

## Los nueve parámetros más críticos en el muestreo biológico del aire

Jorge Sanchis Solera. Laboratorios Microkit, S.L.

*Se analizan los parámetros que más incidencia tienen, en la experiencia propia y en la de los clientes de Laboratorios Microkit (estudio interlaboratorio con 18 entidades participantes) en una óptima recuperación de los microorganismos, tanto bacterias como hongos, en el muestreo del aire.*

*Las diferencias cuantitativas entre un muestreo normal y un muestreo optimizado mediante todos estos factores son tan significativas que estamos hablando de un salto de escala en la sensibilidad del recuento microbiológico del aire, ya que de realizarlo bien a realizarlo mal encontramos diferencias en el recuento, tanto en bacterias como en hongos del aeroplancton, de hasta un 2.000%.*

### Introducción

Todo lo que vamos a comentar procede de la experiencia propia de 5 años trabajando intensamente en microbiología del aire, sumada a la experiencia aportada por numerosos clientes de Laboratorios Microkit, procedentes de las más diversas ramas de la microbiología ambiental: desde laboratorios farmacéuticos con salas estériles, pasando por higienistas del ramo de la seguridad laboral, por microbiólogos de la industria alimentaria, de depuradoras de aguas residuales, de quirófanos, del sector oficial, de la universidad, etc., de España e Italia.

Es muy importante tener en cuenta todo lo que vamos a aprender aquí hoy sobre el muestreo, porque de lo contrario podemos cometer errores en el recuento que hemos estimado con incertidumbres superiores al 2.000% (haciéndolo todo bien a mí me salen 2.000 colonias por metro cúbico y a otro señor que no tiene en cuenta nada de todo esto le salen 90 unidades formadoras de colonias (ufc)/m<sup>3</sup> de media, con dispersiones inmensas entre unos muestreos y otros), lo cual es totalmente aberrante, inaceptable y sin posible comparación en otros campos de la microbiología.

### 1. Métodos de muestreo, desde la sedimentación pasiva hasta el Microflow

Tradicionalmente los muestreos del aeroplancton se venían realizando mediante el método llamado "de sedimentación pasiva", consistente en dejar unas placas Petri con medio de cultivo general, abiertas durante 10 o 20 minutos, y esperar que sedimentaran los microorganismos de la columna. Es un claro método cualitativo, a lo sumo semicuantitativo, que sirve para andar por casa, nunca para comparar resultados entre diferentes salas, por lo que no es estandarizable, no se pueden dar los resultados en el estándar reconocido ufc/m<sup>3</sup>, sino en ufc/placa, por mucho que algunos autores digan que si en este método nos salen por ejemplo 7 colonias, multipliquemos por 10 y demos como resultado 70 ufc/m<sup>3</sup>; este es un típico error de aplicación estadística de medias sin tener en cuenta que las varianzas son tan altas que desvirtúan cualquier correlación. En nuestra opinión, el método de la sedimentación pasiva puede usarse sólo para echar un vistazo previo, pero ni siquiera deberíamos registrar los resultados obtenidos tan rudimentariamente. Surgieron después numerosos métodos que se han ido utilizando, desde la filtración por membrana de gelatina que luego se

incuba sobre una placa, hasta la centrifugación del aire sobre un medio de cultivo en forma de anillo, el burbujeo del aire por un caldo de cultivo, o el control de superficies suponiendo erróneamente que existe una correlación entre el recuento de una superficie y el del aire que la rodea (nosotros hemos demostrado que no existe tal correlación en ambientes ligados al hombre, por aportar éste una ingente cantidad de microorganismos que desvirtúan cualquier resultado comparativo, y por tanto hay que realizar ambos controles, de superficies y de aire). Por fin surgió con fuerza el método de impacto del aire sobre un medio de cultivo a una velocidad/caudal controlados.

A la vista de tan variados métodos de muestreo, la primera conclusión que debemos extraer es que un recuento dado sin especificar el método de muestreo empleado no nos vale para comparar nada.

