



## Documentación

# NTP 608: Agentes biológicos: planificación de la medición

Agents Biologiques. Planification du Prélèvement  
Biological Agents. Developing a Sampling Plan

### Redactora:

Ana Hernández Calleja  
Lda en Ciencias biológicas

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

*Esta nota técnica forma parte de una serie dedicada a la medición de agentes biológicos. En esta primera se plantea la necesidad de una cuidadosa planificación de la medición para llevar a cabo una correcta evaluación de la exposición a agentes biológicos. La necesidad de la planificación parte de las dificultades que supone la aplicación de una típica metodología higiénica: identificación, medición y valoración del contaminante, que se concretan en la falta de criterios de valoración cuantitativos y en la escasa fiabilidad de los resultados debida, en parte, a la falta de caracterización de los equipos de muestreo de agentes biológicos respecto a sus eficacias de captación y a la supervivencia de los microorganismos.*

## Introducción

El **RD 664/1997**, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, define los agentes biológicos como: *"los microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad"*.

Esta definición contempla dos categorías: los agentes biológicos vivos y los productos derivados de los mismos. La diferencia fundamental consiste en que los primeros tienen capacidad para reproducirse, mientras que los segundos no, y su comportamiento ambiental es equivalente al de la materia inerte. En común presentan la capacidad de generar un efecto adverso como consecuencia de la exposición de los trabajadores a tales agentes. En definitiva, el concepto de agente biológico incluye, de forma no exhaustiva a: virus, rickettsias, clamidias, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (estas dos últimas categorías son las consideradas en la definición como endoparásitos humanos), asimismo, incluye los organismos recombinantes capaces de provocar una enfermedad infecciosa. Entre los productos derivados de los agentes biológicos que pueden generar trastornos de tipo alérgico o tóxico se incluyen: micotoxinas, endotoxinas, ergosterol, 1,3-glucanos y un amplio grupo de alérgenos. Son sustancias que se emiten al ambiente o que forman parte estructural de los seres vivos, y que pueden estar presentes tanto en las formas vivas como en los microorganismos muertos o en sus fragmentos. Bioaerosol es el nombre con que se denomina la mezcla compleja de los distintos componentes de los agentes biológicos que se encuentra suspendida en el aire.

El **RD 664/1997**, en su **artículo 4** "Identificación y evaluación de riesgos", establece que:

*"...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."*

Los efectos de la exposición a agentes biológicos son consecuencia de dos situaciones diferentes; en un caso, ocurren tras la existencia de un accidente laboral, habitualmente declarado, investigado y con causas que casi siempre se pueden determinar, por ejemplo: los cortes o pinchazos producidos con herramientas o instrumentos contaminados; en el otro caso, los efectos son fruto de una exposición laboral más propia de las estudiadas por la higiene industrial, como es la exposición a agentes químicos, en la que un agente contaminante puede estar presente en el ambiente, en una concentración indeterminada que puede o no causar un daño en la salud de las personas.

La evaluación higiénica implica, en la mayor parte de los casos, la aplicación de una metodología que, esquemáticamente, consiste en los siguientes pasos:

1. La identificación del contaminante, de sus focos de contaminación, del proceso productivo que lo ha originado, de sus características toxicológicas, en definitiva, de la recogida de toda aquella información que ayude a conocer la situación de riesgo.
2. La medición del contaminante, que permitirá determinar cuáles son las concentraciones o niveles del agente en el ambiente de trabajo.
3. La valoración de la situación. En este punto es preciso contar con unos criterios de valoración que permitan la comparación de los mismos con los resultados de la medición y emitir un juicio sobre la situación, es decir, si ésta es segura o si es peligrosa. Tras la valoración, y en función de su resultado, se concretan, si es necesario, las medidas correctoras y preventivas que aseguren que en sucesivas evaluaciones la situación se mantiene segura.

