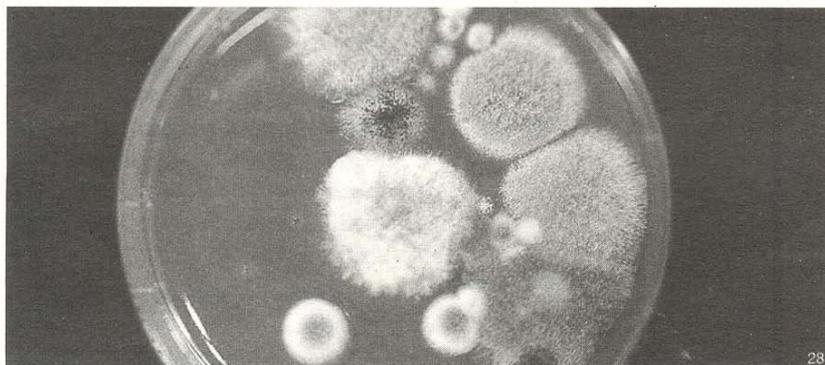


Proyecto Microkit 1999 para optimizar la sensibilidad de los parámetros del muestreo microbiológico del aire



Rosa Bengala Caf. Agar: (DMT101) *Aspergillus flavus* aflatoxigénico, *A. Fumigatus* patógeno oportunista humano en quirófanos y otros hongos de crecimiento lento que en otros medios no serían capaces de crecer.

¿Por qué hay que controlar la microbiología del aire?

Aire "no potable" y salud pública

Cada vez somos más conscientes de que el aire es vehículo transmisor de enfermedades debidas a agentes biológicos (BOE 124 de 24/05/1997), que pueden dividirse en tres categorías:

- Infecciosos (bacterias, hongos y virus)
- Alergénicos (hongos, ácaros, polen y subproductos biológicos: pelos, excrementos, papel, microorganismos no viables...)
- Toxigénicos (endotoxinas bacterianas, micotoxinas fúngicas...)

Por ello, proponemos el término "no potable" como en las aguas, para designar aires cuya inspiración resulta biológicamente peligrosa.

Conocer la calidad del aire es el más elemental mecanismo de prevención de enfermedades.

Aire "alterativo"

El aeroplancton contiene además microorganismos que, sin ser patógenos, alergénicos ni toxigénicos, pueden alterar las propiedades organolépticas de los alimentos que comemos y

pueden alterar los medicamentos que nos curan. De ahí la importancia creciente del control del hasta hace poco gran olvidado en A.R.C.P.C.: El aire.

De hecho, en laboratorios farmacéuticos hace ya años que se controla con preocupación este tema, al ser especialmente sensibles a la presencia de todo tipo de aeroplancton.

Proponemos, pues, la denominación de "aire alterativo" para designar aquél que provoca, en contacto con el producto, una merma de calidad de éste. De nada sirve analizar materias primas, productos y operarios si luego, durante su embalaje o transporte, el producto se contamina por el aire alterativo, creando además una mala imagen para la empresa fabricante.

¿Cómo controlar el aeroplancton microbiano de la forma más repetitiva y más sensible?

Métodos de muestreo

Sedimentación pasiva

Se basa en dejar placas abiertas durante varios minutos y esperar que la casualidad lleve a los microorganismos suspendidos en el aire a caer en ellas. Sólo es útil como método de screening primario para caracterizar un

tipo de aire (poco contaminado, muy contaminado), y para comparar en una misma sala si la contaminación sube o baja tras una desinfección, o a lo largo de la semana, por ejemplo. Pero no es útil para comparar datos con los de otras salas de volumen o características diferentes, ya que no cuantifica, y los resultados deben expresarse en ufc/placa, nunca en ufc/m³ de la sala o de la columna de aire que hay sobre cada placa, como hemos visto en demasiadas ocasiones. Cualquier persona que pase (el mismo operario), una puerta que se abra, una corriente de aire... distorsionan los resultados de forma demasiado importante.

Filtración de membrana

El muestreador hace pasar un volumen concreto de aire a través de una membrana, y luego ésta se incuba sobre un medio de cultivo sólido, como en el caso del método de Filtración de Membrana en aguas. El problema es que los microorganismos se resecan extraordinariamente con el flujo de aire que les pasa cuando están retenidos en la membrana, por lo que la recuperación es francamente baja.

Burbujeo en caldo (Impingers)

El muestreador hace pasar un volumen concreto de aire a través de un caldo, y luego éste se observa al microscopio para realizar un recuento, o bien se incuba en medios de cultivo para aislar colonias. La recuperación es máxima. Su importancia es que permite recuperar al microscopio células vivas y muertas, lo que es de interés para estudios de alergia y toxicidad provocadas no sólo por los microorganismos vivos, sino también por sus restos. El problema es que es muy incómodo de manipular.

Centrifugación

El muestreador capta un volumen concreto de aire y lo centrifuga contra una tira de medio de cultivo sólido. Aun-

que la sensibilidad es similar a la de los muestreadores de impacto, de máximo éxito comercial, tiene el problema de la dependencia de un solo proveedor para las tiras del material fungible.

Impacto

El muestreador capta un volumen concreto de aire y lo estrelló contra un medio de cultivo sólido. En el último año han proliferado como setas diferentes equipos para control microbiológico del aire por impacto, lo que sirve de indicador del gran interés que despierta la microbiología del aire como vehículo portador de enfermedades y microorganismos alterativos. También da una idea de cuál es el método comercialmente más aceptado: El de muestreo por impacto, sea en placa Petri de 90 mm o en Placa de Contacto.

• Impacto en cascada (Andersen)

Clásico método de referencia, por tener la máxima sensibilidad, se diferencia de otros muestreadores de impacto por tener varios cabezales en cascada, con poros cada vez más pequeños, que recuperan cada vez más pequeños, que recuperan cada vez clusters y microcolonias microbianas más pequeñas, hasta llegar a captar en la última placa colonias procedentes de microorganismos aislados. Su precio y complicación le han impedido el menor éxito comercial.

