

APÉNDICE 3: IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS EN LOS LUGARES DE TRABAJO

La investigación de la exposición a agentes biológicos en el lugar de trabajo puede ser relativamente simple si se conoce la naturaleza de los mismos, o muy compleja en especial para aquellas actividades en las que la exposición a dichos agentes no se produce de forma intencionada como sería el caso de la agricultura, trabajos en unidades de eliminación de residuos, tratamiento de aguas residuales,...ya que pueden formarse mezclas complejas de diferentes microorganismos. En estos casos el procedimiento a seguir para la identificación de los mismos podría efectuarse utilizando el estudio de indicadores que, de forma gradual (de globales a individuales), pongan de manifiesto la exposición a agentes biológicos:

- Indicadores globales (IGL), por ejemplo: recuento total de bacterias u hongos/levaduras, viables o totales que, mediante determinaciones analíticas sencillas y poco costosas, dan idea de la carga microbiológica total, permitiendo en su caso la identificación de agentes biológicos.
- Indicadores de grupo (IGR), por ejemplo: endotoxinas, enterobacterias, actinomycetes, ... como grupos homogéneos de agentes biológicos y/o productos derivados de los mismos.
- Indicadores específicos (IES), para lugares de trabajo o tareas concretas está indicado el estudio de agentes biológicos o familias específicas directamente relacionadas con los ya citados lugares investigados.
- Indicadores individuales (IIN), para problemas específicos que se hayan encontrado en relación con agentes biológicos concretos puede establecerse, cuando ello sea posible, una investigación de especies individuales, por ejemplo *Pseudomona aeruginosa*.

En la Tabla adjunta se recoge, a modo de ejemplo, un listado de las actividades laborales y los parámetros de medición a examinar.

ACTIVIDAD LABORAL	POSIBLES INDICADORES ESTUDIADOS
Plantas de clasificación de residuos sólidos/ compostaje	IGL: Bacterias /hongos y levaduras Bacterias; IGR: Gram (+), Gram (-), Endotoxinas; Bacterias formadoras de esporas; Actinomycetes; IIN: <i>Aspergillus fumigatus</i> ;
Plantas de tratamiento de aguas residuales	IGL: Bacterias; IGR: Bacterias Gram (+), Endotoxinas; IIN: <i>Leptospira interrogans</i> , <i>E. Coli</i>
Eliminación de residuos	IGL: Bacterias, Hongos; IGR: Bacterias (aerobias y anaerobias)
Biotecnología	IIN: Agentes biológicos específicos del proceso, p. ej.: <ul style="list-style-type: none"> • Productos farmacéuticos y biológicos: <i>E. coli</i> k-12 • <i>Cephalosporium</i> spp.; <i>Streptomyces</i> spp.; Cultivos celulares de ovario de hamster; • <i>Penicillium crysogenum</i> • Bebidas alcohólicas: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; • <i>S. Ovarium</i> • Enzimas industriales: <i>Bacillus licheniformis</i>; <i>Bacillus subtilis</i>; <i>A. oryzae</i>; <i>Mucor</i> spp. • <i>Rhizopus</i> spp.; <i>Clostridium</i> spp. • Alimentos: <i>Streptococcus termophilus</i>; <i>Lactobacillus bulgaricus</i>; <i>Penicillium roqueforti</i>; • <i>P. camembertii</i>; <i>Propionobacterium shermanii</i>