Al aplicar esta metodología a la evaluación de las exposiciones a agentes biológicos, se observan ligeros desajustes. Es cierto que se puede disponer de, o reunir, bastante información sobre los posibles agentes, sus características vitales, ecología, su patogenicidad, mecanismos de transmisión y sobre los focos de contaminación, pero no se debe olvidar que, en muchas actividades, el rasgo que caracteriza la exposición es la incertidumbre sobre la presencia de un agente patógeno. También es cierto que se dispone de equipos para la medición ambiental y de superficies de la contaminación biológica y por lo tanto se pueden conocer los niveles de concentración en la situación estudiada, pero hay que tener en cuenta que los métodos de medición de agentes biológicos presentan una serie de limitaciones que tienen como consecuencia la escasa fiabilidad de los resultados. Estas limitaciones se podrían resumir en la falta de homologación y validación de los métodos disponibles tanto para la toma de muestras como para la detección y análisis de los distintos componentes del bioaerosol.

En cuanto a la valoración, rara vez se podrá efectuar una valoración ambiental cuantitativa semejante a las que se realizan en la evaluación de la exposición a agentes químicos, la razón es que por el momento 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, 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 las siguientes:

- 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 de manera 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 éstas sean.

Por ejemplo, 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 y a la posible presencia de *Legionella* en alguna de las instalaciones.

El primero de los casos 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 por la disponibilidad de los 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.

En el segundo caso, la posible exposición a *Legionella*, 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 parte, 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.

El objetivo de esta nota técnica es analizar uno de los aspectos planteados, la planificación de la medición, que es quizá el que mayores dificultades supone a la hora de establecer la metodología de evaluación de la exposición a agentes biológicos.

## **Medición de agentes biológicos**

Con la medición se persigue determinar la concentración de los agentes contaminantes en un ambiente. Ello implica dos aspectos fundamentales: la toma de muestras y el análisis de las mismas. En cualquier evaluación higiénica la medición de los agentes contaminantes parece una cuestión indiscutible, en muchos casos, es el aspecto de la metodología que proporciona la información básica para la toma de decisiones. Para que esto sea así, se debe tener la garantía de que las mediciones realizadas son representativas de la exposición y fiables. Una buena práctica higiénica permite asegurar que las mediciones de agentes químicos pueden ser representativas y fiables. Otra cuestión es que las mediciones de agentes biológicos cumplan con esos requisitos, para lograrlo hay que tener siempre presente la peculiar naturaleza de estos agentes.

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, es un hecho 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 que 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 finalmente se decide llevar a cabo la medición, ésta debe dar respuesta a una de las diversas cuestiones que deben guiar la planificación de la misma. Esta cuestión, **"por qué hay que medir"**, permite definir el objetivo de la medición.

Una estrategia de muestreo debe dar respuesta, además, a otra serie de cuestiones como son: **"qué"** agentes biológicos de los que componen un bioaerosol se deben medir, **"dónde"** y **"cuándo"** se deben tomar las muestras, **"cómo"**, es decir, con qué recursos se cuenta para realizar la medición y **"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. Cada estudio tendrá sus propias limitaciones por lo que cada técnico responsable deberá decidir, caso por caso, cómo alcanzar sus objetivos sin comprometer la credibilidad, la representatividad y la integridad de los datos obtenidos.

La estrategia de muestreo debe incluir especificaciones sobre: los agentes biológicos que se van a estudiar, los focos de contaminación típicos de los agentes biológicos de consideración, la concentración previsible y la variabilidad en el espacio y en el tiempo para cada agente, los métodos analíticos que se van a utilizar para detectar, cuantificar e identificar los agentes biológicos, y los equipos y métodos más idóneos para la captación de los mismos. A modo de orientación, en el **cuadro 1** se recogen los puntos que se deben tomar en consideración al planificar la medición.

### **CUADRO 1** **Planificación de la medición**

- La naturaleza y los niveles previsible 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.).

### **Objetivo de la medición: ¿Por qué?**

La medición de bioaerosoles se lleva a cabo por tres razones fundamentales: en primer lugar, para dar cumplimiento a los requisitos legales o técnicos que, a menudo, establecen la exigencia de la medición, pero no especifican ni la metodología ni los criterios de valoración que deben ser usados; en segundo lugar, para obtener datos epidemiológicos; y, en tercer lugar, por motivos de interés científico e investigación.