• Impacto a diferentes caudales (Microflow)

Última generación de muestreadores que permite adecuar el caudal (la sensibilidad) al tipo de aire que muestreamos: Flujo laminar para aires limpios, flujo rápido para aires sucios, con 5 caudales diferentes.

Nuevo Microflow-90 para uso con placa Petri de 90 mm, respetando los 5 caudales.

Parámetros indicadores microbianos en el aire

Para elegir los parámetros aplicaremos nuestro criterio profesional y nuestro sentido común. En primer muestreo no vamos a buscar Enterobacterias en el aire de una oficina ni Pseudomonas en el aire de una fábrica de galletas, por ejemplo. Aquí se entiende bien la manía que tenemos los biólogos de

darle nombre a todos los organismos que nos encontramos.

Podemos clasificar los microorganismos del aire en 5 grupos según su incidencia en el ser humano (recordemos que el nuevo concepto de agente biológico no es sólo el que puede producir infección, sino además el que puede producir cualquier tipo de alergia o toxicidad). Marcamos en cursiva los parámetros comunes, que no deberían faltar jamás en ningún control de aire saludable, lo que no minimiza la importancia de los demás:

Microorganismos banales:

Los más comunes, cajón de sastre de los que no caben en los demás apartados.

Microorganismos alterativos:

- *Recuento total de bacterias* (Todos los tipos de aire), e identificación de *Bacillus sp.*, de Cocos Gram negativos, y de *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* y *Streptococcus salivarius* (como indicadores de exceso de población en interiores).
- *Recuento de levaduras y mohos* (todos los tipos de aire).
- Detección de microalgas (aire de envasadoras de agua).

Microorganismos patógenos que pueden transmitirse por vía aérea:

• Bacterias

- *Pseudomonas aeruginosa* (aire húmedo de aires acondicionados) y otras pseudomonas.
- *Streptococcus*.
- *Legionella* (aire húmedo de aires acondicionados, duchas, fuentes...). Más fácil de encontrar en el agua, pero no debe descartarse su búsqueda en aires húmedos (saunas, invernaderos, duchas...)
- *Staphylococcus aureus* (todo tipo de aire), resto de estafilococos.
- Enterobacterias, Coliformes, *E.coli*, *Salmonella*... (aire de E.R.A.R.)
- Actinomicetes termófilos a 55°C (*Thermoactinomyces candidus*, *Th. vulgaris*, *Thermomonospora*, *Micropolyspora faeni*, *Saccharomonospora*, *Corynebacterium*...: Fiebres del heno y de los humidificadores en industria textil, ensilados...). Se detectan en TSA incubado a 55°C y crecen con colonias

repletas de microesporas mucho más pequeñas y penetrantes que las de los mohos.

- *Mycobacterias* de las Tuberculosis en hospitales con emisores humanos.
 - *Acinetobacter*.
 - *Clostridium* (aire con tierra en industria agroalimentaria).
- ### • Hongos

- *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Scenedosporium*, *Penicillium* y la plaga bíblica de *Stachybotrys*, como mohos (todo tipo de aire).
- Hongos dermatófitos (hospitales y clínicas veterinarias con emisores humanos o animales).
- Cepas mutantes de los antedichos y de otros microorganismos resistentes a los antibióticos (sobre todo en hospitales).

Microorganismos alergénicos que pueden transmitir sus alérgenos por vía aérea:

- Recuento e identificación de mohos (alternaria...)

Microorganismos toxigénicos que pueden transmitir sus toxinas por vía aérea:

- Endotoxinas bacterianas (detección de *Clostridium* y *Bacillus*).
- Micotoxinas fúngicas (detección de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*...).

Problemática del muestreo del aire

Los microorganismos en el aire se encuentran, en general, en condiciones de stress térmico, hídrico, luminoso y alimentario. Si, además, es un aire interior desinfectado, se encuentran con agentes subletales que, en el caso de que no lleguen a eliminarlos, al menos les impiden crecer.

Por otra parte, se encuentran en clusters junto a partículas orgánicas o inorgánicas, y en microcolonias que aumentan el tamaño de agente biológico.

Para garantizar una máxima recuperación hay que tener en cuenta estos factores pero, además nuevos agentes de

stress introducidos mediante el muestreo:

Efecto desecación: El paso de grandes volúmenes de aire por la superficie de las células impactadas sobre el medio de cultivo puede reseca la pared celular de numerosos microorganismos, hasta el punto de hacer inviable su recuperación celular, lo cual descende la sensibilidad cuanto mayor sea el volumen de aire que se estrella contra cada microorganismo que impactó sobre el medio de cultivo. En casos extremos, se reseca hasta el medio, que es incapaz de suministrar agua a los microorganismos que han resistido, por lo que éstos no crecen en el medio.

Efecto rebote: El paso de aire a gran velocidad por la superficie del medio de cultivo provoca turbulencias internas en el muestreador, que impiden el impacto al hacer rebotar y/o pasar de largo del medio una proporción de microorganismos mayor cuanto mayor sea el caudal del muestreo (del mismo modo que a lo largo del curso de un río, en la zona alta, de gran turbulencia, sólo se depositan los cantos rodados, en la zona media las arenas, en nuestro caso los hongos, y en la desembocadura las arcillas, en nuestro caso las bacterias).

Ya la ISO 14698-1 contempla que el tamaño de la muestra, la duración del muestreo y el método pueden influir en la viabilidad del microorganismo.

Queda claro, después de todo lo dicho, que el aire que sale de un muestreador no es estéril.

Factor de corrección: Por último, hay que tener en cuenta los microorganismos que no entran en el muestreador a causa de los espacios inter-poros del cabezal, aunque este tema se resuelve aplicando, en los muestreadores estandarizados con 220 poros, el factor de corrección o tabla del Número Más Probable del aire.