Mantenimiento sistemas de acondicionamiento de aire / humidificadores / torres	IGL: Bacterias, Hongos; IGR: Actinomycetes, Pseudomonas, Endotoxinas; IIN: Legionella pneumophila; Gérmenes específicos (filtros);
Tratamiento de metales (fluidos de corte)	IGL: Bacterias; I-tongos, Levaduras; IGR: Enterobacteriaceas; Endotoxinas; IES: Pseudomonas;
Descontaminación De suelos	IGR: Bacterias Gram (+) y Gram (-); IES: Pseudomonas, Nocardia spp.
Ventas al por mayor/almacenes	IGL: Hongos; IGR: Actinomycetes;
Industria forestal	IIN: Ag. Biológicos origen de patologías específicas p. ej.: <ul style="list-style-type: none"> • Amebiasis (Entamoeba histolyticum) • Leptospirosis (Leptospyra spp.) • Ornitosis (Chlamydia psitacci) • Tularemia (Franciscella tularensis) ...
Producción de alimentos	IGL: Bacterias; Hongos; Levaduras; IES: Staphylococcus spp.; Coliformes IGL: Bacterias; Hongos/ Levaduras; IIN: Patógenos causantes de enfermedades:
Manipuladores de animales	Antrax; Brucelosis; Criptosporidosis; Ectima contagiosa; Erisipeloide; Hidatosis, Leptospirosis, Psitacosis; Rabia; Salmonelosis; Tinea capitis; Triquinosis; Tuberculosis; Tularemia
Cuidado de la salud	IGL: Bacterias; Hongos/ Levaduras; IES: Gérmenes infecciosos: - Klebsiella spp.; Micobacterias; Legionella spp...
...	...

El estudio de los posibles indicadores propuestos para la evaluación de los riesgos asociados a agentes biológicos implicará, como paso previo, una toma de muestra de los mismos bien para su determinación directa como bioaerosoles, bien como contaminantes superficiales o para la medida cuantitativa de productos, componentes o metabolitos de los agentes biológicos cuya concentración sea representativa de la carga biológica global a valorar.

Se pueden tomar por lo tanto tres opciones para la medida de agentes biológicos:

- Métodos que van a poner de manifiesto el número total de agentes y/o el número de microorganismos cultivables, entendiendo como tales aquellos capaces de formar colonias en un medio de cultivo adecuado.
- Métodos que ponen de manifiesto la presencia de elementos celulares provenientes de los agentes biológicos como pueden ser, por ejemplo, las endotoxinas y glucanos.
- Métodos que cuantifican metabolitos tanto primarios (por ejemplo: ATP), como secundarios (por ejemplo: micotoxinas), que pueden servir de marcadores de la actividad vital de los agentes biológicos, o encontrarse en los bioaerosoles muestreados.

La limitación de la metodología propuesta está en que, en la actualidad, no se disponen de datos suficientes para establecer de forma fiable relaciones dosis-efecto/respuesta para los bioaerosoles, de modo similar al establecido para los agentes químicos, por lo que no es posible el establecimiento de

valores límite ambientales que sirvan como criterio de referencia en la misma línea que para los agentes químicos (VLA, TLV). Para el caso de las endotoxinas sí hay valores de referencia orientativos.

A pesar de estas limitaciones consideramos de gran utilidad este tipo de estudios ya que, además de dar información sobre la naturaleza de los agentes biológicos (Anexo II), posibilitan el estudio de situaciones específicas o la comparación de éstas, por ejemplo antes y después de la aparición de quejas o patologías, comparación de dos sistemas de limpieza, efectividad de un desinfectante, repercusión de un cambio en el proceso productivo, repercusión de factores físicos, identificación de focos de contaminación, etc.

1. Métodos para el muestreo de agentes biológicos cultivables y/o totales

Están proyectados para determinar la fuente, cantidad e identificación de agentes biológicos transmitidos fundamentalmente por vía aérea.

Están basados en la toma, recuperación y subsiguiente cultivo de microorganismos. Estos métodos pueden ser clasificados de acuerdo con el procedimiento de toma de muestra o el manejo de la muestra tomada, e incluyen: gravitación, impactación, centrifugación, burbujeo y filtración.

1.1. Gravitación o impactación natural

Es la forma más simple de toma de muestra de bioaerosoles, en la cual las partículas biológicas aerotransportadas son recogidas sobre una superficie adherente (agar en una placa Petri o recubriendo un portaobjetos, placas RODAC,...) por su capacidad de sedimentar por gravedad. Es un método económico, que no necesita equipos auxiliares, si bien ha de tenerse especial cuidado en donde se colocan dichas placas para evitar corrientes de aire. Las partículas de mayor tamaño pueden estar sobrerrepresentadas. Este método no es cuantitativo, es decir, la muestra no se toma a partir de un volumen conocido de aire, por lo que las pruebas de intercomparación son dificultosas. Es un procedimiento útil para estudios iniciales y para la estimación aproximada de la carga microbiológica tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, si se eligen adecuadamente los medios de cultivo.

