron capaces de infectar el tipo de células del cultivo. El uso de este método para muestras ambientales tiene muchas limitaciones, ya que otros microorganismos pueden crecer en el cultivo celular alterando los resultados.

Ejemplos de bioensayos

- Los cultivos celulares para la detección de virus y bacterias.
- La exposición de células u organismos completos a muestras que puedan contener toxinas.
- El inmunoensayo basado en la respuesta de las moléculas biológicas (anticuerpos) frente a un antígeno.
- El ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* para la detección de endotoxinas.
- Los ensayos de infectividad.

5.6.1. Inmunoensayo

El **inmunoensayo** es un método basado en la reacción específica que ocurre entre el antígeno y el anticuerpo y un marcador (enzimas, moléculas fluorescentes o radioactivas –radioinmunoensayo: RIA–) que haga detectable y cuantificable el resultado del ensayo.

Esta especificidad ha sido utilizada en un gran número de aplicaciones, entre ellas, la detección de: alérgenos de ácaros, alérgenos de origen animal o vegetal, antígenos microbianos, glucanos fúngicos, aflatoxinas, látex, etc. Las técnicas habituales de inmunoensayo son las siguientes:

1) *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA)

Uno de los ensayos más ampliamente utilizado para determinar la concentración de alérgenos en polvo es el test ELISA⁶ (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). En el ensayo, las paredes de los pocillos de una placa están recubiertas por el anticuerpo de captura, que es específico para antígenos concretos. Las muestras tomadas son tamizadas hasta obtener la fracción fina de la que se extraerán las proteínas solubles (alérgeno); este extracto se diluye de forma seriada. El mismo proceso se lleva a cabo con el alérgeno patrón. Alícuotas de ambos extractos son añadidas a los pocillos que contienen el anticuerpo de captura. Las placas son incubadas produciéndose la reacción antígeno-anticuerpo; posteriormente se procede al lavado de las mismas para eliminar los materiales no ligados. El complejo antígeno-anticuerpo se detecta utilizando un segundo anticuerpo al que va unido un enzima que reconoce dicho complejo y finalmente, se añade una sustancia cromógena que cambia de color al reaccionar con el enzima y se lee el cambio de color. La concentración de los antígenos buscados se obtiene por comparación de las lecturas de las muestras con las curvas generadas por concentraciones conocidas de los patrones.

⁶Acrónimo de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

2) Anticuerpos fluorescentes

En este caso, los anticuerpos están ligados a compuestos orgánicos fluorescentes como rodamina B (fluorescencia roja), o isotiocianato de fluoresceína (fluorescencia amarilla verdosa) que no alteran la especificidad del anticuerpo, pero permiten la detección del antígeno al observar el preparado con el microscopio de fluorescencia. Las aplicaciones de esta técnica son múltiples, utilizándose para el diagnóstico de la legionelosis mediante la tinción de una biopsia de tejido pulmonar con anticuerpos fluorescentes. También son utilizados en el diagnóstico de infecciones víricas o en el recuento de determinados tipos celulares en mezclas complejas.

3) Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) utiliza isótopos radiactivos como conjugados de los anticuerpos. El isótopo I¹²⁵ es el más utilizado como sistema de detección, ya que las proteínas se pueden yodar con facilidad sin alterar su especificidad. El ensayo directo consiste en una técnica en dos pasos. En primer lugar, se añaden los anticuerpos antígeno radiactivos específicos del antígeno a una serie de pocillos pequeños, que contienen concentraciones conocidas de antígeno puro. Después se mide la radiactividad en cada uno de los pocillos, generándose una gráfica patrón. A continuación, se deja que la muestra en la que se quiere detectar el antígeno se ligue en otro pocillo con los anticuerpos radiactivos y se mide la radiactividad. La concentración de antígeno se obtiene al comparar la medición del ensayo con la gráfica estándar preparada.

La mayor utilidad clínica de esta prueba es la detección de proteínas. El RIA presenta el mismo rango de sensibilidad y rapidez que el ELISA, la cual lo está sustituyendo progresivamente, ya que implica una instalación de mantenimiento costoso, por tratarse de una instalación radioactiva, y de gestión de residuos radiactivos.

5.6.2. Ensayos de toxicidad

El ensayo de toxicidad más representativo es el del **lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL⁷)**, en el que los efectos observables son la coagulación, el aumento de la turbidez o una reacción cromogénica. Se emplean para la determinación de endotoxinas bacterianas y la medición de glucanos.

⁽⁷⁾ Abreviamos *lisado de amebocitos de Limulus* con la sigla LAL.

