



Documentación

NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I)

Agents Biologiques: Équipes de Prélèvement (I)
Biological Agents: Bioaerosols Samplers (I)

Redactora:

Ana Hernández Calleja
Lda en Ciencias biológicas

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

En esta nota técnica de prevención, que forma parte de la serie dedicada a la medición de agentes biológicos, se describen los requisitos que deben cumplir los distintos equipos de toma de muestras de agentes biológicos. Asimismo, se describen los diferentes principios de captación de partículas y las principales características de los equipos de muestreo más frecuentemente utilizados.

Introducción

El desarrollo de todo estudio sobre la exposición a los agentes biológicos pasa por una serie de etapas las cuales se concretan en la formulación de una hipótesis sobre la posibilidad de la exposición y sus consecuencias, y la comprobación de esa hipótesis. A menudo, para la comprobación de la hipótesis se hace necesario efectuar la medición de los agentes biológicos que pudieran estar presentes en un ambiente.

La medición de los agentes biológicos no es un proceso sencillo, la propia naturaleza de los agentes biológicos, son seres vivos, y sus requerimientos vitales, condicionan la medición que deberá ser planificada cuidadosamente. De la cadena de cuestiones que deben ser respondidas: por qué hay que medir; qué tipos de agentes biológicos se van a medir; dónde, cuándo y cuántas muestras se deben tomar para obtener resultados representativos y, por último, cómo se van a medir, es, quizá, esta última cuestión una de las que mayor importancia reviste.

Buena parte de los equipos disponibles para el muestreo de bioaerosoles son derivaciones y modificaciones de los utilizados para la captación de agentes químicos, esas modificaciones consisten, no tanto en los principios de funcionamiento, como en los soportes de captación que deben adaptarse a las características de los agentes biológicos.

El principal condicionante de los soportes de captación, cuando se trata de captar microorganismos vivos y cultivables, es que el material en el que se recogen las partículas de bioaerosol permita la supervivencia de los mismos hasta que sean analizados en el laboratorio. Los requisitos que debe reunir un soporte de captación son los siguientes: deben proporcionar alimento y agua y estar constituidos de un material que no dañe a las células durante la captación. Estos requisitos los reúnen los 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 definirán las propiedades del medio de cultivo. Los medios de cultivo son la base de los ensayos

analíticos utilizados para la identificación de las especies microbianas.

Cuando lo que se trata de captar son formas resistentes (esporas, granos de polen, etc.) o productos (endotoxinas, micotoxinas, glucanos, etc.), el soporte de captación más frecuentemente utilizado es el filtro; en estos casos los agentes captados son materia inerte o están suficientemente preparados para sobrevivir en unas condiciones adversas.

Esta nota técnica trata de revisar, por una parte, los principios de captación de agentes biológicos y, por otra, los equipos de muestreo más frecuentemente utilizados, así como, sus características de funcionamiento.

Eficacia del muestreo

La física de la captación de partículas suspendidas en el aire y los principios generales para una buena toma de muestras son aplicables a todo tipo de materia con independencia de si es de origen biológico o no. No obstante, muchos de estos principios básicos requieren de una adaptación cuando el material que se trata de muestrear es un bioaerosol.

Un requisito imprescindible de todos los muestreadores de aerosoles es que deben tener una eficacia del muestreo conocida y documentada, capaz de muestrear, por ejemplo, la totalidad de microorganismos, los microorganismos viables o los componentes microbianos. La eficacia de muestreo está determinada por el diseño de elementos tales como: el dispositivo de entrada de aire al equipo, y la zona de captación, así como, el propio soporte de captación. En la captación de algunos de los componentes del bioaerosol (microorganismos viables y cultivables) estos aspectos adquieren mayor relevancia y se concretan en un aspecto, que es la eficacia de conservación biológica.

La norma UNE-EN 13098 de mayo de 2001 "Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire", define estos aspectos de la siguiente forma:

- Eficacia total del muestreo (ETM): producto de la eficacia física del muestreo y la eficacia de conservación biológica.
- Eficacia física del muestreo (EFM): capacidad del muestreador para captar las partículas de un tamaño determinado que se encuentran suspendidas en el aire en el lugar de trabajo.
- Eficacia de conservación biológica (ECB): la capacidad de un muestreador para mantener la viabilidad de los microorganismos presentes en el aire durante la captación y, además, conservar intactos los productos microbio lógicos.