1.2. Impactación:

El aire, aspirado por una bomba de vacío que forma parte del muestreador, pasa a través de un orificio y es dirigido a la superficie del medio de cultivo contenido en una placa adecuada. Las partículas con suficiente momento de inercia abandonan la corriente e impactan sobre la superficie. El orificio de entrada puede consistir en una rendija o en un cabezal con un elevado número de orificios de igual diámetro y el medio de recogida puede ser agar sobre una placa Petri, RODAC o un portaobjetos.

Muchos muestreadores emplean este método, algunos recogen las partículas sobre una superficie única, mientras otros las recogen por diferentes fracciones de tamaño (diámetro aerodinámico equivalente), en superficies sucesivas (impactación en cascada). Ejemplos de estos muestreadores por impactación incluyen los de rendija (Casella), impactadores de etapa simple (SAS), impactadores Andersen de 1, 2 y 6 etapas o placas (este último considerado como método de referencia), impactador en cascada de May que recoge fracciones sobre portaobjetos.

El caudal de aspiración varía en el rango de 10 a 180 L/min.

Una vez tomada la muestra, y según sea la naturaleza de los agentes biológicos a determinar, la placa se incuba a la temperatura adecuada, produciéndose el crecimiento de dichos agentes mediante la formación de una colonia en el punto de impacto. Posteriormente se procede al recuento de dichas colonias y al cálculo de su número referido a un volumen fijo de aire de 1m^3 , a partir de las colonias encontradas en el volumen de aire muestreado, expresándose los resultados habitualmente como ufc/m^3 (unidades formadoras de colonias en un metro cúbico de aire).

La identificación específica del agente biológico supone habitualmente que se proceda a su resiembra, en medio idóneo, y la posterior aplicación de reacciones de identificación o estudios por morfología directa o tinciones específicas.

Una vez identificado el agente biológico se comprobará su inclusión entre los listados en el [Anexo II](#), o en su caso se procederá a su clasificación provisional en cualquiera de los cuatro grupos reflejados en función del riesgo de infección.

1.3. Centrifugación:

Estos muestreadores de impactación utilizan la fuerza centrífuga para ayudar a la separación de las partículas de la corriente de aire de aspiración. Operan creando un remolino en el cual las partículas con suficiente inercia dejan la corriente de aire para impactar sobre la superficie (medio de cultivo) de recogida.

En el RCS Biotest se recoge el aire contra una tira de plástico que soporta una fina capa del medio agar en el cual impactan las partículas aerotransportadas.

Opera a un flujo de 40 L/min.

Todos los métodos descritos hasta ahora sólo dan información de los agentes biológicos cultivables, es decir, con capacidad de reproducirse.

En un entorno laboral se está potencialmente sujeto a la exposición a microorganismos (cultivables, viables, no viables, que pueden producir también riesgos tóxicos o alérgicos; formas de supervivencia, como esporas), sus componentes biológicamente activos o productos derivados de dichos microorganismos. Interesa por lo tanto la posibilidad de utilizar métodos de muestreo más generales que permitan obtener una información más amplia.

Entre estos métodos que permiten la medida de agentes biológicos totales destacan los de burbujeo o impinger y de filtración.

1.4. Burbujeo o impinger:

El aire a muestrear pasa a través de un volumen conocido de líquido (suero salino, agua de peptona con agentes humectantes, medios líquidos...). Las partículas abandonan la corriente de aire por impactación en el líquido, quedando retenidas en el mismo. Posteriormente, y en el medio de cultivo adecuado, se transfiere una alícuota del líquido de captación, procediéndose a su cultivo, recuento y en su caso a su identificación (viables o cultivables) (1).