En las investigaciones de la exposición laboral a bioaerosoles y en el análisis de calidad de aire interior, la medición puede ser utilizada para caracterizar (nivel y tipo) la contaminación típica o de fondo y para identificar posibles desviaciones sobre ese fondo.

Otras razones específicas para la medición son: conocer la exposición, localizar focos de contaminación, comprobar la eficacia de las medidas de control y medir la liberación de bioaerosoles, ya sea 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.

### **Naturaleza de los agentes biológicos: ¿Qué?**

Como se ha expuesto anteriormente, los bioaerosoles son mezclas complejas de partículas suspendidas en aire compuestas por o derivadas de los microorganismos, incluyendo: los microorganismos vivos, cultivables y no cultivables, los 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 determinar, a tenor de los posibles efectos para la salud, las distintas formas en que pueden estar presentes. El análisis de la posible composición del bioaerosol determinará qué equipos de muestreo serán precisos; la disponibilidad de técnicas analíticas apropiadas para detectar los componentes del bioaerosol podrá marcar las limitaciones de esta planificación.

### **Dónde y cuándo medir**

En líneas generales, la decisión sobre dónde y cuándo medir dependerá de la necesidad que haya de establecer las exposiciones promedio de los trabajadores o bien de caracterizar la exposición más adversa. En estos casos, además y con fines de comparación, sería necesario conocer los niveles de fondo, es decir establecer la "línea de base" de la contaminación; o conocer los niveles de la situación más favorable, que podrían ser establecidos midiendo en el exterior, en zonas tomadas como control o durante períodos de inactividad. De nuevo, ésta no es una tarea sencilla ni rápida, de manera que la mejor forma de tomar decisiones sobre dónde y cuándo será realizar inspecciones

exhaustivas del centro de trabajo en las que se obtendrá información sobre las actividades específicas que desarrollan los trabajadores, sobre 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 deberían cubrir el rango completo de exposiciones y condiciones. Una forma de lograrlo sería seleccionando los tiempos y puntos de medición aleatoriamente, de manera que todas las personas y períodos de tiempo de trabajo tuvieran la misma probabilidad de ser muestreados.

Una muestra aleatoria es aquella en la que todos los ítems tienen la misma probabilidad de ser seleccionados para el ensayo. La aleatoriedad en la selección de los tiempos, lugares y el orden en que se deben tomar las muestras es fundamental para la representatividad del muestreo. Un método típico para la selección aleatoria de las unidades que deben ser muestreadas, empieza con la asignación de números a todas ellas, por ejemplo: la jornada laboral de 8 horas puede ser dividida en períodos de tiempo de 30 minutos y numerados del 1 al 16. A continuación y utilizando cualquier método disponible, se generan 16 números aleatorios que se asignan a las unidades o períodos establecidos, el siguiente paso consiste en ordenar de menor a mayor esos números sin perder la numeración inicial de los períodos. Esta operación indica el orden en el que se deben escoger los períodos de tiempo para su muestreo. En la **tabla 1** se muestra un ejemplo de lo expuesto.

**TABLA 1**  
**Ejemplo de aplicación para la selección aleatoria de tiempos o lugares de muestreo**

Número de unidad	Número aleatorio	Reordenación de los núm. aleatorios	Orden del muestreo
1	3527	0095	9
2	7001	0398	5
3	6314	0842	12
4	1255	1255	4
5	0398	1438	15
6	9954	2912	10
7	7992	3278	16
8	5130	3527	1
9	0095	3661	11
10	2912	4487	14
11	3661	5130	8
12	0842	6314	3
13	7369	7001	2
14	4487	7369	13
15	1438	7992	7
16	3278	9954	6

Si en la planificación se ha decidido muestrear en seis lugares o períodos, la última columna indica cuales deben ser, en este ejemplo serían: 9, 5, 12, 4, 15 y 10.