Control de la desinfección ambiental. Adaptación-mutación

Demostrar la eficiencia de una desinfección o de una filtración esterilizante es muy importante para verificar su eficacia. Hay que verificar el correcto uso del desinfectante, si es el adecuado

o los microorganismos se han adaptado a él, las dosis y repeticiones que sean efectivas evitando despilfarros, la colmatación de los filtros...

Los desinfectantes más típicos son lejía y otros compuestos clorados, derivados iodados, ácidos aniónicos, derivados de amonio cuaternario, alcoholes, peróxido de hidrógeno y derivados fenólicos. Todos ellos tienen ventajas e inconvenientes y sólo son bactericidas a partir de ciertas dosis (hasta la cual sólo son bacteriostáticos).

Esta última afirmación nos lleva a la otra cara de la moneda de la desinfección: Lo que hoy desinfecta, mañana provocará mutaciones en las cepas que han sido expuestas a bajas dosis del desinfectante (alrededores de la zona de desinfección, dosis erróneamente baja de desinfectante...), creando poblaciones adaptadas a dosis cada vez más altas del mismo desinfectante. De ahí que no compartamos la idea de los lavavajillas bactericidas, como no compartimos el uso indiscriminado de antibióticos que crea serios problemas con cepas cada vez más resistentes.

Por ello es tan importante efectuar rotaciones mensuales del tipo de desinfectante, imposibilitando así la supervivencia de poblaciones adaptadas.

Para encontrar el nivel adecuado de desinfectante, aplicarlo a diferentes concentraciones, tomando muestras con Microflow antes y después de cada desinfección, y quedarse con la concentración a partir de la cual la población baja logarítmicamente hasta el punto más bajo, evitando despilfarros.

Del mismo modo, para valorar la calidad de las desinfecciones rutinarias, utilizar Microflow antes y después de cada desinfección, repitiendo varias tomas distanciadas en el tiempo tras la desinfección, a fin de encontrar la frecuencia ideal entre dos desinfecciones.

Los muestreos se deben realizar por triplicado, con volúmenes de 200 l y caudal bajo (0,5 l/seg = 30 l/min) para evitar aún más stress a los microorganismos supervivientes.

Si utilizamos en paralelo placas de TSA y de Neutralizing Agar, observaremos además qué cepas se están adaptando al desinfectante (las que salen en

ambos medios), revelándonos que debemos rotar urgentemente.

Proyecto Microkit 1999 para optimizar los parámetros de muestreo

En la anterior Jornada Microkit que se celebró en Barcelona en diciembre de 1998, abrimos una serie de estudios interlaboratorio que hemos denominado "Proyecto Microkit para minimizar los errores de muestreo en el aire". Como coordinadores de este estudio, ha sido una gran satisfacción para nosotros comprobar que el 100% de los participantes han enviado los resultados a tiempo, cosa que, como se ha visto en otros estudios interlaboratorio, sobre todo de aguas, es bien raro. Decíamos en dicha Jornada que los laboratorios que se apuntaron iban a hacer historia, porque la microbiología del aire estaba en mantillas y era el momento de profundizar en la incidencia de los parámetros variables en la recuperación-sensibilidad del método. Y así ha sido. Presentamos los resultados de este arduo trabajo en el que hemos colaborado un total de 18 laboratorios de España e Italia. Tenemos la satisfacción de poder decir que estos resultados van a servir de referencia al Comité Técnico 100 de climatización de AENOR para emitir su propia guía sobre microbiología del aire. Nuestra más cordial felicitación a todos los participantes.

Estos estudios interlaboratorio corroboran nuestras anteriores conclusiones, que contradecían otras publicaciones, sobre todo inglesas, en cuanto a la muy superior sensibilidad de los caudales bajos que hemos demostrado, y por lo que fuimos duramente criticados por nuestra competencia.

Los expertos en estadística podrán basarse en todos estos datos para obtener posteriores conclusiones. No es nuestra meta; para nosotros es suficiente un estudio básico de media y varianza de cada tabla para obtener conclusiones certeras. Mezclar varias tablas nos parecía peligroso, por la posible variación de otros parámetros en cada participante. Esperemos que no se nos critique por todo ello.

Los estudios interlaboratorio desarrollados se basan en seis parámetros:

Bacterias a 0,5 l/seg	Hongos a 0,5 l/seg	Bacterias a 1,5 l/seg	Hongos a 1,5 l/seg
9,84 ufc/m ³	66,20 ufc/m ³	4,76 ufc/m ³	55,96 ufc/m ³

Tabla 1

- **Caudal:** efecto rebote y efecto paso de largo. Sensibilidad en función de la velocidad del flujo. Contradicción de las publicaciones inglesas.
- **Volumen:** efecto desecación (del medio y consecuentemente de la pared celular). Muestra máxima y muestra mínima.
- **Temperatura:** alterativos y patógenos. Bacterias y hongos.
- **Medios de cultivo:** inactivación de residuos de los desinfectantes y gel antidesecante para optimizar la recuperación.
- **Número de poros** ¿Aumenta la sensibilidad un mayor número de poros en el cabezal?
- **Recuento en superficies y en el aire** ¿Existe alguna correlación?

El número total de muestras comparadas en este Proyecto Microkit ha sido de 2.682.

Caudal: efecto rebote y sensibilidad según la velocidad del flujo

Caudal

Es el volumen de aire que se muestrea por unidad de tiempo. Mal llamado velocidad de entrada, que es en realidad la velocidad (espacio recorrido por unidad de tiempo) del impacto de la célula sobre el medio de cultivo.

Antecedentes

En la publicación interna de Microkit que motivó este interlaboratorio, se observa la siguiente media de recuperación para 123 muestras duplicadas (Tabla 1).