Por suerte, más del 95% de los microbiólogos del aire han elegido desde la última década el método de impacto, que sin ser el más sensible (lo es el burbujeo, pero éste es demasiado engorroso para usarlo en el muestreo cotidiano), sí es el más cómodo de utilizar y para el que han proliferado numerosos equipos más o menos perfeccionados.

El más sofisticado de los muestreadores de impacto, que Laboratorios Microkit representa en España, es el Microflow, al ser el único que permite muestrear a 5 caudales diferentes, y nótese que hablamos de caudales, volúmenes de aire por unidad de tiempo, no de volúmenes a secas que sí son capaces de variar otros muestreadores. Veremos más adelante que la importancia del caudal en la sensibilidad del recuento para los diferentes tipos de aire, puede aportar un 200% de diferencias de recuento dentro de ese 2.000% total del que hablábamos al principio.

## 2. Número y localización de las muestras

Una de las preguntas más habituales de los microbiólogos noveles en microbiología del aire es ésta: ¿cuántas muestras tomo en cada sala y cuáles son los puntos críticos donde debo centrarme?

Una muestra debe ser representativa de la población completa, pero a su vez, lo más pequeña posible. En nuestra experiencia, el número de muestras ideal, ni demasiado escaso, ni excesivo, es tan simple y tan lógico como el resultado de realizar la raíz cúbica del volumen de la sala.

En cuanto a los puntos críticos, son los de entrada de aire externo, sean ventanas, puertas de esclusas o filtros, así como los rincones donde puede fallar la circulación del aire de la sala, los alrededores de los obstáculos a dicha circulación, como los muebles, máquinas, etc. En los protocolos de microbiología del aire editados por Laboratorios Microkit se localizan los principales puntos críticos para cada tipo de sala, así como las frecuencias de muestreo más aceptadas en bibliografía.

Y por supuesto, el punto crítico principal es la presencia de personas, que somos los que realizamos el mayor aporte de micro-

organismos al aire que nos rodea, desde los operarios hasta el mismo analista del aire. Por eso siempre hay que tomar las muestras en presencia de los trabajadores habituales de la sala. Es difícil cuantificar la importancia de este dato porque las diferencias de recuento con o sin personas sufren varianzas elevadísimas, pero es evidente que el factor es de la máxima importancia.

## 3. Temperaturas de incubación

En el aire existen básicamente dos poblaciones microbianas (aparte de los actinomicetes termófilos de ciertos tipos de aire, como el de las tenerías, fábricas textiles, silos, etc.): La saprofita o alterativa y la patógena o asociada al hombre.

La población saprofita es la que crece a temperatura ambiente de la sala, y esto suele ser alrededor de  $21 \pm 6$  °C, aunque una proporción de dicha población también sea capaz de crecer a 35-37 °C, como son muchos *Micrococcus*, muchos *Bacillus* y el monstruo oportunista de los quirófanos, el hongo *Aspergillus fumigatus*.

La población patógena o asociada al hombre es la que crece a la temperatura del cuerpo humano, esto es,  $37 \pm 5$  °C.

No podemos caer en la trampa de incubar a 35-37 °C las placas de recuento total de aire, a no ser que estemos buscando estrictamente la población patógena y su indicadora, asociada al hombre, como es el caso de los quirófanos. Porque la misma definición de agente biológico nos alerta de que es el ser vivo o parte de él capaz de provocar no sólo infecciones, sino también alergias e intoxicaciones. Y la mayoría de alergias causadas por microorganismos se deben a mohos saprofitos, como muchas especies de *Alternaria*, de *Aspergillus*, de *Penicillium*, etc. Y buena parte de las toxinas proceden también de mohos saprofitos, como muchas especies de *Fusarium* o *Aspergillus flavus*, principal productor de las famosas aflatoxinas.