La utilización de este método puede no ser siempre aplicable debido a la imposibilidad de identificar los lugares o de determinar con exactitud la duración del tiempo de trabajo, en esos casos, es recomendable optar por un muestreo sistemático, por ejemplo: muestrear los primeros 10 minutos de cada hora de trabajo, habida cuenta que ese período sea representativo del trabajo que se realiza.

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. El

**cuadro 2** se indican algunas de las decisiones que permitirían definir dónde se deberían tomar las muestras.

### **CUADRO 2** **Esquema de decisión 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 promedio, típicamente estos tiempos son 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 serían aquellos que permitieran tiempos de muestreo largos, por ejemplo, los equipos de toma de muestra en filtros, aunque éste no sea el método más recomendable si lo que se está buscando son agentes biológicos vivos y cultivables. Otro sistema sería la toma de muestras secuenciales que cubrieran todo el período de exposición, por ejemplo, los sistemas basados en la impactación de las partículas del bioaerosol en medio de cultivo, de nuevo este método sería parcial, ya que sólo daría información sobre los agentes biológicos vivos y cultivables.

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.

A continuación, en el **cuadro 3**, se expone un ejemplo sobre la planificación del muestreo para evaluar la contribución, que tiene el crecimiento fúngico en un sistema de ventilación, a la presencia de esporas fúngicas en el aire interior.

### CUADRO 3

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

##### 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.

##### 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.

##### Exterior

- En una zona alejada de las fuentes de bioaerosol más obvias. Esto proporciona la línea de base final 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 final que correspondería a la calidad del aire que entra en el edificio.

*NOTA: Se recomienda repetir las series, al menos dos veces en dos o más días. Tomar muestras duplicadas en todos los puntos de muestreo.*

### Selección del equipo de toma de muestras. ¿Cómo?

La selección de uno o varios equipos de medición está directamente ligada a: la naturaleza de los agentes biológicos que se haya decidido medir, el ensayo analítico para su identificación y/o cuantificación y los lugares y períodos en los que se deba tomar la muestra. En el **cuadro 4** se describen los aspectos generales que pueden resultar fundamentales para la selección del equipo o equipos más idóneos para la captación de bioaerosoles. 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.

#### **CUADRO 4** **Selección de un muestreador. Aspectos generales**

- Determinar los agentes biológicos que pueden estar presentes en el ambiente que se está estudiando y cuáles pueden ser de interés con relación a las hipótesis establecidas.
- Determinar que indicadores serán utilizados para medir los agentes biológicos de interés y confirmar que el laboratorio los puede analizar.
- Determinar qué tipo de información será necesaria sobre los agentes biológicos o los indicadores escogidos:
  - Concentración (ufc/m<sup>3</sup>, nº de partículas/m<sup>3</sup> u otras unidades).
  - Identificación de microorganismos específicos (presencia/ausencia, identificación taxonómica, etc.).
  - Concentraciones promedio, concentraciones pico, evaluación de la exposición (muestras personales).
  - Distribución por tamaño de partícula.
- Visitar los lugares escogidos para la toma de muestras e identificar posibles problemas o condicionantes de la medición:
  - La existencia de concentraciones elevadas de bioaerosoles pueden implicar una sobrecarga del soporte de captación, lo que dificultaría o impediría el análisis, a menos que el caudal de aspiración fuera lo suficientemente bajo o el tiempo de muestreo lo suficientemente corto.
  - La existencia de concentraciones bajas de bioaerosoles podría implicar que el material captado es insuficiente para su análisis, a menos que el caudal de aspiración fuera lo suficientemente alto o el tiempo de muestreo lo suficientemente largo.
  - Lugares de trabajo donde se detectan temperaturas extremas. Si la captación de la muestra es por impactación en medio de cultivo, lo aconsejable sería optar por tiempos de muestreo cortos cuando la temperatura fuera elevada, el ambiente muy seco o hiciera mucho frío, ya que esas condiciones pueden provocar la alteración del soporte de captación y en consecuencia de los agentes biológicos captados.
  - En cuanto a la velocidad del aire, es aconsejable tomar en consideración este dato, ya que puede influir tanto en el soporte de captación como en la propia captación de las partículas.
  - Es importante comprobar si hay disponibilidad de conexión a la red eléctrica.
  - De la misma manera, es importante comprobar si pueden existir interferencias entre la toma de muestras y el normal desarrollo de las actividades.
- Revisar la bibliografía para conocer que equipos han sido utilizados para la captación de los agentes biológicos de interés en estudios realizados en ambientes similares.