La eficacia total del muestreo (ETM) puede dividirse en la eficacia física del muestreo (EFM) y la eficacia de conservación biológica (ECB). La eficacia total del muestreo es el producto de ambos términos:

$$ETM = EFM * ECB$$

A su vez, la eficacia física del muestreo puede expresarse en función de la eficacia de la entrada del aire (EEA), la eficacia de la zona de captación (EZC) y de las pérdidas en otros elementos del equipo (PE), según la siguiente ecuación:

$$EFM = EEA * (1 - PE) * EZC$$

Habitualmente, la eficacia de la zona de captación se expresa como el diámetro aerodinámico de corte (d_{ae50} = el tamaño de partícula al que la mitad de partículas serán captadas).

Eficacia de la entrada de aire (EEA)

Es la medida de la habilidad del dispositivo de entrada del aire para introducir las partículas del aire al interior de un muestreador sin producir sesgos en cuanto al tamaño de la partícula, su forma o a su comportamiento aerodinámico. Esta habilidad está condicionada por una serie de factores tales como: el tamaño de la partícula (diámetro), su densidad y forma, la velocidad del aire en el frontal del equipo, el diseño del dispositivo de entrada del aire, su orientación y la velocidad del aire.

Cuando la velocidad del aire es baja, como por ejemplo en ambientes interiores, la entrada del aire del muestreador puede orientarse en cualquier posición relativa a la gravedad o a la dirección principal del movimiento del aire sin comprometer la representatividad de las partículas captadas; sin embargo, cuando el muestreo se ha de realizar en una corriente de aire (conductos de ventilación, difusores, etc.), la entrada de aire del muestreador debería ser orientada de forma isoaxial, es decir, el flujo de aire captado debe estar alineado con el movimiento de la corriente de aire. Se dice que el muestreo es isocinético cuando es isoaxial y la velocidad media del aire que atraviesa la entrada del muestreador es igual a la velocidad de la corriente de aire. La medición de la eficacia de la entrada del aire de un muestreador debe ser realizada en un túnel de viento.

Diferentes estudios realizados para determinar este parámetro revelan que, en determinadas condiciones de muestreo, la concentración de bioaerosol puede ser significativamente sobre o infravalorada, fundamentalmente debido al diseño de la entrada y a la orientación de la misma.

Eficacia de la zona de captación (EZC)

Es la medida de la habilidad de un muestreador para separar las partículas del flujo de aire aspirado y depositarlas en el soporte de captación. Un aspecto crítico para la representatividad de la muestra es que se produzca la mínima pérdida de partículas posible, ya sea por que éstas quedan retenidas en las paredes del equipo o por que rebotan sobre los soportes de captación y vuelven al aire. Un buen diseño del equipo puede minimizar estos aspectos, principalmente reduciendo la distancia y el tiempo entre la entrada del aire y el soporte de captación.

Eficacia de conservación biológica (ECB)

Como se deduce de la definición expresada en la introducción del apartado, la eficacia de la conservación biológica es una medida de la capacidad del muestreador de preservar hasta el análisis de las muestras las características esenciales de los agentes biológicos captados, ya sean éstas su viabilidad, actividad biológica o integridad física. Existen factores como son: la radiación, la sequedad, el calor o el frío, los gases tóxicos, o el estrés mecánico durante el muestreo, entre otros, que pueden afectar a la viabilidad de los microorganismos. El grado de afectación depende, en ocasiones, de en que forma está presente el microorganismo, por ejemplo, las esporas bacterianas son más resistentes que las formas vegetativas, esto es lógico si se tiene en cuenta que las esporas son formas de vida preparadas para resistir largos períodos de tiempo condiciones de vida adversa. Los

estudios realizados por algunos autores revelan que las diferentes velocidades de aire usadas por diversos muestreadores pueden tener como consecuencia daños estructurales o metabólicos en los microorganismos.

Estos aspectos también tienen importancia aún cuando los ensayos analíticos no están basados en la viabilidad de los microorganismos, ya que las muestras captadas deben retener su actividad biológica y su integridad física durante la captación, transporte y almacenamiento. Por ejemplo, la integridad física es vital en la observación al microscopio, puesto que ésta se realiza reconociendo elementos claves de su morfología.