Las **endotoxinas** son un componente de la pared celular de las bacterias *Gram* negativo. Se trata de agregados macromoleculares de alrededor de 1 millón de *daltons* (endotoxina libre). En forma pura, las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS⁸) cuya fracción lipídica (lípidos A), es la responsable de la toxicidad característica de la molécula. Se ha observado que las propiedades toxicológicas de las endotoxinas son diferentes según las especies y el estadio de desarrollo de las bacterias. Al calentar las endotoxinas, su efecto tóxico aumenta, ya que las proteínas se desnaturalizan y, en consecuencia, las endotoxinas acceden más fácilmente a los receptores celulares.

⁽⁸⁾ Abreviamos *lipopolisacáridos* con la sigla LPS.

La captación se realiza en filtros, que se tratan con agua destilada, preparándose una serie de diluciones con las cuales se efectúa el ensayo que se basa en la activación de la cadena enzimática de coagulación de la linfa del cangrejo *Limulus polyphemus*.

5.7. Pruebas genéticas

Las pruebas llamadas **genéticas** se basan en el reconocimiento de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN⁹) lo que permite detectar de forma rápida y fiable la presencia de una determinada especie.

⁽⁹⁾ Abreviamos *ácido desoxirribonucleico* con la sigla ADN.

La hibridación de ácidos nucleicos detecta la presencia o ausencia de secuencias de ADN específicas que son asociadas a un organismo. El elemento clave en el análisis es disponer de una sonda de ácido nucleico para un microorganismo, una sola hebra de ADN que contenga secuencias características del organismo. Cuando en una muestra un microorganismo contiene secuencias de ADN complementarias a las de la sonda, se produce la **hibridación**, formándose una molécula de doble cadena. Para detectar la reacción se marca la sonda con moléculas indicadoras (enzimas, isótopos radiactivo o compuestos fluorescentes).

La técnica genética más característica es el PCR¹⁰ (reacción en cadena de la polimerasa) que es un método *in vitro* de síntesis de secuencias de ácidos nucleicos seleccionados, por el cual segmentos concretos de ADN son específicamente replicados. El ADN se mezcla con bases de nucleótidos y el enzima polimerasa y se incuba en condiciones de temperatura controlada. En el proceso las cadenas se separan, se copian, se vuelven a separar y se vuelven a copiar; de esta manera en muy poco tiempo se obtienen millones de copias de moléculas de ADN listas para el ensayo, al que se añaden sondas seleccionadas de ADN con un marcador fluorescente o radioactivo capaces de hibridarse con regiones específicas del ADN buscado. La sonda puede hibridarse en cantidades detectables si el organismo de interés está presente en la muestra inicial y si el segmento de ADN es amplificado.

⁽¹⁰⁾ Acrónimo de *Polymerase Chain Reaction*.

Es un método sensible, muy específico, rápido y capaz de detectar microorganismos difíciles de cultivar o no cultivables, con la ventaja añadida de no tener que manipular microorganismos peligrosos, sino parte de los mismos. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que es un método cualitativo y solo detecta agentes biológicos predeterminados.

5.8. Ensayos químicos

Consisten en determinar moléculas biológicas que forman parte estructural de los microorganismos o que son producidos por ellos mediante técnicas instrumentales típicas del análisis químico como la **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC¹¹)**, la **cromatografía de gases (CG¹²)** y la **espectrometría de masas (EM¹³)**, usadas de forma independiente o en combinación.

⁽¹¹⁾ Abreviamos *cromatografía líquida de alta resolución* con la sigla HPLC.

⁽¹²⁾ Abreviamos *cromatografía de gases* con la sigla CG.

⁽¹³⁾ Abreviamos *espectrometría de masas* con la sigla EM.

Las moléculas de origen biológico determinadas más habitualmente son:

- **Moléculas estructurales de las membranas y paredes de los microorganismos**, por ejemplo: carbohidratos (peptoglúcidos o beta glucanos), ácidos grasos, lípidos (ergosterol de las membranas fúngicas) o lipopolisacáridos (endotoxinas de la pared de las bacterias *Gram* negativo).
- **Productos metabólicos**, por ejemplo: micotoxinas fúngicas, aldehídos, alcoholes y otros compuestos orgánicos volátiles.
- **Macromoléculas segregadas**, por ejemplo: enzimas específicos y otras proteínas.
- **Macromoléculas excretadas**, por ejemplo la guanina contenida en los excrementos de los ácaros.