En todos los tipos de aire, incluidos los de los edificios, lo ideal es tomar muestras duplicadas para bacterias, incubando una placa a 21 °C y la otra a 37 °C. Los resultados se pueden expresar como ufc/m<sup>3</sup> a 21 °C y como ufc/m<sup>3</sup> a 37 °C. Podremos obtener después índices de confinamiento en función de que los recuentos de la población patógena superen o no a los de la saprofita, etc. En aires sanos esto debería ser siempre al revés, dominando las poblaciones saprofitas sobre las patógenas. Además deberán tomarse muestras en Agar Rosa Bengala Caf. para hongos saprofitos (incubar a 21-25 °C).

De todo esto se deduce que no basta con realizar un recuento y comparar con el típico valor límite oficioso del aire de los edificios según el cual "menor de 200-500 ufc/m<sup>3</sup>" presupone que, en principio, no debería haber problemas. Además hay que aplicar el criterio profesional e identificar las colonias para ver si hay algún patógeno o asociado al hombre (por ejemplo, *Streptococcus mutans* también se usa como indicador de confinamiento), algún alergénico o algún toxigénico.

#### 4. Factor de corrección NMP

Cuando utilizamos un muestreador de impacto, el número de poros del cabezal es directamente proporcional a la recuperación obtenida, al disminuir la probabilidad de solapamiento entre unidades formadoras de colonias.

La mayoría de equipos cuentan con cabezales de 220 poros, como Microflow. Ya en los años 70, Macher elaboró unas tablas de corrección del Número Más Probable para solventar este tema, para muestreadores de 220 poros (otros muestreadores no pueden basarse en estas tablas NMP). Observando dicha tabla NMP nos damos cuenta de que el factor de corrección es importante para recuentos bajos, por ejemplo, obteniendo en placa 100 ufc/m<sup>3</sup>, aplica un recuento real de 133 ufc/m<sup>3</sup>, un 133%, pero es aún mucho más importante para recuentos altos, por ejemplo con 200 ufc/m<sup>3</sup> obtenidos en placa aplica un recuento real de 530 ufc/m<sup>3</sup>, que es un 265%. Por eso es tan importante especificar si los datos que damos son o no corregidos por NMP, porque de lo contrario contribuimos a la máxima incertidumbre parcial de entre los 9 parámetros que influyen en ese 2.000% del que hablábamos al principio, con incluso más del 500%.

#### 5. Importancia del concepto de ufc en el aire

El método de recuento presupone que de cada microorganismo presente en una muestra obtendremos una colonia en la placa de medio de cultivo, y que el número de colonias es por tanto el número de microorganismos de la muestra. Sin embargo, ya hemos visto en el capítulo anterior uno de los factores por los cuales no podemos simplificar tanto: el solapamiento de colonias. Hay otras muchas interferencias, como microorganismos no viables en el medio de cultivo utilizado, colonias que proceden de microcolonias (mono- o pluriespecíficas), entre otras. Por eso en microbiología, los recuentos se dan en una unidad denominada ufc, unidades formadoras de colonias, en vez de microorganismos. Observamos un ejemplo claro de la influencia del medio de cultivo utilizado en la sensibilidad, a causa del solapamiento, en el clásico Agar Sabouraud para hongos. En cambio, en el Agar Rosa de Bengala los mohos lentos son capaces de detectarse porque los rápidos no invaden la placa; en el medio Sabouraud, el recuento es muy a menudo inviable porque los mohos rápidos han invadido la placa y no nos han permitido ver que había otras especies y otras colonias.