Con los métodos disponibles en la actualidad no es posible determinar la eficacia de conservación biológica de un muestreador, el principal motivo es que en los ensayos ideados para su estimación, no existe forma de diferenciar entre cuántos microorganismos han muerto durante la generación del aerosol, cuántos durante la fase aerosol y cuántos durante la captación. No obstante, se han llevado a cabo intentos para establecer ese parámetro a través del estudio de la supervivencia de los microorganismos. Existen cuatro tendencias que se exponen a continuación:

1. La supervivencia (S) se expresa como el número de microorganismos viables captados (N_{vc}) por el muestreador de ensayo.

$$S = N$$

2. La supervivencia relativa (S_{rel}) establecida a partir de la comparación entre el número de microorganismos viables captados por el equipo ensayado con el número de microorganismos viables captados por un muestreador de referencia (N_{vc-ref}).

$$S_{rel} = N_{vc}/N_{vc-ref}$$

3. La eficacia de supervivencia (S_{ef}) establecida a partir de la comparación entre el número de microorganismos viables (N_{vc}) captados por el equipo ensayado y el número total de microorganismos captados (N_{tot}).

$$S_{ef} = N_{vc}/N_{tot}$$

4. La eficacia de supervivencia relativa (S_{ef-rel}) establecida al comparar las eficacias de supervivencia del muestreador de ensayo y el usado de referencia.

$$S_{ef-rel} = (N_{vc}/N_{tot})/(N_{vc}/N_{tot})_{ref}$$

En opinión de los expertos, la mejor forma de expresar la eficacia de conservación biológica es utilizar este último método para determinar la eficacia de supervivencia relativa.

Procedimientos de ensayo de los muestreadores

En la norma UNE-EN 13098 se recogen los principios básicos que permitirán orientar la evaluación de la exposición laboral a microorganismos. Entre otros aspectos, esta norma hace referencia a la necesidad de minimizar los errores en la medición, debidos principalmente a las limitaciones de los equipos de muestreo y a las técnicas analíticas,

señalando los criterios para la correcta caracterización de los equipos de muestreo. En primer lugar, recoge la necesidad de conocer la eficacia física del muestreo, para ello se pueden utilizar métodos de ensayo normalizados y aerosoles no biológicos. En segundo lugar, recomienda que la determinación de la eficacia de conservación biológica sea realizada con relación a un muestreador de referencia.

Para la estimación de la eficacia física del muestreo se han venido utilizado dos tipos de ensayos: los llevados a cabo en ambientes naturales, en los que el aerosol de prueba era la flora microbiana existente en el ambiente, y los realizados en el laboratorio, en estos últimos, el aerosol se genera, acondiciona y almacena en una cámara hasta que se procede a la toma de muestras con el equipo que se va a ensayar y con otro equipo usado como muestreador de referencia.

Los aerosoles utilizados en estos ensayos consisten en: partículas no viables, por ejemplo: partículas de látex o partículas de colorantes; y distintos tipos de microorganismos (*Serratia marsescens*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*).

Las cámaras son de tres tipos: estáticas, dinámicas y túneles de viento. Las dos primeras se utilizan para determinar la eficacia de la zona de captación (EZC) y las pérdidas del equipo (PE), mientras que la determinación de la eficacia de la entrada de aire (EEA) se determina en un túnel de viento.

Principios de captación ambiental

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); equipos de toma de muestra con filtro y otros equipos.

Impactación inercial

La inercia de las partículas es la fuerza que mayoritariamente interviene en la separación de las mismas del aire. La inercia de una partícula está determinada por su masa y su velocidad. 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 que puede ser un sólido o un líquido. En la **figura 1** se muestra esquemas de cómo ocurre la impactación de las partículas sobre diferentes medios.

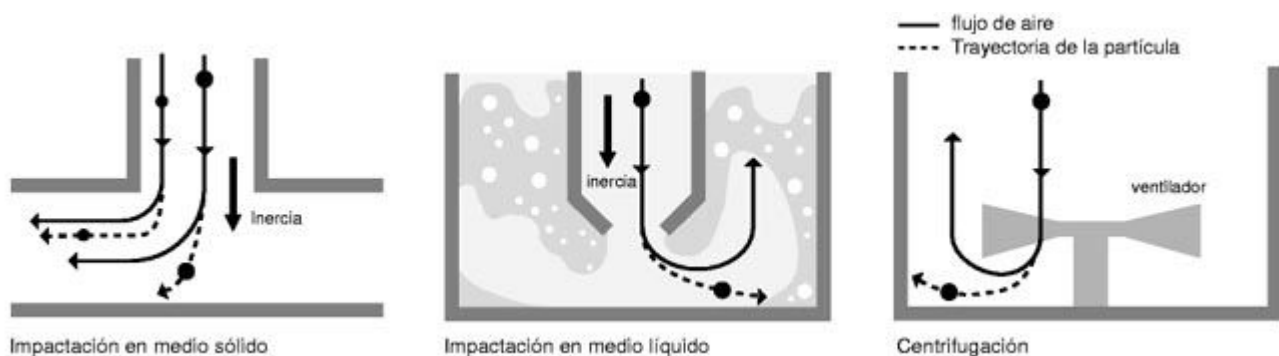
Asimismo, el diseño del equipo, la forma y dimensiones del dispositivo de entrada del aire y la distancia que debe recorrer el aire dentro del equipo hasta la superficie de impactación, son aspectos que determinarán las características de la captación, entre ellos se pueden destacar:

- La zona de impactación, o zona en la que la partícula puede ser desviada significativamente de su trayectoria original. La predicción de esa zona se basa en la forma, en la anchura del orificio de entrada del aire en el equipo y en la distancia que hay hasta la superficie de impactación.
- La distancia de frenado determina la desaceleración y captación de una partícula en la zona de impactación. Para cada línea de flujo sobre una zona de impactación hay una distancia de frenado para la cual todas las partículas mayores que un cierto

diámetro serán captadas, mientras que las de tamaño inferior pueden atravesar el equipo sin ser retenidas.

- El diámetro de corte del equipo (d_{50}) designa el tamaño de partícula al que la mitad de partículas serán captadas y la mitad pasarán a través del equipo. En general, se asume que el diámetro de corte es el diámetro por encima del cual todas las partículas son captadas. Para describir mejor el comportamiento de las partículas que pueden variar en forma y densidad se utiliza el "diámetro aerodinámico de la partícula" (d_{ae}) y que se define como el diámetro de una partícula esférica de densidad 1 g/cm^3 que tiene la misma velocidad de sedimentación que la partícula en cuestión.
- Otros aspectos que determinan la captación son la posibilidad de que la partícula rebote o se escape de la superficie de captación. En ambos casos, la energía acumulada por la partícula durante el impacto o las fuerzas de arrastre son superiores a las fuerzas de adhesión del medio.

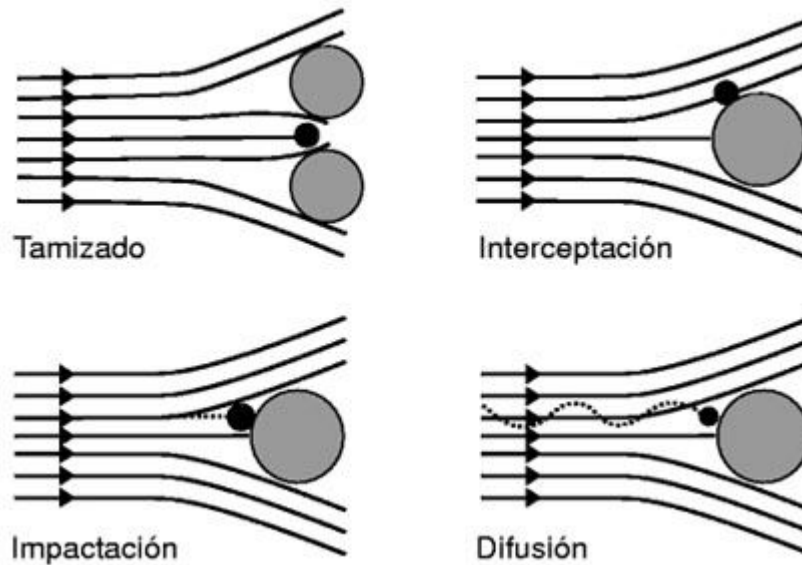
FIGURA 1
Separación de partículas por impactación



Filtración

Por filtración se entiende la captación de las partículas suspendidas en el aire al quedar retenidas en un material poroso cuando el aire lo atraviesa. 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. Dependiendo de esas características se pueden distinguir cuatro principios de captación de partículas: tamizado, interceptación, impactación y difusión. En la **figura 2** se muestran los mecanismos de captación de partículas durante los procesos de filtración.