6. Evaluación

Como ya hemos expuesto al principio del módulo, el tercer paso de la metodología de evaluación, la **valoración**, no es tan sencillo como en el caso de los contaminantes químicos, ya que la utilización de límites cuantitativos está sometida a discusión. En este apartado se resumen las principales referencias existentes, así como las razones expuestas por la ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) para justificar la **ausencia de valores de referencia**.

6.1. Ausencia de criterios numéricos de valoración

La comisión para los bioaerosoles de la ACGIH expone una serie de razones para explicar que **no es posible establecer criterios numéricos de valoración**. Los resumimos a continuación.

6.1.1. Ausencia de base científica

Establecer un valor límite de exposición general para la concentración en ufc de los bioaerosoles cultivables (hongos y bacterias totales que pueden crecer en cultivos de laboratorio) o contables (los granos de polen, esporas de hongos, células bacterianas y otros materiales) que pueden ser identificados y contados por microscopía, no tiene justificación científica porque:

- Los bioaerosoles son mezclas complejas de diferentes clases de partículas.
- Las respuestas de los seres humanos a los bioaerosoles varían desde efectos inocuos hasta enfermedades graves, dependiendo del agente específico y de los factores de susceptibilidad de cada persona.
- Las concentraciones medidas de los bioaerosoles cultivables y contables dependen del método de toma de muestra y análisis. No es posible recoger y evaluar todos los componentes de los bioaerosoles utilizando un único método de muestreo.
- En la actualidad, la información relacionando concentraciones de bioaerosoles cultivables o contables con efectos sobre la salud es, en general, insuficiente para describir las relaciones exposición-respuesta.

6.1.2. Falta información sobre efectos irritantes, tóxicos o alérgicos

La información disponible sobre efectos irritantes, tóxicos o alérgicos habitualmente solo contiene datos cualitativos de la exposición. Los datos epidemiológicos que existen son insuficientes para describir las relaciones exposición-respuesta por las razones siguientes:

a) La mayor parte de los datos disponibles de concentraciones de bioaerosoles específicos proceden más de medidas indicadoras que de la determinación de los agentes causantes reales. Por ejemplo, la determinación de hongos cultivables se utiliza para representar la exposición a los alérgenos. Además, la mayor parte de las determinaciones proceden de puntos de acumulación de estos agentes (reservorios) o de muestras ambientales. Es poco probable que estos datos representen realmente la exposición humana a los agentes causantes reales.

b) Los componentes y las concentraciones de los bioaerosoles varían ampliamente. Los muestreadores de aire más comúnmente utilizados solo toman muestras en períodos cortos de tiempo que difícilmente representan la exposición humana. Las muestras puntuales en períodos cortos de tiempo pueden contener una cantidad de un bioaerosol en concreto en órdenes de magnitud muy superiores o inferiores a la concentración media ambiental. Algunos organismos liberan aerosoles como **concentraciones de irrupción**, que raramente pueden detectarse utilizando muestras puntuales. Estos episodios de generación de bioaerosoles pueden producir efectos significativos para la salud de los expuestos.

c) En los estudios de puestos de trabajo individuales, el número de personas afectadas por exposición a agentes biológicos puede ser pequeño si la contaminación está localizada, afectando de este modo solo una parte de los ocupantes del local. Sin embargo, los datos de diferentes estudios rara vez se pueden combinar para alcanzar cifras significativas del ensayo debido a la diversa especificidad de los tipos de agentes biológicos responsables de enfermedades relacionadas con los bioaerosoles que a menudo difieren mucho de un estudio a otro. Estos factores contribuyen a obtener una baja potencia estadística a la hora de evaluar conjuntamente las relaciones causa-efecto entre la exposición a agentes biológicos específicos y las quejas de salud relacionadas.

6.1.3. Agentes infecciosos

Los datos de las relaciones dosis-respuesta en humanos están disponibles para unos pocos bioaerosoles infecciosos. En la actualidad, los protocolos para el muestreo en aire de agentes infecciosos son limitados y adecuados solamente para trabajos de investigación. En la práctica, las medidas típicas de salud

pública, como la inmunización activa (vacunación), la detección de casos y el tratamiento médico, siguen siendo las defensas primarias contra bioaerosoles infecciosos.

Las instalaciones asociadas a un mayor riesgo para la transmisión de enfermedades infecciosas en el aire (por ejemplo, los laboratorios de microbiología, los animalarios y los establecimientos sanitarios) deben emplear los controles técnicos, como aislamiento por zonas, ventilación controlada y otras para minimizar las concentraciones de agentes infecciosos en el aire. Además, estas instalaciones deben considerar la necesidad de aplicar controles administrativos, como restricciones de entrada, permisos de trabajo, etc., y equipos de protección personal adecuados para prevenir la exposición de los trabajadores a estos bioaerosoles.