- Para prácticamente todas las muestras, las bacterias demuestran tener una recuperación media nada menos que un 207 % superior a 0,5 litros/seg que a 1,5 litros/seg, es decir, a 0,5 l/seg recuperamos más

del doble de bacterias que a 1,5 l/seg. El caso extremo son los resultados de aires con bajo contenido bacteriano: nótese la importancia de muestrear salas blancas a 0,5 l/seg, ya que los numerosos falsos negativos obtenidos a 1,5 l/seg (45 muestras de 64, el 70%) harían dar el resultado como perfecto, 0 ufc/m³, cuando no lo es. A la inversa sólo ocurre en 8 muestras, que suponen un 12%.

- Aunque en algunas muestras los hongos contradicen el resultado medio (lo que demuestra que dos muestras seguidas de aire no son la misma muestra), se observa una recuperación media 15% superior para hongos a 0,5 litros/seg que a 1,5 litros/seg.

Ningún otro factor, ni la corrección por el número de poros del cabezal (tabla NMP de J. Macher), ni el hecho de que dos muestreos consecutivos del mismo aire ya no son la misma muestra, demuestran diferencias tan significativas, sobre todo para bacterias, como el caudal de entrada del aire en el muestreador.

Participantes en el Proyecto Microkit sobre microbiología del aire, en total 6 estudios interlaboratorio, 18 participantes y 2.682 muestras duplicadas

- **Aquaria, srl**, Lacchiarella, Italia, Dssa. Palma Giuseppin, Elena Balestra.
 - **Ayuntamiento de Torremolinos**, Dra. M^a Ascensión Muñoz de Medio
 - **BDF-Nivea, S.A.**, Tres Cantos, Madrid, Equipo de Laboratorio de Microbiología
 - **CAT-BIO, S.L.**, Barcelona, Sr. José Ramón García
 - **Centro Analítico Pozuelo**, Madrid, D. Fernando Domínguez Gallud
 - **Centro Militar de Veterinaria**, Madrid, Servicio de Bromatología
 - **FINAF 92**, Conchita Ribera y Sandra Villabresa
 - **Hospital Militar Gomez Ulla**, Madrid, Servicio de Medicina Preventiva, Ana Rosa Torres Fernández, Elena Ballester Orcal, Julio Espinosa Urbina y José Ramón Méndez Montesino
 - **IRCCS Fondazione S.Maugeri**, Sezione Igiene Industriale, Pavia, D.ssa Elena Grignani, Dott. Danilo Cottica
 - **IRCCS Policlinico S. Mateo**, Direzione Sanitaria, Pavia, Dott. Lorenzo Lodola
 - **Laboratorios Bio-accali, S.A.**, Madrid, D. Julio Vidal Lucena y D. Enrique Hernández.
 - **Laboratorios MICROKIT, S.L.**, Madrid. Angélica Morales, Raquel Martín, Margarita Ochoa, Carmen Usin, Ana Esponera, y Jorge Sanchis. Promotores y coordinadores de este proyecto, nuestra empresa, además, cedió las miles de plaças de Contacto necesarias a los participantes.
 - **Laboratorio QUIMIOTEST**, Ma-llorca, D. Leonardo Sánchez Guix y D. Mario Grau Blasco
 - **Protecma**, Arganda del Rey, D. Ignacio Rojo Herguedas
 - **Sersanyam, S.L.**, Las Palmas G.C., D. Federico Santana Orihuela
 - **Smith Kline Beecham**, Alcalá de Henares, D. Pedro Berbil, Dña. Cristina Val
 - **Universidad Complutense**, Fac. Biología, Madrid, Belén Patiño
 - **Universita di Pavia**, Farmacologia, Microbiologia, Prof. Cesare Dacarro, Dott. Pietro Grisoli
- Son 6 Centros Oficiales, 5 Laboratorios de Análisis-Consultorías, 3 Laboratorios Farmacéuticos, 3 Industrias y 1 Hospital. Tratamiento estadístico (totalmente altruista): J.A. Ruiz Santaquiteria y Ricardo de la Fuente, Dpto. Patología Infecciosa U.C.M.

- Se nota que nuestra fábrica está en el campo y que sufrimos baja presión de visitas humanas, dado el alto nivel relativo de hongos con respecto al bajísimo de bacterias.

Existe una contradicción de las publicaciones inglesas y del proyecto de Norma CEN/TC243/WG2 con nuestros datos. Ellos promueven el uso de caudales rápidos (1,5-1,6 l/seg, 90-100 l/min) y nosotros el de caudales suaves (0,5 l/seg, 30 l/min) ¿Dónde está el error? Además de

que probablemente estos clásicos hablan siempre de ambientes sucios, creemos que se debe a que no había muestreadores de caudal bajo hasta que apareció Microflow, hace 2 años. Ahora ya nos ha copiado una multinacional por todos conocida, precisamente inglesa, que está a punto de sacar al mercado un calco del Microflow (pero sin servicio técnico en España). Nos duele comercialmente, pero nos da la razón técnicamente.

Conclusiones

- Aumente la sensibilidad en zonas limpias, disminuyendo el caudal a 0,5 l/seg (30 l/min). Utilice flujo lento si desea una máxima recuperación. Pensar que se puede aplicar un factor de corrección, multiplicando por el factor 2 los resultados obtenidos a 1,5 l/seg, a fin de obtener unos resultados similares a los de un muestreo a 0,5 l/seg, no es descabellado, aunque siempre será mejor adquirir un Microflow y muestrear a 0,5 l/seg, ya que no todas las muestras se han comportado igual y el 2 es una simple media.
- Aumente la rapidez del muestreo en zonas sucias, aumentando el caudal a 1,5-1,6 l/seg (90-100 l/min) e incluso a 2 l/seg (120 l/min). Utilice flujos rápidos si desea acabar el muestreo cuanto antes, cuando el alto contenido microbiano de la muestra de aire se lo permita.
- Ambas ventajas (máxima recuperación y rapidez en el muestreo) son incompatibles.