Figura 2
Mecanismos de captación de partículas en la filtración



La captación por tamizado ocurre cuando el diámetro de la partícula es mayor que el tamaño del poro que forman las fibras del filtro. En la captación por impactación, la inercia, ligada a la masa y la velocidad de la partícula, es lo que fuerza la separación de las partículas de sus líneas de flujo de aire cuando éstas se dividen al chocar con las fibras del filtro. La interceptación ocurre cuando las partículas de pequeño tamaño, que siguen las líneas de flujo de aire tras dividirse al chocar con las fibras, pasan lo suficientemente cerca de éstas para ser atraídas o retenidas por ellas debido a su carga electrostática, entre otros factores. En la captación por difusión, las partículas más pequeñas suspendidas en el aire tienen un comportamiento similar al de las moléculas, es decir, siguen las leyes del movimiento Browniano, la retención ocurre cuando estas partículas chocan con las fibras por azar.

Equipos de muestreo

Impactadores

- *Muestreador de rendija*

En estos muestreadores 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 que consiste 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; los portaobjetos y las cintas, permiten la observación directa al microscopio de las partículas captadas. Estos soportes de captación pueden estar estáticos o colocados sobre un soporte giratorio dotado de distintas velocidades. Al disponer de un único nivel de captación no se obtiene información sobre la distribución por tamaño de partícula. Este equipo tiene un diámetro aerodinámico de corte (d_{ae50}) calculado de 0,67 μm . En la **figura 3** se muestra un esquema de este tipo de muestreador.

FIGURA 3
Esquema de un muestreador de rendija

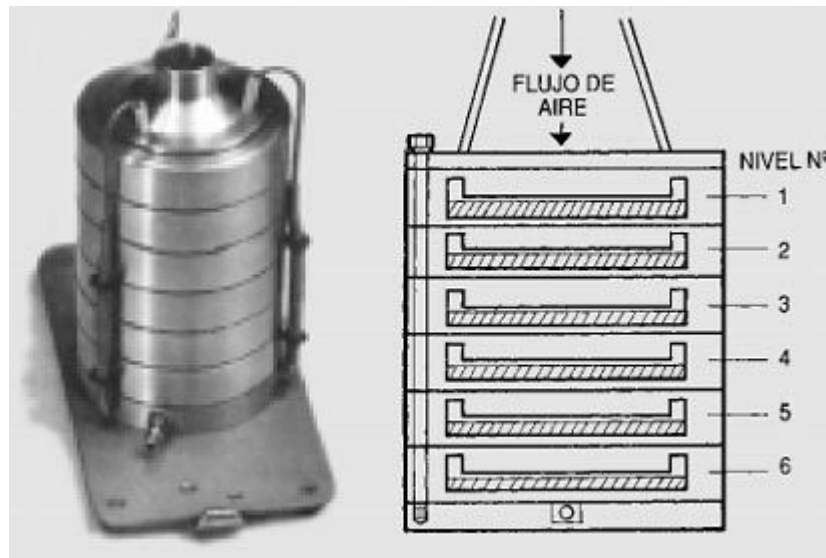


- *Muestreador Andersen*

Este muestreador 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. En general, este impactador tiene seis niveles de captación, cada nivel está separado del siguiente por un elemento perforado por 400 orificios, debajo de cual se coloca la placa con medio de cultivo, en cada nivel todos los orificios tienen el mismo diámetro, pero de un nivel al siguiente disminuye el tamaño del diámetro de los orificios, 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, en el primer nivel se separan las partículas de mayor tamaño; las de menor tamaño, cuya inercia no es lo suficientemente grande, son arrastradas por la corriente de aire que pasa al siguiente nivel, al aumentar la velocidad también aumenta la inercia de las partículas arrastradas, algunas serán captadas en el segundo nivel mientras que otras seguirán en el aire pasando al tercer nivel, y así sucesivamente. El resultado final es una separación por tamaño de partícula. Los diámetros de corte teóricos para cada uno de los niveles son, del nivel 1 al nivel 6, respectivamente: 7 μm , 4,7 μm , 3,4 μm , 2,1 μm , 1,1 μm y 0,65 μm .

Otros modelos de este equipo se presentan con uno o dos niveles de captación. El modelo con un solo nivel dispone de un placa perforada (400 orificios), su caudal de aire es de 28,3 l/min y el diámetro de corte teórico es de 0,65 μm . En el modelo con dos niveles, las placas perforadas disponen de 200 orificios, un caudal de aire de 28,3 l/min y unos diámetros de corte teóricos de 8,0 μm y 0,95 μm respectivamente. 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 muestra un esquema de este muestreador.