6.1.4. Contaminantes de origen biológico analizables

Los contaminantes de procedencia biológica que son analizables son sustancias producidas por la materia viva, que, como hemos visto, se pueden detectar utilizando distintos tipos de ensayos (químicos, inmunológicos o biológicos) y comprenden las endotoxinas, micotoxinas, alérgenos y compuestos orgánicos volátiles. La evidencia existente no respalda el establecimiento de valores límite de exposición para ninguna de estas sustancias analizables. Los métodos de ensayo para ciertos alérgenos comunes presentes en el aire y endotoxinas están mejorando constantemente, al tiempo que progresan también las validaciones sobre el terreno de estos métodos.

También, las modernas técnicas moleculares permiten analizar la concentración de organismos específicos, detectados normalmente solo por cultivo o recuento. En algunos estudios experimentales y epidemiológicos se han observado relaciones dosis-respuesta para algunos bioaerosoles analizables. Por lo tanto es previsible que en un futuro se pudieran aplicar límites de exposición para determinados contaminantes de origen biológico analizables.

6.2. Pautas para la evaluación de la exposición a agentes biológicos

El RD 664/1997, en su artículo 4, da las siguientes pautas para poder realizar la evaluación de la exposición a contaminantes biológicos:

- 1) Identificados uno o más riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, se procederá, para aquellos que no hayan podido evitarse, a evaluar los mismos determinando la naturaleza, el grado y duración de la exposición de los trabajadores.

2) Cuando se trate de trabajos que impliquen la exposición a varias categorías de agentes biológicos, los riesgos se evaluarán basándose en el peligro que supongan todos los agentes biológicos presentes. Ver la clasificación de los agentes biológicos en grupos, incluyendo ejemplos de agentes clasificados en cada grupo en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de los agentes biológicos en función del riesgo de infección

Categoría	Definición	Ejemplos
Grupo 1	Agente biológico que resulte poco probable que cause enfermedad en el hombre.	La clasificación comunitaria no incluye los agentes biológicos del grupo 1, el hecho de que un agente biológico no esté clasificado en los grupos de riesgo 2 a 4 de esta clasificación no significa que estén implícitamente clasificados en el grupo 1.
Grupo 2	Agente patógeno que pueda causar una enfermedad en el hombre y pueda suponer un peligro para los trabajadores; es poco probable que se propague a la colectividad; existen, generalmente, profilaxis o tratamientos eficaces.	Bacterias: <i>Legionella pneumophila</i> Virus: virus de la gripe Hongos: <i>Penicillium sp.</i>
Grupo 3	Agente patógeno que pueda causar una enfermedad en el hombre y presente un serio peligro para los trabajadores; exista el riesgo de que se propague a la colectividad, pero existen, generalmente, profilaxis o tratamientos eficaces.	Bacterias: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Virus: virus de la hepatitis B Hongos: <i>Histoplasma capsulatum</i>
Grupo 4	Agente patógeno que cause una enfermedad grave en el hombre y suponga un serio peligro para los trabajadores; existan muchas posibilidades de que se propague a la colectividad; no existe, generalmente, profilaxis o tratamiento eficaces.	Bacterias: no hay ninguna clasificada en este grupo Virus: virus de Ébola Hongos: no hay ninguno clasificado en este grupo

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

3) Esta evaluación deberá repetirse periódicamente y, en cualquier caso, cada vez que se produzca un cambio en las condiciones que pueda afectar a la exposición de los trabajadores a agentes biológicos.

4) Asimismo, se procederá a una nueva evaluación del riesgo cuando se haya detectado en algún trabajador una infección o enfermedad que se sospeche que sea consecuencia de una exposición a agentes biológicos en el trabajo.

5) La evaluación mencionada se efectuará teniendo en cuenta toda la información disponible y, en particular:

- La naturaleza de los agentes biológicos a los que estén o puedan estar expuestos los trabajadores y el grupo a que pertenecen. Si un agente no consta en la tabla, el empresario, previa consulta a los representantes de los trabajadores, deberá estimar su riesgo de infección teniendo en cuenta las definiciones previstas, a efectos de asimilarlo provisionalmente a los incluidos en uno de los cuatro grupos previstos en el mismo. En caso de duda entre dos grupos deberá considerarse en el de peligrosidad superior.
- Las recomendaciones de las autoridades sanitarias sobre la conveniencia de controlar el agente biológico a fin de proteger la salud de los trabaja-

dores que estén o puedan estar expuestos a dicho agente en razón de su trabajo.