#### **Número de muestras. ¿Cuántas?**

El número de muestras que se han de tomar, habitualmente está asociado a diversas

consideraciones entre las que se pueden destacar:

- El objetivo de la medición.
- La variabilidad espacial y temporal del parámetro medido.
- Las limitaciones del equipo.
- Los técnicos disponibles para efectuar el estudio. Las mediciones y las diferencias entre conjuntos de muestras son más precisas cuanto mayor sea el tamaño de la muestra, (aquí "tamaño" hace referencia al número de muestras y no al volumen o a la concentración).

La Estadística puede ayudar a los investigadores a calcular el número de muestras que son necesarias para discernir diferencias de magnitud al ser fijados una probabilidad de detección y un nivel de confianza. Pequeñas diferencias, altas probabilidades de detección y niveles de confianza altos requieren de un número elevado de muestras. En la **tabla 2** se resume, a modo de sugerencia, el número de muestras necesario.

**TABLA 2**  
**Número de muestras**

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.

Para caracterizar completamente la exposición puede ser necesario repetir el muestreo durante diferentes estaciones climáticas (este hecho 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. Por ejemplo, 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.

## Volumen y tiempo de muestreo

Uno de los aspectos que mayor relevancia tiene a la hora de seleccionar un equipo de muestreo es la posibilidad de modificar y adaptar los volúmenes de aire muestreados a las necesidades de la medición. El volumen de aire aspirado y el tiempo de muestreo están relacionados por el mínimo volumen de aire necesario para detectar el agente de interés a

una concentración determinada. A su vez, el volumen y el tiempo dependen del caudal de aspiración al que está calibrado el equipo de medición.

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

- La mínima cantidad de material que el método analítico puede detectar, por ejemplo, una unidad formadora de colonia (ufc) 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.

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 el ensayo permite realizar 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, (por ejemplo cuando el resultado del conteo de colonias es el de "incontables") y el solapamiento (por ejemplo: las colonias originadas por 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. Demasiadas colonias (incontables) son difíciles de examinar, 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 calculados para equipos por impactación directa en agar y cultivo de hongos a diferentes tiempos de muestreo**

Equipo de medición	Área de la placa (cm <sup>2</sup> )	Caudal de aspiración (l/min)	Tiempo de captación (min)	Volumen captado (m <sup>3</sup> )	Concentración ambiental (ufc/m <sup>3</sup> )	
					LID (10 ufc/placa)	LSD (1 ufc/cm <sup>2</sup> )
Impactador multiorificio	78	28	0,5	0,014	710	5570
			1,0	0,028	360	2790
			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	3540
			15,0	0,750	10	236
			60,0	3,0	3	59

Esta información permite seleccionar un muestreador, basándose en el caudal de aire, adecuado para efectuar la captación cuando se puede anticipar la posible concentración existente en el ambiente.

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 cual será el rango de concentraciones ambientales que es posible que exista. Por ejemplo, si se considera que la concentración ambiental puede ser de alrededor de 100 ufc/m<sup>3</sup>, los muestreadores adecuados, mostrados en el ejemplo, serían: el impactador multiorificio (28 l/min) y un tiempo de muestreo de 10 min; el impactador multiorificio (90 l/min) y tiempo de muestreo de 1 min o el impactador de rendija (50 l/min) con un tiempo de muestreo de 15 min.