Por otra parte, los microorganismos en el aire, al igual que en las superficies, en el agua, y en otras muchas matrices, no se distribuyen de forma homogénea, por lo que no siguen la típica distribución estadística de la campana de Gauss. Su modelo de distribución se acerca más al de Poisson, por lo que, repasando bioestadística, hemos de ser conscientes de que para trabajar con los datos comparativos de muestras y poblaciones microbiológicas, debemos siempre convertir los resultados a logaritmos, y tras realizar las medias, desviaciones y demás cálculos, reconvertir al antilogaritmo. De todas formas, en microbiología del aire y de las superficies, abundan casos aún más extremos,

donde debemos hablar de distribución contagiosa: Los microorganismos no se encuentran sólo dispersos al azar, heterogéneamente, sino que además se concentran abundantemente en clusters o microcolonias alrededor de partículas de materia orgánica o inorgánica (polvo), y rodeados de inmensos vacíos. Esto implica que en aires muy limpios, como los de las salas blancas, la muestra mínima representativa no pueda ser menor de 1.000 l, es decir, 1 m<sup>3</sup>. Sin embargo, por otro motivo que veremos después (deseccación de la pared celular durante el muestreo), no recomendamos muestreos por placa superiores a 200 l. Si el aire es muy limpio, se toman 5 placas por muestra y se suman los resultados. Si es el aire típico de los edificios de oficinas, presuntamente menos limpios, con tomar una placa de 200 l y multiplicar el resultado por 5 para obtener ufc/m<sup>3</sup>, consideramos que el muestreo es suficientemente representativo, porque no hemos encontrado diferencias significativas entre sumar 5 muestreos de 200 l y multiplicar por 5 un solo muestreo de 200 l.

#### 6. Efecto desecación (de la pared celular)

Cuando muestreamos por el método de impacto, toda célula que se queda en la superficie del medio de cultivo sufre una reacción de stress que se suma a la que ya tenía en el aire, a causa no solo del impacto (por eso veremos en los dos puntos siguientes que la velocidad de impacto no puede ser excesiva), sino sobre todo a causa de la cantidad de aire que va a pasar a su lado desde el momento del impacto hasta el fin del muestreo. Si el aire solo ya seca, el viento deshidrata. Por eso se habla de efecto desecación en el muestreo, pero este efecto no se refiere a la desecación del medio de cultivo, que en casos extremos también es importante, sino a la desecación de la pared celular, que puede llegar a hacer inviable, irrecuperable, una buena proporción de la población captada.

Hemos observado que muestreos de más de 7 minutos (más de 200 l de muestra de aire a un caudal suave de 0,5 l/s) no recuperan un recuento significativamente superior a muestreos de 6,66 minutos (200 l de muestra de aire a un caudal suave de 0,5 l/s), a causa de este efecto desecación. Por eso nuestra muestra estándar elegida es de 200 l por placa.

Si el efecto desecación afecta al recuento, imaginemos cuánto afectará a las especies que sólo sobreviven en el aire cuando están asociadas a partículas de agua, como es el caso de la *Legionella pneumophila*. Por ello hay autores que se declaran incapaces de encontrarla en el aire, cuando lo que están utilizando son muestreadores y otros parámetros ineficaces. Nosotros hemos captado este microorganismo en el aire de duchas reiteradas veces y a todos los caudales de Microflow, mediante nuestras placas de contacto de Agar BCYE+GVPC. Y es evidente que, durante los brotes, la Legionella está en el aire. Otra cosa es que sea más fácil detectarla en el agua, donde su número siempre es muy superior.

Naturalmente, la cantidad de agua que el medio de cultivo sea capaz de aportar a las células durante el tiempo de muestreo también es crucial para minimizar este efecto desecación. Por

ello es tan importante utilizar medios de cultivo con "antideseccante". Ha resultado ideal como antideseccante el líquido que usamos en Laboratorios Microkit para elaborar placas libres de burbujas, el llamado "antiburbujas". No caeremos en el error de decir que es mejor usar placas de Petri porque tienen más medio de cultivo que las placas de contacto o "placa Rodac", porque hay un factor de mayor importancia que nos obliga a recomendar las segundas sobre las primeras, debido a las turbulencias del aire creadas dentro del muestreador a causa de la placa Petri: el "efecto rebote/paso de largo", que es el que se contempla en el capítulo siguiente.