FIGURA 4
Muestreador Andersen (6 niveles)



- *Muestreadores multiorificio*

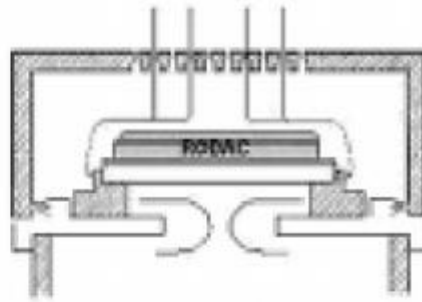
El muestreador SAS (Surface air system) es un equipo portátil con un único nivel de captación basada, asimismo, en la inercia de las partículas. La captación de las partículas tiene lugar en una placa RODAC con medio de cultivo. Existen dos modelos calibrados a dos caudales de aire (90 l/min y 180 l/min). 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).

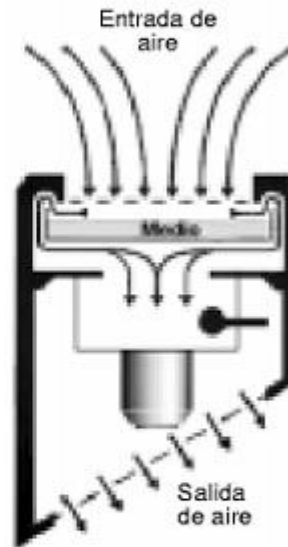
FIGURA 5
Muestreadores multiorificio



SAS Compact



MAS - 100



M air T

- *Frascos borboteadores (Impingers)*

Los frascos borboteadores o impingers 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. 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.

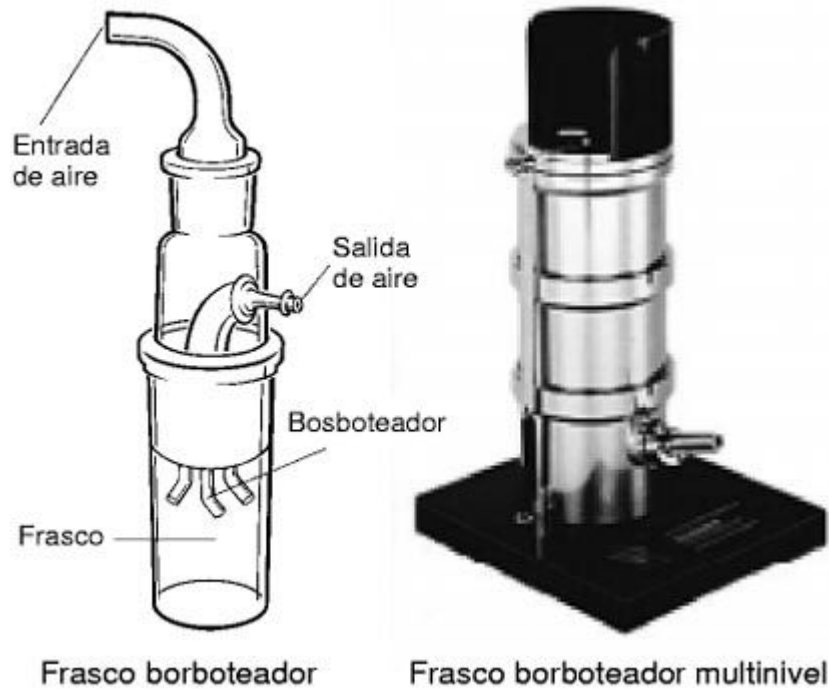
El volumen de líquido con el que habitualmente trabajan estos equipos oscila entre 15 ml y 20 ml. Este volumen puede verse reducido por la evaporación, lo que tiene como consecuencia una modificación de la concentración de sales que podría afectar la supervivencia de los microorganismos capturados. La cantidad de líquido evaporado depende del grado de humedad del aire aspirado y de la duración del muestreo.

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. Por ejemplo: con el líquido muestreado se pueden inocular diferentes placas con medios de cultivo distintos, su incubación a diferentes temperaturas facilitará los trabajos de identificación de los agentes biológicos vivos y cultivables del bioaerosol. La agitación del líquido permite disgregar los agregados de partículas evitando así que las colonias crezcan de forma solapada. Las muestras obtenidas permiten el recuento del número total de partículas. 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, estos 30 mm permiten reducir el estrés físico de los microorganismos capturados. El diámetro de corte calculado es de 0,3 μm , 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, respectivamente: 1 μm , 4 μm y 10 μm , el equipo trabaja a caudales de aire de 20 y 55 l/min.