A otra alícuota se adiciona naranja de acridina y se filtra, procediéndose al recuento total (viables y no viables) por microscopía de epifluorescencia directamente sobre el filtro .

La mayoría de los muestreadores están construidos en vidrio, con una cámara simple de colección; por ejemplo, el AGI-30 opera a 12.5L/min. y el Mini-impinger a 1L/min.

1.5. Filtración:

El aire es aspirado a través de un medio de filtración en el cual las partículas se depositan.

Su flujo es función del tipo de filtro, su tamaño y de la bomba de aspiración, oscilando habitualmente entre 1-500L/min. El tipo de filtro más utilizado es el de membrana de policarbonato ya que las partículas pueden ser removidas fácilmente de su superficie por agitación en líquidos adecuados, procediéndose a la posterior inoculación de la suspensión formada en los medios de cultivos específicos (2).

Un procedimiento similar es aplicable a la cuantificación e identificación de agentes biológicos presentes en muestras de polvo. Un peso conocido del mismo se extrae adecuadamente por agitación vigorosa con suero salino conteniendo 0.01% de Tween 80. Posteriormente se inocula un volumen conocido en medios de cultivos específicos, procediéndose a su posterior recuento, expresado como ufc/g, y, en su caso, identificación.

Todos los procedimientos descritos están en fase de desarrollo y armonización a través del Comité Europeo de Normalización. El CEN/TC 137 WG 5 está desarrollando métodos normalizados para la toma de muestras, que se han plasmado en la prEN 13098 que recoge las reglas para la medida de microorganismos y endotoxinas en aire.

2. Muestreo de superficies

Además del muestreo aéreo, puede también determinarse el número de agentes biológicos depositados en una superficie. Este tipo de muestreo es utilizado fundamentalmente en estudios de higiene alimentaria, pero tiene otras aplicaciones como, por ejemplo, comprobar la eficacia de los productos de desinfección o evaluar la presencia de agentes biológicos en el interior de los conductos de aire de un sistema de ventilación/climatización, industria de la piel y cuero.

La toma de muestras se hace fundamentalmente mediante el empleo de torundas o por contacto directo de la superficie a muestrear con una placa RODAC preparada con el medio de cultivo adecuado y su posterior incubación e identificación, en su caso.

3. Métodos que ponen de manifiesto la presencia de elementos celulares

Estos métodos dan cuenta de elementos celulares de microorganismos tanto viables como no viables o desintegrados, constituyentes de su estructura celular que pueden menoscabar la salud del personal expuesto.

Entre estos elementos celulares cabe destacar las endotoxinas, glucanos y ergosterol.

3.1. Endotoxinas:

Son polisacáridos termoestables de alto peso molecular (LPS), formados por un componente lipídico característico, lípido A, unido covalentemente a un polisacárido. Las endotoxinas son componentes integrales de la membrana exterior de las bacterias Gramnegativas. La presencia de endotoxinas se relaciona con la posibilidad de reacciones tóxicas, procesos inflamatorios muy intensos, fiebre, bronquitis, ... Desde el punto de vista de enfermedades relacionadas con el trabajo sólo las endotoxinas aerotransportadas son relevantes. Se producen en el manejo de material orgánico. Los materiales contaminados por bacterias y las heces de animales son las fuentes principales de polvo que contribuirá a la liberación de endotoxinas.

La agricultura y las industrias relacionadas proporcionan las fuentes de exposición profesional más habituales: granjas de cerdos, pollos, vacas y caballos; industrias del algodón; procesado de la patata, caña azucarera, cerveza; mataderos de aves; tratamiento de aguas residuales, basuras y compostaje; sistema de humidificación de aire de edificios y procesos industriales con reciclaje de agua; emulsiones formadas en los fluidos de corte en metalurgia, ...

El grupo CEN/TC/WG 5 está en fase de normalización del método analítico para la cuantificación de endotoxinas. Se basa en la activación que las endotoxinas producen en una enzima de la coagulación presente en el lisado del amebocito del cangrejo *Limulus polyphemus* (método LAL).

Dicha enzima se hace actuar sobre un sustrato coloreado, midiéndose espectrofotométricamente la liberación de los productos formados.