En cambio, si la concentración ambiental previsible fuera de 1.000 ufc/m<sup>3</sup>, los muestreadores adecuados serían: el impactador multiorificio (28 l/min) y un tiempo de muestreo de 1 min y el impactador de rendija (50 l/min) con un tiempo de muestreo de 1 min, mientras que el impactador multiorificio (90 l/min) no sería apropiado, dados su elevado caudal y su baja superficie de captación, ya que la concentración previsible excedería los límites recomendados.

Cuando se desconoce o no se puede anticipar la concentración existente en un ambiente, podría ser necesario realizar mediciones con un tipo de muestreador y diferentes tiempos de muestreo para cubrir los distintos intervalos de concentración.

Algunos autores proponen un sistema para el cálculo del tiempo de muestreo óptimo basado en la siguiente ecuación:

$$t = \delta A / C_a Q$$

t = tiempo de muestreo óptimo (min)

$d$  = densidad deseada (ufc/cm<sup>2</sup>)

$A$  = área de captación (cm<sup>2</sup>)

$C_a$  = concentración ambiental previsible (ufc/m<sup>3</sup>)

$Q$  = caudal de aspiración del muestreador (l/min)

## Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire (UNE-EN 13098)

En mayo de 2001 se adopta como norma española (UNE) la norma europea EN 13098, "Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire". Como indica su título, 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.

Esta norma hace referencia a los distintos tipos de agentes biológicos y sus propiedades biológicas, a la necesidad de fijar los objetivos de la medición y a la necesidad de tomar en consideración las distintas opciones existentes para la completa valoración de la exposición a bioaerosoles, por ejemplo: el número total de células microbianas, el número de células microbianas y agregados cultivados, componentes estructurales (endotoxinas y glucanos), metabolitos primarios como el ATP (Adenosín trifosfato), o los metabolitos secundarios entre los que se pueden destacar las micotoxinas. En este apartado, se hace especial referencia a la incertidumbre de la medida indicando que ésta proviene del método de muestreo y análisis que deberían estar validados y su reproducibilidad definida, aunque reconoce que la validación de los métodos de medición de microorganismos está limitada por la falta de materiales y/o métodos de referencia.

Otro aspecto de interés es la alerta sobre la variabilidad del nivel de exposición indicando que ésta es muy elevada. En un nota se dice que no son infrecuentes desviaciones típicas geométricas del orden de 4 a 6 para una medida hecha durante 8 horas, lo que puede significar, por ejemplo, que si una media geométrica es de  $4 \times 10^5$  microorganismos/m<sup>3</sup> de aire y su desviación típica geométrica es de 5 para un nivel de confianza del 95%, el valor de la medida estará comprendido entre  $1,6 \times 10^4$  y  $10^7$  microorganismos/m<sup>3</sup> de aire.

### Muestreo

Sobre el muestreo indica que éste debe realizarse de acuerdo con los mismos principios que los utilizados para la evaluación de la exposición de los trabajadores a otras sustancias peligrosas para la salud. Recomienda efectuar varias medidas siguiendo una estrategia específica remitiendo, para ello, a la norma UNE-EN 689 de marzo de 1996 "Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la evaluación de la exposición por inhalación de agentes químicos para la comparación con los valores límite y estrategia de muestreo."

Con respecto a los equipos de medición, señala las tres categorías principales basadas en los principios de captación: impactación sobre superficie sólida o semi-sólida, borboteo en líquido y filtración. Asimismo, recoge en un anexo informativo, los principales equipos de toma de muestra, sus ventajas y limitaciones. La norma indica también cuáles deben ser

los requisitos del muestreador que, además de adecuarse al objetivo de la medición y ser compatible con los requisitos analíticos, se resumen en los siguientes:

- Una eficacia total de muestreo conocida y documentada.
- La eficacia física del muestreo, es decir, la capacidad del muestreador para captar las partículas de un tamaño determinado suspendidas en el aire en el lugar de trabajo, debe ser conocida y estar documentada y relacionada con el diámetro aerodinámico de las partículas captadas.
- El muestreador debería ser capaz de captar fracciones determinadas del aerosol, como está establecido en la norma UNE-EN 481 de enero de 1995 "Atmósferas en el lugar de trabajo. Definición de las fracciones por el tamaño de las partículas para la medición de aerosoles."
- Para el cálculo del número de microorganismos viables y cultivables, el muestreador debe ensayarse con los correspondientes microorganismos para establecer la eficacia de conservación biológica, es decir, la capacidad de un muestreador para mantener la viabilidad de los microorganismos en el aire durante la captación y, además, conservar intactos los productos microbio lógicos.