Análisis estadístico realizado mediante la T de Student para datos independientes (tabla 2):

Se hallaron recuentos significativamente mayores en los muestreos de aerobios totales a caudal suave (0,5 l/seg, 30 l/min) que a caudal rápido (1,5 l/seg, 90 l/min). En todos los muestreos se obtiene mayor recuperación de bacterias a 0,5 l/seg que a 1,5 l/seg, al menos un 20% superior, y hasta un 210% superior (en salas limpias). En salas estériles no ha sido posible detectar las diferencias porque todas las muestras eran realmente estériles.

Análisis estadístico realizado mediante la T de Student para datos independientes (tabla 3):

Los resultados son muy dispares en hongos, no hallándose diferencias significativas en el total de resultados entre el muestreo a caudal suave (0,5 l/seg) y el muestreo a caudal rápido (1,5 l/seg). Se concluye que el peso de las esporas de hongos es lo suficientemente elevado como para que las diferencias de caudal no les afecten en el efecto rebote.

Resultados del estudio interlaboratorio (Tabla-resumen bacterias)

	0,5 l/seg			1,5 l/seg			P	\bar{x}_1 / \bar{x}_2
	n	\bar{x}_1	σ	n	\bar{x}_2	σ		
Quimiotest	50	137,76	60,94	50	114,9	49,15	<0,05	1,2
Sesanyam	50	58,1	49,53	50	37,56	50,76	<0,05	1,5
Catbio	50	156,4	137,88	50	119,2	114,34	>0,05	1,3
Bioaccali	93	23,2	67,22	93	14,13	63,04	>0,05	1,6
Ctro. Anal. Pozuelo	50	50,28	60,90	50	37,98	36,31	>0,05	1,3
Hospital Gomez Ulla	47	63,80	85,23	47	42,90	65,66	>0,05	1,5
Smithkline Beechman	48	0	0	48	0	0	-	-
Microkit	174	13,96	38,71	174	6,66	8,88	<0,05	2,1
TOTAL	399	78,00	-	399	54,13	-	<0,05	1,4

Tabla 2. n: tamaño de la muestra (nº de muestreos comparativos)
x : media de rescuentos ufc/m³ σ : desviación estándar

Resultados del estudio interlaboratorio (Tabla-resumen hongos)

	0,5 l/seg			1,5 l/seg			P	\bar{x}_1 / \bar{x}_2
	n	\bar{x}_1	σ	n	\bar{x}_2	σ		
Quimiotest	50	7,08	9,42	50	14,46	16,17	<0,05	0,48
Catbio	50	4,40	9,07	50	5,20	9,09	>0,05	0,84
Bioaccali	69	1,72	3,61	69	0,56	1,66	<0,05	3,07
Ctro. Anal. Pozuelo	50	15,82	14,64	50	9,14	10,17	<0,05	1,73
Microkit	176	49,74	38,71	176	43,32	58,50	>0,05	1,15
TOTAL	275	7,34	-	275	7,17	-	>0,05	1,02

Tabla 3

Resultados del estudio interlaboratorio (tabla-resumen)

volumen por placa	BDF-NIVEA n=60	Bio-Accali n=24	Finaf 92 n=32	Microkit n=60	Total n=176
Σ 2 de 50 l	135,8±198,4	123,4±274,5	-	-	132,1±221,9
1 de 100 l	105,5±96,6	50,7±125,7	-	-	89,8±107,9
Σ 4 de 50 l	-	-	10,4±6,4	-	-
1 de 200 l	-	-	11,0±4,2	-	-
Σ 2 de 200 l	-	-	-	15,66±18,8	-
1 de 400 l	-	-	-	15,03±17,5	-

Tabla 4. Resultados expresados en ufc/m³, media ± desviación estándar. n= número de muestras.

Volumen: efecto desecación (del medio y consecuentemente de la pared celular). Muestra máxima y muestra mínima

Antecedentes

La experiencia previa en nuestro laboratorio nos ha permitido comprobar que recuperamos más ufc/m³ en 5 muestreos de 200 litros cada uno que en uno solo de 1.000 litros. Entendemos que el efecto desecación hace inviábiles a la mayor parte de microorganismos que impactaron en el medio en los primeros minutos del muestreo.

Lanzamos el interlaboratorio para comprobar donde está el punto de

inflexión, el volumen ideal de litros de muestreo por placa que ni es excesivo ni es deficiente. En nuestros muestreos hemos adoptado los 200 litros como volumen estandar.

Análisis estadístico realizado mediante la T de Student para datos independientes (tabla 4):

Aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas, sí se observa, al comparar los valores medios de recuentos totales, que la recuperación de aerobios totales es más alta si se realizan dos muestreos de 50 litros y se suman, que si se realiza un solo muestreo de 100 litros. En

volumenes mayores no se observa un aumento de recuperación cuando disminuimos el volumen muestreado por placa. Esto parece contradecir el clásico efecto desecación, pero si analizamos más a fondo el problema observamos que lo que ocurre es que aparece otra variable más importante aún que el volumen por placa: la humedad-tensión superficial de la placa, que nos impide ver resultados sin distorsiones. Por tanto, habría que repetir el estudio fijando con precisión esta nueva variable (humedad de la superficie de la placa, placas con la misma fecha de caducidad e idéntico aspecto) para llegar a conclusiones más fidedignas. O bien que cada usuario realice su propia validación interna de volumen máximo de muestreo por placa.

Temperatura: Alterativos y patógenos. Bacterias y hongos

Reabrimos una polémica clásica en microbiología de superficies: ¿Los microorganismos ambientales deben buscarse incubando a la temperatura del ambiente donde se encuentran o bien a la temperatura del cuerpo humano (35-37°C)?

La respuesta es fácil:

Si buscamos patógenos humanos, sean bacterias u hongos, incubemos a 37°C.

Si buscamos alterativos o alergénicos, incubemos a la temperatura a la que los hemos encontrado en su ambiente (21-25°C).

Pero no olvidemos los polémicos termoactinomicetes, que deben buscarse incubando a 55°C, en placas selladas para evitar su desecación.