En la actualidad se admite un límite máximo de exposición profesional a endotoxinas de 200 ng/m³.

Se han desarrollado métodos químicos alternativos para la medida de endotoxinas, basados en la determinación de LPS por cromatografía en fase gaseosa/espectrometría de masas (3).

Análogamente se ha descrito la posibilidad de determinar el ácido murámico como marcador químico de péptidoglicanos, presentes fundamentalmente en la pared celular de bacterias Grampositivas (4).

3.2. Glucanos [(1->3)β-D Glucano]

Es otro biomarcador de la contaminación fúngica en aire. Es un componente de la pared celular de todos los hongos filamentosos y se le considera como la posible causa de enfermedades respiratorias, especialmente enfermedades crónicas relacionadas con la exposición a polvos orgánicos.

El método analítico implica la toma de muestras de aire sobre filtros de acetato de celulosa (5) y posterior análisis utilizando el método del LAL (6) (Lisado del Amebocito del *Limulus*)

3.3. Ergosterol:

Es utilizado como un marcador químico en aire de la contaminación por hongos, al ser uno de los componentes químicos fundamentales de la membrana de los principales hongos saprofitos. Su determinación se lleva a cabo por métodos cromatográficos, previa extracción de los filtros de policarbonato en donde se toman las muestras ambientales (7).

4. Métodos de cuantificación de metabolitos

Otra alternativa para la medida de agentes biológicos es la cuantificación de sustancias procedentes de los mismos. Esto puede ser aplicable cuando haya un método fiable de toma de muestra y análisis y cuando la concentración de analito sea proporcional a la carga microbiológica. Entre estas opciones de medida se pueden contemplar los metabolitos primarios, como por ejemplo el análisis del Adenosin trifosfato (ATP) que puede servir de marcador para los microorganismos o su actividad vital,

y metabolitos secundarios como, por ejemplo, las micotoxinas que pueden encontrarse en los bioaerosoles.

4.1. Análisis de ATP:

El análisis de los niveles de ATP en las muestras es rápido e indicativo del metabolismo de la actividad microbiana. Existe una relación entre los niveles de ATP y el número de agentes microbianos, por lo que este método (8) es a menudo utilizado junto con el muestreo de superficies en la investigación de todos los problemas de higiene relacionados con la industria alimentaria.

4.2. Micotoxinas:

Son metabolitos secundarios de bajo peso molecular de origen fúngico, producidos en condiciones especiales de crecimiento en cosechas almacenadas y alimentos. Algunas micotoxinas pueden causar efectos sistémicos en especial en el hígado y el sistema nervioso.

Entre las micotoxinas más importantes destacan:

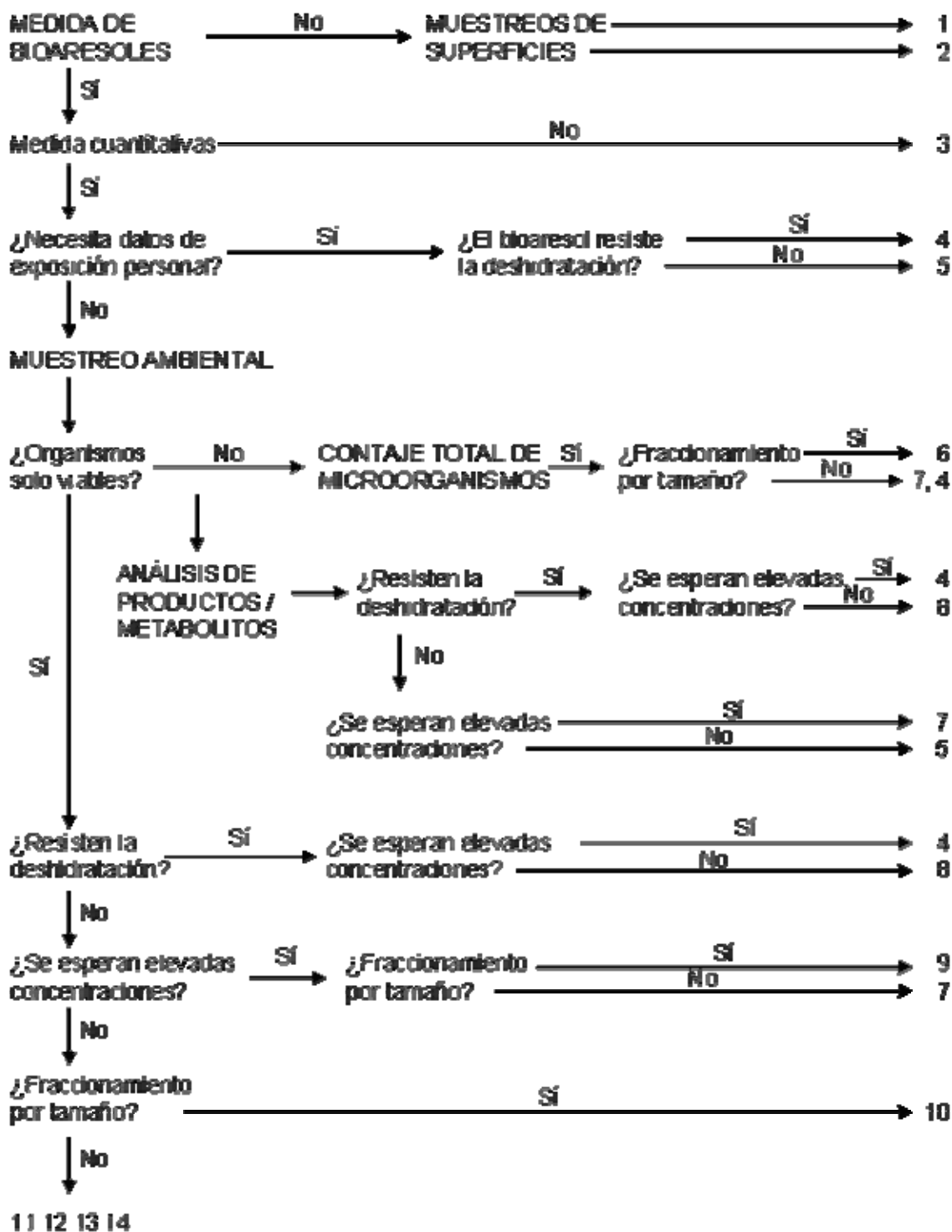
- Aflatoxinas, producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.
- Ocratoxina A, producida por *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*).
- Tricotecenos y Fuminosinas, producidas por *Fusarium* spp.

Se ha demostrado que las aflatoxinas y otras micotoxinas, por ejemplo, el ácido Dsecalónico, pueden aerotransportarse en elevadas concentraciones en determinadas tareas como en el procesamiento de cacahuetes, pistacho y maíz causando efectos tóxicos y carcinogénicos.

Los métodos analíticos para su determinación utilizan bien técnicas cromatográficas (9) o bien líneas celulares para ensayar su citotoxicidad (10).

En las tablas adjuntas se propone un esquema para la elección de método de muestreo así como un estudio comparativo de características, ventajas e inconvenientes de los métodos de muestreo ambiental más comunes.

ESQUEMA PARA LA ELECCIÓN DEL MÉTODO DE MUESTREO



1:	Frotis	8:	Filtración alto caudal (5500 L/min)
2:	Placas de contacto	9:	Impinger multietapas (55 L/min)
3:	Colocación de placas abiertas	10:	Impactador en cascada, 6 etapas, Andersen (28.5 L/min)
4:	Filtración a bajo caudal (1-2 L/min)	11:	RCS, muestreador centrífugo (40 L/min)
5:	Mini-impinger (1 L/m)	12:	SAS, impactación directa (90 L/min)
6:	Impactador en cascada MAY (10 L/min)	13:	Muestreador Casella de rendija (30-700 L/min)
7:	Impinger (12.5 L/min)	14:	Impactador Andersen monoetapa (28.5 L/min)

Algunos muestreadores se denominan por sus nombres comerciales sólo para ayudar a su identificación, sin que esto suponga su recomendación, o que no existan otros de análogas prestaciones.