- La información sobre las enfermedades susceptibles de ser contraídas por los trabajadores como resultado de su actividad profesional.
- Los efectos potenciales, tanto alérgicos como tóxicos, que puedan derivarse de la actividad profesional de los trabajadores.
- El conocimiento de una enfermedad que se haya detectado en un trabajador y que esté directamente ligada a su trabajo.
- El riesgo adicional para aquellos trabajadores especialmente sensibles en función de sus características personales o estado biológico conocido, debido a circunstancias tales como patologías previas, medicación, trastornos inmunitarios, embarazo o lactancia.

6.3. Criterios de interpretación de resultados

La Comisión para Bioaerosoles de la ACGIH ha desarrollado unas guías para la evaluación de la exposición a contaminantes biológicos en ambientes interiores que tienen en cuenta la valoración médica de los síntomas, la evaluación del funcionamiento del local y el criterio del profesional experto.

En ausencia de criterios numéricos de valoración, es necesario decidir con antelación los criterios de interpretación que serán utilizados para determinar si un ambiente está o no contaminado.

En términos generales, se podrían considerar los siguientes criterios de interpretación de los resultados obtenidos:

- Los tipos y frecuencias relativas de los contaminantes biológicos en el ambiente con problemas y en un ambiente **control** (el exterior u otro local sin problemas).
- La evidencia médica de que una infección o alergia ha sido causada por un contaminante biológico específico.
- Las relaciones existentes entre el ambiente interior y el ambiente control pueden indicar posibles amplificaciones.
- La evaluación de los reservorios y las posibilidades de amplificación y de diseminación.

Lectura recomendada

Las guías de la ACGIH no están disponibles gratuitamente en Internet, pero se pueden adquirir en la página web de ACGIH.

A continuación, y a título de ejemplo, se resumen las guías para la interpretación de los resultados, clasificadas según los grupos de organismos más frecuentes en la composición de los bioaerosoles.

6.3.1. Virus

Muchas de las enfermedades asociadas a los virus presentan síntomas bien definidos, por lo que la existencia de una enfermedad es la demostración de que el virus estuvo presente. No se conoce el número de partículas necesarias para causar una infección en un individuo susceptible, aunque algunas evidencias sugieren que un único virus es capaz de iniciar la infección. Actualmente no existen suficientes pruebas de que la exposición a virus pueda causar intoxicaciones o sensibilizaciones.

El hecho de que los virus sean parásitos obligados (necesitan de un ser vivo para su desarrollo) y, por lo tanto, sean las personas las que actúan como amplificadores y diseminadores (el habla, los estornudos o la tos), hace innecesaria la evaluación del ambiente control. Factores tales como el aumento de la ocupación o una escasa renovación del aire pueden contribuir al aumento de la tasa de contagio.

6.3.2. Bacterias

Por lo general, en ambientes en los que no se ha detectado ninguna amplificación específica, las bacterias dominantes deberían ser las correspondientes a la flora bacteriana normal humana, es decir, bacterias *Gram* positivo pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Staphilococcus*. Las concentraciones ambientales elevadas de estos tipos de bacterias, que se encuentran en la piel y en las secreciones respiratorias, indican niveles de ocupación altos y/o que la renovación del aire es insuficiente.

Si las bacterias dominantes son *Gram* negativo, eso indicaría la existencia de focos de contaminación inusuales; por ejemplo, niveles elevados de bacterias *Gram* negativo, oxidasa negativa y fermentadoras de la glucosa sugieren un foco de contaminación de origen gastrointestinal (extracciones de los lavabos); si las bacterias encontradas son *Gram* negativo, oxidasa positiva y sus colonias son de color amarillo, el foco de contaminación más probable son aguas estancadas y contaminadas.

Algunos autores han sugerido la cifra de 4.500 ufc/m^3 , como límite superior de concentración de bacterias totales para interiores y en climas subárticos. Esa cifra solo es aplicable para organismos de origen humano y excluyendo cualquier tipo de patógenos. Tampoco es aplicable para climas más cálidos.

6.3.3. Endotoxinas

Las endotoxinas son componentes (lipopolisacáridos) de las membranas externas de las bacterias *Gram* negativas. Son compuestos altamente tóxicos que pueden causar fiebre y malestar, alteraciones en el número de leucocitos, alteraciones respiratorias, etc. Algunos autores sugieren niveles de entre 100 y 1.000 veces superiores a los niveles medidos en los ambientes control.

6.3.4. Hongos

El origen de los hongos que habitualmente se encuentran en los ambientes interiores es mayoritariamente del exterior, por lo que preferentemente se utilizará este como ambiente control.