Lo ideal es triplicar el muestreo e incubar una de las placas a 37°C, otra a 25°C y la otra a 55°C.

El tiempo de incubación es de (1) 2-3 (5) días.

Análisis estadístico realizado mediante la T de Student para datos independientes (tabla 5):

La recuperación de bacterias en Microkit es significativamente mayor a 21°C que a 37°C, mientras en los demás casos resulta al revés, lo que demuestra que el confinamiento humano (del que son indicadoras las bacterias crecidas a 37°C) en Microkit es excepcionalmente bajo.

Resultados del estudio interlaboratorio (tabla-resumen)

		AEROBIOS TOTALES			HONGOS		
		21°C	37°C	P	21°C	37°C	P
MICROKIT n=112	\bar{X}	43,30	14,38	<0,05	27,29	10,98	<0,05
	σ	36,40	16,93		27,97	17,65	
CENTRO MILITAR V. n=80	\bar{X}	88,34	128,36	>0,05	2,38	20,59	<0,05
	σ	81,20	195,39		5,35	36,78	
AYTO. TORREMOLINOS n=50	\bar{X}	14,04	18,42	>0,05	-	-	-
	σ	15,53	19,49		-	-	
UNIV. PAVIA n=50	\bar{X}	78,74	142,26	<0,05	-	-	-
	σ	47,24	87,39		-	-	
TOTAL	\bar{X}	67,66	57,23	>0,05	24,49	7,39	<0,05
	σ	114,14	75,65		32,01	14,52	

Tabla 5. Resultados expresados en ufc/m³. n=número de muestras comparadas. \bar{x} = media. σ = desviación estándar.

La recuperación de hongos es significativamente mayor a 21°C que a 37°C en todos los casos, como les corresponden a los microorganismos saprófitos.

No existe la menor correlación entre la flora crecida a 21°C y la flora crecida a 37°C, por lo que concluimos que se trata de poblaciones distintas: una es la saprófita, indicadora de higiene y otra la patógena o asociada al hombre, indicadora de confinamiento humano. Aunque en algunas especies los rangos de temperatura de crecimiento se solapan y sean capaces de crecer a ambas temperaturas, es necesario realizar duplicados e incubar una placa a 21°C y la otra a 37°C, porque de los resultados de la una no se pueden extrapolar los de la otra.

Medios de cultivo optimizados para la máxima recuperación

Antecedentes

En nuestra publicación de junio de 1992 *"Estudio comparativo entre diferentes medios de cultivo en placa de contacto para recuento total microbiológico en superficies"* ya demostrábamos la mayor capacidad del LPT-Neutralizing Agar para recuperar flora subletal de lugares limpios, frente a cualquier otro medio. Ahora se trata de ver si la experiencia se repite en la flora del aire.

Otra observación interesante es que los spreadings bacterianos típicos del PCA o en TSA en muestras de aire, se minimizan en el Agar LPT-Neutralizing.

El Agar R2, que tan excelentes resultados ha demostrado dar en aguas limpias en nuestra publicación de septiembre de 1999 *"Interlaboratorio sobre la recuperación de medios nutritivos para recuento total en aguas"*, ha sido también comparado en el aire con otros medios, al ser un ambiente tan estresante como el agua a causa de la desecación, la exposición a la luz solar directa y la oligotrofia: *"Valutazione delle variabili di campionamento nel monitoraggio indoor"*, Fondazione Salvatore Maugeri, Università di Pavia y Aquaria. Los resultados entre R2 y TSA en aire han resultado ser similares, sin ventajas significativas del uno frente al otro.

El Agar Rosa de Bengala con Cloranfenicol ha demostrado ser el medio que

mejor recupera los hongos, con recuentos medios del doble de ufc/placa que el resto de medios (SDA, OGYE, PDA, MEA...), como se demuestra en nuestra publicación de Mayo de 1996 *"Comparación entre los diversos medios comerciales para aislamiento de hongos (levaduras y mohos)"*. Lo cual significa que si encontramos una ufc en una placa de Rosa Bengala, es muy probable que diésemos la muestra como "libre de hongos" si el medio usado hubiese sido otro.

Otra observación del máximo interés es que en este medio los hongos de crecimiento rápido no se extienden, por lo que dejan crecer a las levaduras y mohos más lentos, que pueden así ser contados.

Si añadimos nuestros conocimientos anteriores, observaremos que 5 muestreos a 0,5 l/seg de 200 litros en Rosa Bengala obtendrán $1,15 \times 1,7 \times 2 = 3,91$ mayor recuperación que un muestreo del mismo aire a 1,5 l/seg de 1.000 litros en Sabouraud Caf. Agar, por ejemplo.

Todos los medios Microkit, (excepto el TSA puro) elaborados en placa de contacto, tienen dos grupos de aditivos que resultan fundamentales para una correcta recuperación microbiológica de las muestras de aire:

- Mix de inactivadores de los desinfectantes más utilizados. Sin él, las bacterias subletales o estresadas no crecen en los medios, como ocurre en la mayoría de nuestros competidores, que como mucho añaden Lecitina y Tween 80, y sólo al TSA.
- Gel antidesecante para aumentar la resistencia del medio a los largos y potentes flujos de aire de los muestreadores de impacto. Sin él el medio deja de ceder agua a las paredes celulares mucho antes, por lo que la recuperación es menor. Y la caducidad sería menor, como en las placas de contacto de nuestros competidores.

Aunque en general las elevadas desviaciones estándar les restan valor estadístico a los resultados, al comparar las medias observamos que el Agar Neutralizing recupera más bacterias que el PCA y que el TSA (excepto en la Universidad de Pavia, donde se lo prepararon ellos en vez de utilizar placas Envirocount de Neutralizing

Microkit, por lo que desconocemos la conservación y consecuente viabilidad del medio utilizado). El Agar Neutralizing recupera más bacterias y hongos que el PCA. El Rosa Bengala Caf. recupera más hongos que el Sabouraud Caf. Agar. Por fin, se desperdician menos placas de Agar Neutralizing que de TSA a causa de la menor aparición de spreadings bacterianos en las primeras.