Tradicionalmente estos muestreadores se fabricaban en vidrio, pero las imprecisiones en su construcción afectaban a la eficiencia de captación dificultando los estudios de intercomparación, más recientemente y para evitar estos problemas, estos equipos se fabrican en acero inoxidable. En la **figura 6** se muestra un esquema de estos muestreadores.

FIGURA 6 **Frascos borboteadores**

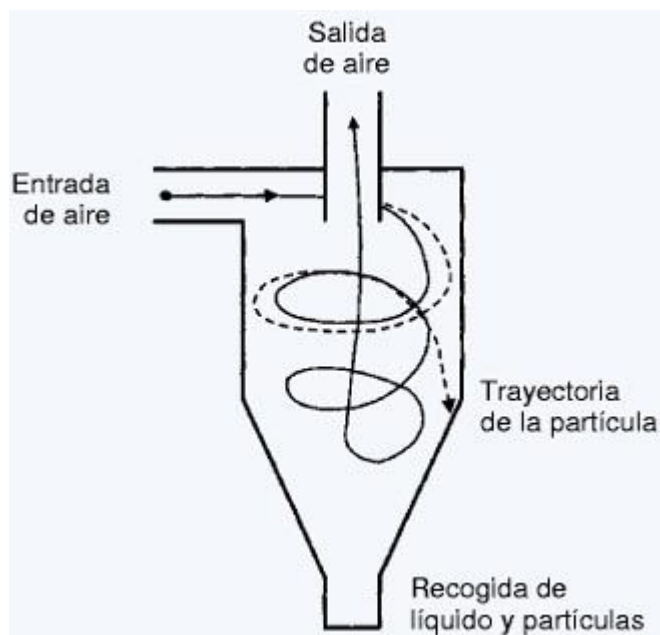


Muestreadores centrífugos

- *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 7** se muestra un esquema de estos muestreadores.

FIGURA 7
Esquema de un ciclón



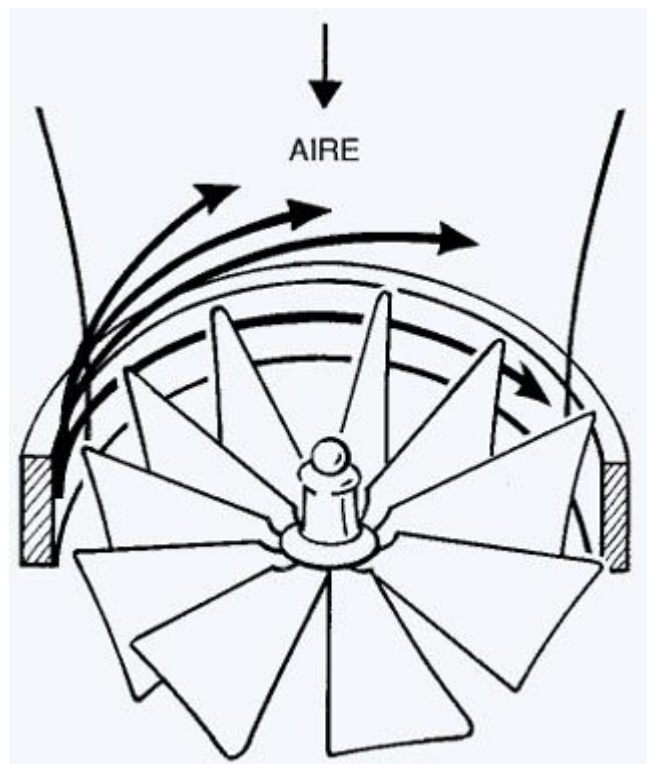
- **Muestreador RCS (Reuter Centrifugal Sampler)**

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 de este equipo 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 éste es aspirado desde una distancia de 40 cm y el aire expulsado lo hace rodeando 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 8 se muestra un esquema de este muestreador.

FIGURA 8
Esquema de un muestreador RCS



Equipo de toma de muestra con filtro

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 (esporas, 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, 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 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.

- *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 filtros 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, por otra parte, este hecho también facilita el lavado del filtro y la recuperación de la muestra para su análisis.

- *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 $0,3 \mu\text{m}$ es $\geq 95\%$ en filtros de membrana con tamaño de poro de $0,5 \mu\text{m}$.