Las diferencias en las relaciones entre los hongos del interior y del exterior dependen, fundamentalmente, del sistema de ventilación disponible. Esta relación es prácticamente idéntica cuando el edificio está ventilado de forma natural, mientras que, en edificios ventilados de forma mecánica, incluso en los que el sistema de filtración es deficiente, la concentración de hongos encontrados en el interior debería ser inferior a la presente en el exterior. En cualquier caso, los diferentes tipos de hongos encontrados del interior deberían corresponder a las especies del exterior propias de la estación climática.

Los niveles de hasta 100 ufc/m³ de hongos saprofitos pueden ser considerados normales, siempre y cuando se trate de ambientes en los que no exista población con deficiencias o enfermedades del sistema inmunitario.

6.3.5. Micotoxinas

Durante los procesos de destrucción de la materia orgánica, utilizada como fuente de energía por los hongos, se producen metabolitos secundarios; algunos de ellos son tóxicos para las bacterias (antibióticos), mientras que otros lo son para los animales y los seres humanos (micotoxinas: tricotecenos y aflatoxinas).

La exposición a estos compuestos se relaciona, básicamente, con ambientes agrícolas y el almacenamiento de grano. Los efectos para la salud que han sido descritos son: su potencialidad para inducir procesos cancerígenos, el deterioro del sistema inmunitario y daños en diversos órganos como son el corazón, el hígado o los riñones.

En la actualidad se dispone de algunos datos sobre las dosis a las que algunas micotoxinas producen efectos adversos para la salud. Diversos tricotecenos se caracterizan por tener dosis letales para el 50% de los individuos expuestos inferiores a 1 mg/kg (vía digestiva). La aparición de efectos crónicos (cáncer) en relación con la exposición a aflatoxinas puede ocurrir a dosis del orden de

µg/kg. Es bastante probable que los efectos crónicos causados por la exposición a micotoxinas sean amplificados cuando la vía de entrada en el organismo sea la inhalatoria.

La identificación y evaluación de los riesgos debidos a la exposición a micotoxinas es compleja y requiere, en general, del muestreo tanto de los hongos que las producen como de cada tipo de micotoxinas. El hecho de encontrar hongos productores de micotoxinas en muestras ambientales no siempre es evidencia de que exista exposición a las mismas.

Muchas de las cepas de los hongos denominados *toxigénicos* no producen micotoxinas de una forma rutinaria y algunos solo las producen en condiciones de laboratorio. En muestreos ambientales con medios de cultivo inespecíficos, algunos de estos hongos no pueden competir con otras especies de hongos, por lo que los niveles de hongos toxigénicos son inferiores a los niveles ambientales reales. No obstante, el hecho de encontrar niveles inusuales de hongos toxigénicos debería ir acompañado del muestreo ambiental de toxinas específicas.

6.3.6. Protozoos

El tamaño de estos organismos hace que su presencia en los bioaerosoles sea menos frecuente, ya que tienden a sedimentar rápidamente. Si existieran evidencias de efectos relacionables con organismos patógenos de este grupo, se deberían analizar sus reservorios (humidificadores, aguas estancadas), para poder determinar el origen de los problemas y eliminar los focos de contaminación.

6.3.7. Antígenos

Las alergias al polvo doméstico son conocidas desde hace años. En las últimas décadas se ha realizado un progreso considerable en la identificación, purificación y caracterización de los alérgenos producidos por los ácaros del polvo doméstico, sobre todo los producidos por las especies del ácaro *Dermatophagoides* (Der p I y II, Der f I y II y Der m I y II).

Algunos autores han propuesto los valores de antígeno de ácaros en polvo que pueden causar sensibilización y la aparición de síntomas en personas sensibilizadas (tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de antígeno de ácaros en polvo y riesgo asociado

Concentración mg Der p I/g o Der f I/g de polvo	Nivel de riesgo
< 2	Bajo
2 ⁻¹⁰	Significativo

Lecturas recomendadas

Para mayor información sobre los ácaros, consultar las notas técnicas del INSHT siguientes:

“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”

Concentración mg Der p I/g o Der f I/g de polvo	Nivel de riesgo
> 10	Alto

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

Sin embargo, todavía no se han propuesto valores límite de concentración para otros antígenos ambientales; no obstante, debido a que los individuos sensibilizados reaccionan frente a dosis muy bajas de antígeno, no se debería aceptar ningún valor de concentración como seguro para esas personas.