Recuento en superficies y en el aire ¿existe alguna correlación?

Algunas publicaciones hablan de despreciar la microbiología de las superficies si ya controlamos la del aire, o viceversa. Como nuestra experiencia nos enseña a no poder estar más en desacuerdo con esas afirmaciones, lanzamos un estudio interlaboratorio que demuestre estadísticamente qué hay de cierto en ellas. En las más de 500 muestras comparativas, resultan demasiados valores muy altos en superficies y muy bajos en el aire junto a demasiados valores muy bajos en superficies y muy altos en el aire. A la vista de los resultados, y mediante tratamiento estadístico, no se ha podido establecer ninguna correlación lineal entre los niveles de contaminación microbiológica del aire y los de las superficies vecinas. Concluimos que la correlación entre microplanton y microbentos en ambientes humanos no existe, como es lógico porque la influencia humana rompe el flujo de energía natural típico de otros ecosistemas (lagos, océanos): Al aportar las personas nutrientes al microbentos de forma tan intensa, el aporte debido al microplanton es comparativamente tan ínfimo que resulta indetectable. Es como la vegetación ruderal, que crece abundantemente sólo junto a los caminos (transitados por el hombre) que atraviesan un erial.

¿Aumenta la sensibilidad un mayor número de poros en el cabezal?

Este estudio no ha podido ser interlaboratorio, ya que no hay cabezales de 1.000 poros adaptables a los equipos normales de muestreo. Se ha realizado íntegramente en nuestro laboratorio, elaborando dos cabezales artesanalmente, idénticos, uno con 200 poros y otro con 1.000.

0,5 l/seg	AEROBIOS TOTALES		HONGOS	
	200 POROS	1000 POROS	200 POROS	1000 POROS
\bar{x}	13,2	10,02	37,55	38,27
σ	6,67	5,53	11,57	11,07
$\frac{\bar{x}_{200}}{\bar{x}_{1000}}$	1,32		0,98	

Tabla 6. Tamaño de la muestra: 100 duplicados, \bar{x} = media, σ = desviación estándar

Análisis estadístico realizado mediante la T de Student para datos independientes. (Tabla 6).

El nivel de recuperación de aerobios totales fue significativamente mayor ($P < 0,05$) con cabezales de 200 poros que con cabezales de 1.000 poros, cuando no se varía ningún otro parámetro. La turbulencia creada con 1.000 poros provoca el efecto rebote en un 32% de las bacterias.

No se encuentran diferencias significativas en la recuperación de hongos cuando variamos el número de poros del cabezal, lo que vuelve a demostrar que sus esporas son demasiado grandes como para que les influyan las turbulencias del muestreo.

Se nos criticó por realizar este estudio con sólo el caudal suave (0,5 l/seg, 30 l/min). Por ello, posteriormente, hemos comparado otras 100 muestras, con los dos cabezales a caudal rápido (2 l/seg, 120 l/min) para ver si es cierto que, para optimizar la recuperación, el número ideal de poros dependerá del caudal, como decía quien nos criticaba. Los resultados son (Tabla 7):

En efecto hay variaciones, pro así como a un caudal de 2 l/seg con 1.000 poros recuperamos un 17% más de bacterias que con 200 poros, con 1.000 poros también recuperamos nada menos que un 84% menos de hongos (levaduras y mohos) que con 200 poros, por lo que concluimos que hay factores que se escapan a esta comparación, aunque los valores de recuperación máxima se han dado, tanto a 0,5

l/seg como a 2 l/seg, con 200 poros: 32% más bacterias a 0,5 l/seg con 200 poros que con 1.000 poros (un 15% más que la diferencia entre 1.000/200 poros a 2 l/seg) y 84% más hongos - levaduras y mohos- a 2 l/seg con 200 poros que con 1.000 poros).

Además, reiteramos que las tablas de NMP están preparadas para los muestreadores de impacto clásicos, de 220 poros, por lo que sólo con estos puede hablarse del factor de corrección de los resultados.

Por todo ello, y si cabe aún más convencidos, seguiremos recomendando el uso de caudales suaves con 200 poros para obtener la máxima recuperación de bacterias y, como novedad, si usamos caudales rápidos, que sea también con 200 poros para obtener la máxima recuperación de hongos (levaduras y mohos).

El Instituto Aeroespacial de la Universidad Politécnica de Milán acaba de publicar una tesis doctoral (Roberta F. Bellazzi) explicando qué ocurre dentro del cabezal del muestreador a los diferentes caudales. Las conclusiones de la tesis dicen que la eficacia de Microflow es excelente porque la velocidad de impacto a todos los caudales es muy baja, el flujo llega perfectamente perpendicular al medio de cultivo y homogéneo en toda la superficie de la placa. De este modo, la supervivencia de las células no se ve afectada con el impacto (Ésto afecta tanto a Microflow-clásico como al moderno Microflow-90 que usa placas Petri de 90 mm).