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 ésteres 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.

Muestreo de materiales y superficies

Esta técnica tiene un interés especial puesto que permite determinar la posible contaminación por agentes biológicos de las materias primas, del polvo, 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, de líquidos o del polvo es necesario, puesto que la simple medición ambiental puede, en ocasiones, dar como resultado la inexistencia de contaminación microbiológica, es decir, proporcionar falsos negativos. Este tipo de mediciones son importantes ya que permiten identificar los focos de contaminación que es

uno de los objetivos fundamentales 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 esas 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 del 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, éstos se pueden dividir en: ensayos basados en el cultivo de las muestras, para detectar microorganismos viables y cultivables, y en ensayos no basados en el cultivo, por ejemplo: examen al microscopio, inmunoensayos, etc.

De los métodos expuestos, el muestreo de superficies es uno de los que más ampliamente se utiliza, entre otras razones, por que 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.

Frotis de superficies

Este método consiste en la recogida del material depositado en las superficies con torundas estériles de algodón o gasas. 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.

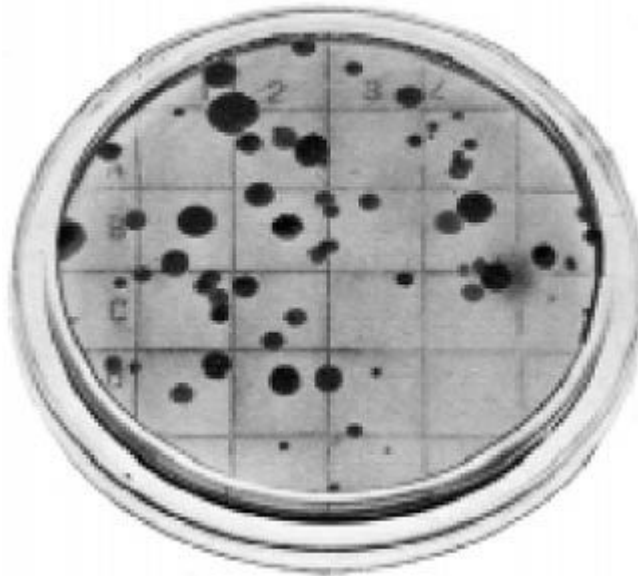
Muestreo por contacto

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.

- *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 9** se muestra una placa RODAC y las colonias crecidas.

FIGURA 9
Placas de contacto RODAC para el muestreo de superficies



- *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.

Bibliografía

1. 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.
2. UNE-EN 1232-1997, Atmósferas en el lugar de trabajo. Bombas para el muestreo personal de los agentes químicos. Requisitos y métodos de ensayo.
3. UNE-EN 12919-2000, Atmósferas en el lugar de trabajo. Bombas para el muestreo de los agentes químicos con un caudal volumétrico superior a 5 l/min. Requisitos y métodos de ensayo.
4. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH)
Bioaerosols. Assessment and control
ACGIH, Cincinnati, OH, USA, 1999.
5. AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION
Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples
AIHA, Fairfax, VA, USA, 1996.
6. XUNTA DE GALICIA
Riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos: su evaluación y

control.

Xunta de Galicia, Centro de Seguridad e Higiene en el Trabajo Pontevedra, 2001.

7. INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO
Higiene Industrial.
INSHT, Madrid, 2002.
8. GRIFFITHS, W. D. and DE COSENO, G. A. L.
The assessment of bioaerosols: a critical review.
J. Aerosol. Sci. 25 (8) págs.: 1425 - 1458, 1994.
9. HENNINGSON, E. W. and AHLBERG, M. S.
Evaluation of microbiological aerosol samplers: a review.
J. Aerosol. Sci. 25 (8) págs.: 1459 - 1492, 1994.
10. CROOK, B.
Review: Methods of monitoring for process micro-organisms instalación biotechnology.
Am. Occup. Hyg. 40 (3) págs.: 245 - 260, 1996.
11. MACHER, J. M.
Bioaerosols samplers.
Appl. Occup. Environ. Hyg. 12 (11) págs.: 723 - 729, 1997.
12. MACHER, J. M.
Evaluation of bioaerosol sampler performance.
Appl. Occup. Environ. Hyg. 12 (11) págs.: 730 - 736, 1997.
13. EDUARD, W. and HEEDERIK, D..
Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms instalación highly contaminated work environments.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 59 (2) págs.: 113 - 127, 1998.