Por otra parte, unos niveles muy bajos de antígeno, probablemente, no constituyen un riesgo de sensibilización para nuevos pacientes. De todo ello se desprende que la aplicación de todas las medidas de control disponibles que rebajen los niveles ambientales de antígeno pueden hacer que un edificio sea seguro para los ocupantes no sensibilizados, pero no para todas aquellas personas que hayan desarrollado la enfermedad a consecuencia de su permanencia en el edificio.

Ejercicios de autoevaluación

Ejercicios

1. ¿Cuál es el mínimo número total de muestras a tomar para determinar una concentración promedio al evaluar una exposición por inhalación a agentes biológicos?
2. ¿Cuál es el mínimo número total de muestras a tomar para determinar el intervalo de confianza de la media y su varianza?
3. ¿Cuál es el volumen de aire, m^3 , captado en las siguientes condiciones de caudal y tiempo de muestreo?
 - a) 30 l/min durante 6 min.
 - b) 60 l/min durante 3 min.
 - c) 80 l/min durante 2 min.
4. ¿Cuál sería el tiempo de muestreo adecuado para una determinación de bacterias en aire si se pretende tener una densidad mínima de 50 ufc/cm^2 , siendo el área de captación del muestreador de 100 cm^2 , el caudal del muestreador de 10 l/min y la concentración estimada de bacterias en aire de 100 ufc/m^3 ?
5. Calcular la eficacia técnica de un muestreo en el que la eficacia de conservación biológica fue del 95%, la eficacia de la entrada del aire del 90% y el diámetro aerodinámico de corte de 0,7. No reconsideran pérdidas en otros elementos del equipo.

Preguntas abiertas

6. Señalad cuáles son los principales argumentos que explican la no existencia de valores límite de agentes biológicos en aire.
7. ¿Cuáles son las alternativas a la determinación de agentes biológicos en aire de cara a la evaluación de riesgos para la protección de los trabajadores?

Elección múltiple

8. La estrategia de muestreo, debe incluir las especificaciones sobre...
 - a) la concentración esperada del agente biológico en aire.
 - b) los métodos analíticos que se van a utilizar para detectar, cuantificar e identificar los agentes biológicos.
 - c) los focos de contaminación típicos de los agentes biológicos.
 - d) Todas las anteriores.
9. Conocer los agentes biológicos que se van a estudiar es...
 - a) una condición imprescindible para iniciar el muestreo.
 - b) una buena ayuda, aunque no imprescindible para iniciar el muestreo.
 - c) importante solamente de cara a preparar el cultivo para su análisis.
 - d) importante solamente cuando se trata de organismos cultivables.
10. Conocer la variabilidad de los agentes biológicos en el espacio y el tiempo...
 - a) es útil para preparar las medidas de prevención y protección.
 - b) es fundamental para la estrategia de muestreo.
 - c) es una información que solamente se usa a nivel científico.
 - d) en general no interesa debido a la propia complejidad de los bioaerosoles.
11. Escoger los equipos y métodos más idóneos para la captación de los agentes biológicos en aire...
 - a) es función del higienista especialista en agentes biológicos.
 - b) forma parte de la estrategia del muestreo.
 - c) a) y b) son ciertas.
 - d) Ninguna de las anteriores es cierta.

12. Para controlar o evitar una contaminación por *Legionella*, en cuanto al agua corriente sanitaria es recomendable...

- a) mantenerla a temperatura ambiente.
- b) mantenerla entre 40 y 60 °C.
- c) mantenerla por encima de 60 °C siempre.
- d) no mezclar nunca la caliente con la fría.

13. No es una razón para tomar la decisión de medir la presencia a de agentes biológicos en aire...

- a) localizar focos de emisión.
- b) obtener datos epidemiológicos.
- c) comprobar la eficacia de medidas de control.
- d) certificar una enfermedad profesional.

14. Comprobar las hipótesis elaboradas para explicar una exposición a agentes biológicos...

- a) es un buen argumento para llevar a cabo su determinación en aire.
- b) forma parte de la higiene operativa biológica.
- c) es función de la higiene teórica.
- d) es responsabilidad de los epidemiólogos, no de los higienistas.

15. El número de muestras a tomar...

- a) depende de la experiencia del higienista. a más experiencia, menos muestras.
- b) viene fijado por la correspondiente norma une, sin posibilidad de modificarlo.
- c) viene fijado en el RD 664/97.
- d) Ninguna de las anteriores.

16. El volumen de muestreo está relacionado con...

- a) el LID.
- b) el caudal.
- c) el tiempo de muestreo.
- d) Todas las anteriores.