2 l/seg	AEROBIOS TOTALES		HONGOS	
	200 POROS	1000 POROS	200 POROS	1000 POROS
\bar{x}	2,13	2,58	2,01	1,09
σ	3,12	5,37	1,98	1,75
$\frac{\bar{x}_{200}}{\bar{x}_{1000}}$	0,83		1,84	

Tabla 7. Tamaño de la muestra: 100 duplicados, \bar{x} = media, σ = desviación estándar

Conclusiones de los estudios interlaboratorio

De los resultados de este intenso proyecto de estudios interlaboratorios coordinados por Microkit durante 1998-1999, extraemos varias conclusiones del máximo interés. Esto es lo que hemos aprendido:

- En superficies hemos aprendido que la distribución de microorganismos es contagiosa, no homogénea, por lo que la muestra mínima debe ser de 100-125 cm².
 - También en superficies demostramos que en los ecosistemas humanos el aporte del microplancton al bentos de la superficie es totalmente despreciable: no hay correlación entre el recuento total del aire y el recuento total de las superficies colindantes, por lo que debemos realizar ambos muestreos: superficie y aire.
 - En cuanto al aire, hemos aprendido que hay que reducir los caudales standard de 90-100 litros por minuto a niveles de 30 litros por minuto para aumentar la sensibilidad frente a bacterias de forma contundente (210% más en algunas muestras y 30-50% más en la mayoría de muestras, 20% más en las muestras con menos diferencias). Sólo Microflow y otro muestreador que aún no ha salido al mercado permiten caudales tan suaves, sin renunciar a los otros que también incluyen, cuando la baja calidad microbiológica del aire lo permita.
 - También en el aire comprobamos que el efecto desecación, y su consecuente menor recuperación, no depende sólo del volumen de muestreo (a mayor volumen por placa, peor recuperación), sino que aparecen con fuerza nuevos parámetros variables que interfieren en los resultados: la humedad del medio de cultivo, la tensión superficial del medio de cultivo y la humedad atmosférica. Temas que habría que cuantificar en nuevos estudios interlaboratorio muy bien estandarizados y repetir el interlaboratorio de volúmenes, fijando dichas nuevas variables.
- En consecuencia, aconsejamos no usar placas viejas, sin superficie húmeda y, por tanto, no comprar

placas que no estén doblemente embolsadas en celofán hermético, sino Envirocount de Microkit.

- Siguiendo con el aire, hemos aprendido que no deben usarse medios sin inactivadores de los desinfectantes usados (no sólo lecitina y tween para los amonios, también tiosulfato para la lejía y cloro, inactivadores para compuestos aromáticos: fenoles-bencenos...). Por ello recomendamos encarecidamente el uso del agar LPT-Neutralizing.
- Tampoco deben usarse, para muestras de aire, medios sin gelificantes especiales (ej.: antiburbujas Microkit) que reduzcan la tensión superficial, la desecación y el consecuente efecto rebote.
- Para hongos ambientales, hemos aprendido a usar el agar rosa bengala CAF., porque recupera un 200% más de UFC/placa que cualquier otro medio de cultivo, al impedir que los mohos rápidos invadan la placa, permitiendo el crecimiento de mohos lentos, incluidos los patógenos, a diferencia de todos los demás medios para hongos.
- También hoy hemos aprendido que debemos muestrear en el aire las bacterias por duplicado, para incubarlas a dos temperaturas: una placa a 25°C para saprófitos y alterativos y otra a 37°C para patógenos e indicadores de confinamiento humano,

ya que no existe correlación entre los recuentos obtenidos a las dos temperaturas, no se puede extrapolar el recuento a una temperatura del recuento a la otra.

- Y por último, hemos aprendido que debemos utilizar muestreadores de aire estandarizados con 220 poros por cabezal, ya que un mayor número de poros aumenta la turbulencia y, por tanto, disminuye hasta un 32% la sensibilidad frente a bacterias. Además, así podemos aplicar el factor de corrección NMP, que está calculado para los 220 poros de los muestreadores clásicos como Microflow.

Nota final 1: Acabamos de demostrar en un estudio adicional interno que el muestreador Microflow si es capaz de recuperar *Legionella pneumophila* directamente del aire cercano a duchas, sobre placas de contacto BCYE Selectivo, lo cual contradice las conclusiones de diversos autores con otros muestreadores. Curiosamente, la máxima recuperación se da a los dos caudales extremos: a 2 l/seg, probablemente porque el muestreador absorbe las micropartículas pesadas de agua contaminadas y a 0,5 l/seg, posiblemente porque absorbe directamente las células sueltas. A los otros 3 caudales medianos también hay recuperación, cuantitativamente menor, pero cualitativamente existente. Esta conclusión

no anula la necesidad del muestreo de *Legionella* en agua, pero facilita la posibilidad de su búsqueda adicional en aire.

Nota final 2: En la actualidad estamos estudiando si existe diferencia significativa entre usar Placas de Contacto o usar Placas de Petri en un muestreador de aire. Aunque aún no tenemos los datos definitivos, podemos aventurarnos, sin el menor riesgo, a garantizar que el uso de Placas de Contacto implica, al menos, una recuperación de un 200% superior que el uso de Placas Petri, a causa del aumento del efecto rebote provocado por el reflujó entre las paredes de la Placa Petri y el medio, y que no existe en las Placas de Contacto, por carecer éstas de pared por encima del medio. La teoría era evidente desde hace años, pero no esperábamos diferencias tan significativas.

Esperamos que este resumen del inmenso esfuerzo realizado por quien menos obligado estaba a ello, una casa comercial y varios de sus clientes, permita la aplicación de todos estos datos de superficies y aires a quienes corresponde emitir normas y leyes.

Jorge Sanchis Solera
Biólogo

Director técnico de Laboratorios
Microkit, S.L.



**LABORATORIOS
MICROKIT, S.L.**



Apdo. de correos/ P.O. Box 44 - 28210 Madrid (Spain) - T. (34) 91 897 46 16 - Fax. (34) 91 897 46 41 -
Web: www.bme.es/microkit

La más completa gama de kits y medios de cultivo necesarios para un riguroso control microbiológico de:

- Aguas (potables, envasadas, marinas, de piscinas,...)
- Aires (interiores, salas blancas, potables, alterativos, emisiones biocontaminantes,...)
- Superficies e higiene ARICPC
- Alimentos (microorganismos alterativos y toxiinfecciosos)
- Medicamentos
- Cosméticos

Todos nuestros productos están fabricados y/o comercializados en España bajo Norma ISO 9002, por una plantilla de biólogos al 100%.

Más de 1.000 productos y asesoría disponibles con sólo marcar nuestro teléfono.