### 7. Efecto rebote y efecto "paso de largo"

Cuando el aire entra en un muestreador de impacto se debe garantizar que no se producen turbulencias, ya que éstas dificultan de modo importante el impacto de las células sobre la superficie del medio de cultivo.

El origen de las turbulencias suele ser doble:

- Las debidas al formato de la placa de medio de cultivo y
  - Las debidas a la velocidad de impacto del aire sobre el medio.
- Veremos en este capítulo el primer factor, y en el siguiente capítulo el segundo.

Si comparamos la placa de Petri clásica con la placa de contacto o "Rodac", ya llenas con su medio de cultivo, a simple vista hay una diferencia fundamental: la superficie de la placa Petri es plana, y está rodeada por una pared de plástico de altura considerable; mientras que la superficie de la placa de contacto o "Rodac" es convexa y no está rodeada de obstáculo alguno. Tradicionalmente, la escuela mediterránea ha utilizado "placa Rodac" y la centroeuropea, la placa de Petri. En nuestro país, la industria y sector medioambiental usan mayormente "placa Rodac" y en clínica se suele usar placa Petri.

La bibliografía citada al final del artículo apunta que el uso de la "placa Rodac" es más recomendable que el de placa Petri por este tema, aunque no habla estudios que cuantificasen este efecto. Cuando procedimos a cuantificarlo mediante un estudio comparativo que se publicó hace dos años (*Técnicas de Laboratorio* nº 256) quedamos asustados de que el valor medio de recuento con "placa Rodac" era superior al 300%, tanto para bacterias como para mohos, por encima del recuento en placa Petri. De modo que dentro del 2.000% de diferencias obtenidas en el recuento entre un buen muestreo y un muestreo deficiente, del que hablábamos en la introducción, el uso de "placa Rodac" en vez de placa Petri colabora con un fundamental 300%.

### 8. Velocidad de impacto y caudal de muestreo

Decíamos en el capítulo anterior que las turbulencias que nunca deberían ocurrir en un muestreador de aire se debían a dos fac-

tores principales: el formato del medio de cultivo y la velocidad de impacto. Analizaremos ahora este segundo parámetro.

Además de la ley física de que "a mayor velocidad, mayor turbulencia", partimos de la premisa de que habrá una velocidad umbral a partir de la cual el impacto de la célula contra el medio de cultivo, aunque hayamos disminuido la tensión superficial de éste mediante nuestro famoso "antiburbujas", será letal e impedirá la posterior recuperación celular.

La velocidad (espacio recorrido por unidad de tiempo) con la que impacta la célula del microorganismo suspendido en el aire contra el medio de cultivo, es directamente proporcional al caudal (volumen de aire muestreado por unidad de tiempo). Para Microflow, las velocidades de impacto para los diferentes caudales son:

Caudal		Velocidad
l/s	l/minuto	m/s
0,5	30	2,9
1	60	5,8
1,5	90	8,7
1,67	100	9,7
2	120	11,6

Todas estas velocidades de impacto cumplen con los valores de velocidad máxima de impacto regulados en la normativa aplicable.

Nuestro estudio intercolaborativo de 1999, publicado en septiembre de 2000 en la revista *Bio* del Colegio Oficial de Biólogos, demostró que la recuperación de las bacterias a caudal bajo (0,5 l/s o 30 l/minuto) era el doble (200%) que al caudal estándar de otros muestreadores (1,5 l/s o 90 l/minuto), mientras que los mohos, al ser más duras sus esporas, no sufrían diferencias de recuento a estas diferencias de velocidad de impacto. Por ello, la incidencia del caudal de muestreo dentro de las diferencias del 2.000% en el recuento del que hablábamos en la introducción, aporta un 200% del total, en bacterias.

### 9. Inactivación de los residuos de todos los desinfectantes utilizados

Es muy importante tomar siempre un blanco de muestreo, y este blanco ideal es el aire de los alrededores de la sala de muestreo, en la calle. No puede ser lo mismo el aire de un edificio rodeado de plantaciones de naranja, que podrá estar cargado de mohos procedentes de las naranjas que se descartan del árbol y se tiran al suelo en cierta época para que las otras naranjas salgan más grandes, que el sometido a una limpia brisa del mar, por ejemplo.