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

- a) el diámetro aerodinámico de corte.
- b) el tamaño de partícula al que la mitad de partículas serán captadas.
- c) a) y b) son ciertas.
- d) Ninguna de las anteriores.

18. Las esporas...

- a) se determinan siempre como organismos contables.
- b) se determinan siempre como organismos cultivables.
- c) se suelen determinar como organismos contables, aunque pueden ser también cultivables.
- d) solo se encuentran en el aire en primavera.

19. ¿Qué captadores usados para agentes biológicos son equivalentes a los empleados para agentes químicos?

- a) Los ciclones húmedos.
- b) Los filtros.
- c) Los borboteadores.
- d) b) y c) son ciertas.

20. Tomar como referencia para emitir una opinión sobre una contaminación biológica en un local la contaminación en el exterior...

- a) es una práctica relativamente habitual.
- b) se usa solamente en centros sanitarios.
- c) no tiene ningún sentido.
- d) se puede llevar a cabo si en el exterior tenemos garantías de que no hay contaminación ambiental por agentes químicos, lo que distorsionaría el resultado.

21. La microscopia electrónica permite...

- a) la determinación de especies de hongos una vez cultivados.
- b) la determinación de colonias de bacterias una vez cultivadas.
- c) complementar y, en algunos casos, sustituir la microscopia óptica.
- d) Ninguna de las anteriores.

22. El RIA implica siempre...

- a) un cultivo previo en *Agar agar*.
- b) disponer de un laboratorio especialmente equipado.
- c) no poder aplicar un ELISA.
- d) llevar a cabo antes un control de los microorganismos "contables".

Solucionario

Ejercicios de autoevaluación

1. Solución: 18 muestras (ver tabla 2).

3 (o más veces en un día) \times 3 (o más días consecutivos) \times 2 (duplicados siempre) = 18.

2. Solución: 11 muestras (ver tabla 2).

3.a) 0,180 m³

b) 0,180 m³

c) 0,160 m³

Volumen = caudal \times tiempo.

4. $t = (50 \times 100)/(100 \times 10) = 5$ min (ver ecuación (1)).

5. $ETM = 0,9 \times (1 - 0) \times 0,7 \times 0,95 = 0,6$; es decir, **60%** (ver ecuación (4)).

6.

- Los bioaerosoles son mezclas complejas de diferentes clases de partículas.
- Las respuestas de los seres humanos a los bioaerosoles son muy variables.
- Las concentraciones medidas de los bioaerosoles cultivables y contables son poco fiables ya que dependen totalmente del método de toma de muestra y análisis.
- La información relacionando concentraciones de bioaerosoles con efectos sobre la salud suele ser insuficiente para describir las relaciones exposición-respuesta.

7.

- Aislamiento por zonas.
- Control de la ventilación.
- Restricciones de entrada al personal (zonas restringidas).
- Permisos de trabajo.
- Uso y adecuada gestión de los equipos de protección personal adecuados para prevenir la exposición de los trabajadores los bioaerosoles.

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

Bibliografía

ACGIH (1989). *Committee Activities and Reports. Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment*. Cincinnati, Oh. USA: ACGIH.

ACGIH (1999). *Bioaerosols. Assessment and control*. Cincinnati, OH, USA: ACGIH.

ACGIH (2012). *Threshold limit values for chemical and physical Agents & Biological exposure indices*. Cincinnati, OH, USA: ACGIH.

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

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

Baur, X. (2005). "Enzymes as occupational and environmental respiratory sensitizers". *Int. arch. Occup. Environ. Health* (vol. 78, n.º 4).

Douwens S. J. et al. (2003). "Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects". *Ann. Occup. Hyg.* (vol. 47, n.º 3).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 807: Agentes biológicos: glosario*.

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*.

IRRSST. *Les bioaérosols en milieu de travail: guide d'évaluation, de contrôle et de prévention*. IRRSST. Disponible en: 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, n.º 4).

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Disponible en: http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/doc.php?id=BOE-A-1997-11144.

Real Decreto 909/2001, de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2001/07/28/pdfs/A27750-27759.pdf>.

UNE-EN 13098 de mayo del 2001, Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas suspendidas en el aire.

UNE-EN 481 de enero de 1995, Atmósferas en el lugar de trabajo. Definición de las fracciones por el tamaño de partículas para la medición de aerosoles.

UNE-EN 482 de noviembre del 2007, Atmósferas en el lugar de trabajo. Requisitos generales relativos al funcionamiento de los procedimientos para la medición de agentes químicos.

UNE-EN 689 de marzo de 1996, Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la evaluación de agentes químicos para la comparación con los valores límite y estrategia de muestreo.

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.