MUESTREO AMBIENTAL AGENTES BIOLÓGICOS

MÉTODO DE MUESTREO	PROCESO	VELOCIDAD Y TIEMPO DE MUESTREO (L/min)/min.	VENTAJAS	INCONVENIENTES
*IMPACTACIÓN SOBRE LÍQUIDO (AGI)	BURBUJEO DEL AIRE A TRAVÉS DE UN MEDIO LÍQUIDO	12,5/30	* ADECUADO PARA GRAN VARIEDAD DE MICROORGANISMOS * NO SATURACIÓN	* DISPERSIÓN DE ESPORAS * ESTERILIDAD * TRANSPORTE EN FRÍO
*IMPACTACIÓN SOBRE AGAR (ANDERSEN)	RECOGIDA DEL AIRE A TRAVÉS DE ORIFICIOS DE DIFERENTES TAMAÑOS EN PLACAS PETRI	28/1-5	* SEPARACIÓN POR TAMAÑO * PUEDE SER CALIBRADO * GRAN EFICIENCIA	* POCA MANEJABILIDAD * POCO ECONÓMICO
*IMPACTACIÓN EN AGAR (SAS)	RECOGIDA DEL AIRE A TRAVÉS DE ORIFICIOS EN PLACAS RODAC	90/0,5-3	* MANEJABILIDAD	* ESCASA EFICIENCIA
*IMPACTADOR CENTRÍFUGO (RCS)	RECOGIDA DEL AIRE EN TIRAS DE AGAR	40/0,5	-----	* EFICIENCIA DESCONOCIDA * NO CALIBRACIÓN * MEDIOS CULTIVOS LIMITADOS
*FILTRACIÓN MEMBRANA EN	RECOGIDA DEL AIRE EN FILTROS	1-2/15-60	MICROORGANISMOS TOTALES	* DESECACIÓN DE MICROORGANISMOS * PÉRDIDA DE VIABILIDAD
*SEDIMENTACIÓN EN PLACAS	PLACAS DE AGAR ABIERTAS COLOCADAS EN DIFERENTES LOCALIZACIONES	?	* FÁCIL DE UTILIZAR ECONÓMICO	* DATOS NO COMPARABLES

1. Bergey's Manual of Determination Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994
2. Palmagren, U.; Ström, G.; Blomquist, G.: Colletion of airborne microorganism on Nucleopore filters, estimation and Analysis CAMNEA Method. J. Appl. Bacteriol. 61, 401-406 (1986). EXPOSICIÓN A AGENTES BIOLÓGICOS 46
3. Walters, M. Milton, D. Larsson, L: Airbone environmental endotoxin: A Cross-validation of sampling and analysis techniques. Appl. Environ. Microbiol. 60:996-1005 (1994).
4. Fox, A.; Wright, L.; Fox, K.: Gas Chromatography-tandem Mass espectometry for trace detection of muramic acid, a peptidoglycan chemical marker, in organic dust; J. Microbiol. Meth. 22:11-26 (1995).
5. Rylander, R. ; Person, K.; Airbone P1,3-glucano may be related to syntoms in sick building. Ind. Environ. 1:263-267 (1992).
6. Tamura, H.; Arimoto, Y.; Tanaka, S.: Automated kinetic assay for endotoxin and (1->3)β-D Glucan. Clin. Chim. Acta 226:109-112 (1994).

7. Young, J.C.: Microwave-assisted extraction of the fungal metabolites ergosterol. *J. Agric. Food. Chem.* 43:2904-2910 (1995)
8. Stanley, P. E; McCarthy, B.J. and Smither, R. (Editores) *ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, London (1989).
9. Miller, J.D.; *Fungi and mycotoxin in grain: implication for stored products research*. *J. Stored Products Research* 31:1-16 1995.
10. *Health Implication of fungi in indoor environments*. Ed. RS Samson, B. Flannigan. Amsterdam: Elsevier 1994.