Del mismo modo que en microbiología del agua nadie se extra-

ña al ver añadir a las muestras, antes de analizarlas, tiosulfato sódico para inactivar el efecto del cloro residual, o en cosmética diferentes inactivadores de los conservantes que se añaden al fabricar el cosmético para darle viabilidad, en microbiología de superficies y del aire nadie debe echarse las manos a la cabeza cuando hablamos de la importancia fundamental de eliminar durante el muestreo y la posterior incubación del medio, los residuos de los desinfectantes previamente utilizados.

El medio de cultivo ideal para recuento total bacteriano en aires que están sometidos a cualquier tipo de desinfección, es el Agar Neutralizing, medio con base TSA al que añadimos inactivadores de todo tipo de desinfectantes: amonios cuaternarios, derivados bencénicos, formol, lejía-cloro, glutaraldehído... Por eso su recuperaciones, como media, del 200% que la de los medios generales tipo TSA, PCA, Nutrient Agar, etc. Y ello es también patente por la elevada diversidad de tipos de colonias que se aprecia en las placas de este medio.

De modo que el aporte de este factor a la diferencia global del 2.000% del que hablábamos en la introducción sobre el recuento, optimizando los 9 parámetros de muestreo de aire, es del 200%.

### Apéndice: coloquio

En el posterior coloquio hubo siete intervenciones en referencia a esta conferencia; resaltamos cuatro de ellas porque complementan muy bien ciertos aspectos:

1. Otro parámetro que tener en cuenta serían las condiciones de conservación de las placas desde el lugar del muestreo hasta el de análisis.

- Es cierto, aunque sabemos que las normas ISO ya suelen tener en cuenta este tema y seguro que la Norma que se está desarrollando en España, con varios representantes aquí presentes, lo tendrá en cuenta.

2. Y los hongos del aire ¿a qué temperatura los incubamos?

A 21-25 °C, ya que los patógenos habituales tipo *Aspergillus fumigatus* son simples saprofitos oportunistas. Pero si buscamos también dermatofitos o patógenos estrictos, haremos un duplicado a 37 °C.

3. Si hubiera placas de contacto de gran superficie ¿ahorraríamos recuentos bajos, cuya incertidumbre es mayor?

- Seguro, pero no aumentaríamos la sensibilidad, ya que en los blancos que utilizamos (placa Petri rebosando) el recuento era igual al de la placa de contacto tradicional de 60 mm y en los "negros" que utilizamos (plaquitas de 60 mm sin rebosar) el recuento era incluso más bajo que en placa Petri sin rebosar (por su mayor relación montaña/valle).

4. ¿Dónde han encontrado *Legionella* en el aire con su muestreador y con un recuento tan alto como el de la diapositiva que ha mostrado?

- Tras aclarar que la foto no proviene de un muestreo del aire, sino que es una siembra por agotamiento para que vieran el aspecto de *L. pneumophila* en el Agar BCYE+GVPC, contesto que reiteradamente, junto a duchas recién abiertas de hoteles que pasan la temporada no turística prácticamente vacíos; pero es evidente que donde hay un brote es porque la *Legionella* está en el aire, aunque está claro que es mejor buscarla donde es mucho más abundante y estable, en el agua.

### Bibliografía

- Proyecto Microkit 1999 para optimizar la sensibilidad de los parámetros del muestreo microbiológico del aire. J. Sanchis Solera. Revista *BIO* del Colegio Oficial de Biólogos, septiembre de 2000.

- Muestreo de aire, ¿con placa de contacto o con Placa Petri? Ana Donate Fernández/Miriam Ibáñez López, Laboratorios Microkit. Revista *Técnicas de Laboratorio*, nº 256, noviembre de 2000.

Fax: 91 897 46 41.