Para la obtención de valores de concentración de microorganismos y endotoxinas que sean comparables y seguros, recomienda documentar debidamente las operaciones de muestreo, indicando que la documentación debe incluir, al menos, los siguientes parámetros:

- Nombre de la organización y de la persona que hace el análisis.
- Fecha del muestreo.
- Código de identificación único para la muestra.
- Nombre y dirección de la empresa donde se ha muestreado, o un identificador único para garantizar la confidencialidad.
- Localización del muestreo.
- Tipo y nombre del muestreador y tipo y nombre del substrato de captación empleado, incluyendo el volumen del medio de captación líquido.
- Tipo de muestreo: individual (personal) o estático (ambiental).
- Localización del equipo de muestreo.
- Localización de la entrada de la muestra y la orientación relativa al movimiento del aire.
- El comienzo y el final del muestreo y su duración.
- El caudal del muestreador (l/min).
- El volumen muestreado.

- La fracción de tamaño de partícula muestreada.
- Las condiciones de almacenamiento de la muestra y transporte.
- Las condiciones ambientales (temperatura, humedad, clima exterior).
- Propósito del muestreo.
- Otras observaciones.

## Análisis

Sobre los métodos analíticos, la norma requiere que éstos estén suficientemente documentados, sobre todo en lo que hace referencia: al procedimiento, límite de detección, precisión, sesgo y las limitaciones que pueda presentar. En cuanto a la validación del método, el procedimiento debe cumplir los requisitos dados en la norma UNE-EN 482 de noviembre de 1995, "Atmósferas en el lugar de trabajo. Requisitos generales relativos al funcionamiento de los procedimientos para la medición de agentes químicos." En la **tabla 4** se recogen los requisitos de documentación en función del tipo de análisis. La tabla está estructurada en tres columnas y su lectura se debe realizar de izquierda a derecha de modo que en la primera columna se detallan los requisitos generales comunes a todo método analítico, en la segunda, las particulares del método y, en la tercera, los requisitos de las manipulaciones posteriores de la muestra si fueran necesarias.

**TABLA 4**  
**Documentación del análisis**

<b>General</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La fecha y el inicio del análisis.</li> <li>• El nombre del laboratorio y de la persona que hace el análisis.</li> <li>• El origen de la muestra analizada.</li> <li>• Las condiciones de almacenamiento en el laboratorio.</li> <li>• Las características del método analítico empleado con la referencia a los procedimientos normalizados documentados.</li> <li>• Toda desviación del método empleado rutinariamente y su causa.</li> </ul>	<p><i>Muestras recogidas en un líquido</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El soporte de captación</li> <li>• Las características del medio de dilución y su volumen.</li> <li>• El volumen y modo de inoculación sobre o dentro de un medio semi-sólido.</li> </ul>
	<p><b>Cultivo en medio semi-sólido</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El tipo del medio de cultivo.</li> <li>• Las condiciones de incubación.</li> <li>• El tiempo de incubación.</li> </ul> <p><i>Muestras recogidas sobre filtros</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El tipo de filtro.</li> <li>• La forma de hacer la suspensión.</li> <li>• El volumen de suspensión y el líquido de dilución.</li> <li>• El volumen y el modo de inoculación.</li> </ul>
	<p><b>Microscopio óptico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El líquido de suspensión.</li> <li>• El líquido de dilución.</li> <li>• El modo de tinción.</li> <li>• Los factores del microscopio.</li> <li>• El procedimiento detallado si se usa cámara de conteo.</li> </ul>
	<p><b>Microscopio electrónico de barrido</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El material de cobertura.</li> <li>• Los factores del microscopio.</li> </ul>
	<p><b>Análisis de endotoxinas (*)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El tipo de filtro.</li> <li>• El procedimiento y el aparato de extracción.</li> </ul>

- El volumen y el tipo de extracción.
- El líquido de dilución.
- El método analítico.
- El patrón de referencia.

(\*) Esta documentación también se requiere para el análisis de otros componentes celulares y metabolitos.

- *Determinación del número total, procedimiento y precisión*

El número total de microorganismos se obtiene por un método microscópico o por un método analítico que permita determinar tanto microorganismos viables como no viables. La precisión de un conteo microscópico, próximo al límite de detección, se determina principalmente aplicando la varianza de Poisson. El menor límite de detección posible se obtiene cuando el blanco es cero. En este caso, el límite de detección es 3 y 7 con una probabilidad del 95% y del 99,9%, respectivamente, de obtener un valor superior a cero. El límite de detección de una medida depende de la fracción del filtro observada, del volumen de aire muestreado y de la presencia de agregados. Éstos últimos tienen un efecto importante en la precisión, se necesita contar de 200 a 1.000 microorganismos para obtener una precisión del 10%.

En los métodos por microscopía óptica o la de epifluorescencia es conveniente realizar el conteo sobre, al menos 50 campos o 400 microorganismos. Los campos se pueden escoger de forma aleatoria o distribuidos regularmente en el filtro. Para el conteo se utilizará una retícula de ocular calibrada.

- *Determinación de la fracción cultivable, procedimiento y precisión*

La exactitud del análisis de cultivos es escasamente conocida. Las colonias de crecimiento desmesurado pueden englobar a otras; por lo tanto es conveniente, en general, descartar las placas de agar donde exista una colonia que cubra más de la mitad del área de conteo. La exactitud del conteo también puede verse afectada cuando el número de colonias en el área es muy elevado o no están bien separadas. Los valores del coeficiente de variación están comprendidos entre un 20% y un 50% para la precisión global de los métodos de cultivo. Una parte de la pérdida de la precisión se debe a errores en el conteo de los números bajos, por ejemplo: el coeficiente de variación del conteo de 25 colonias es del 20%. Para una placa de agar la densidad de colonias de bacterias es adecuada cuando hay menos que 5 colonias/cm<sup>2</sup> y para los hongos, cuando hay menos que 2 colonias/cm<sup>2</sup>.

El conteo de colonias en las placas de los muestreadores por impactación a través de múltiples orificios debe ajustarse para tener en cuenta el muestreo coincidente, es decir, la probabilidad de que varias colonias formen parte de la misma unidad de conteo al haberse depositado en un punto tras pasar por el mismo orificio. Para hacer este ajuste se dispone de tablas de conversión y fórmulas.

## Bibliografía

1. **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.
2. **Orden de 25 de marzo de 1998** por la que se adapta en función del progreso técnico el **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.

3. **Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.**
4. **Directiva 2000/54/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (Séptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391 /CEE).
5. Ley 15/1994, de 3 de junio, por la que se establece el Régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, a fin de prevenir los riesgos para la salud humana y para el medio ambiente.
6. Real Decreto 951/1997, de 20 de junio, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 15/1994, de 3 de junio, por la que se establece el Régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, a fin de prevenir los riesgos para la salud humana y el medio ambiente.
7. 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.
8. UNE-EN 13098 de mayo de 2001, Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas suspendidas en el aire.
9. 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.
10. UNE-EN 482 de noviembre de 1995, Atmósferas en el lugar de trabajo. Requisitos generales relativos al funcionamiento de los procedimientos para la medición de agentes químicos.
11. 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.
12. INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO.  
**Higiene Industrial, 2ª ed.**  
*Madrid, INSHT, 2002.*
13. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH)  
**Bioaerosols. Assessment and control**  
*ACGIH, Cincinnati, OH, USA, 1999.*
14. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS  
**Threshold limit values for chemical and physical Agentes. & Biological exposure indices**  
*ACGIH, Cincinnati, OH, USA, 2002.*