

NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras

Agents Biologiques. Analyse des échantillons
Biological Agents. Sample analysis

Las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición.

Redactora:

Ana Hernández Calleja
Lda en Ciencias biológicas

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

En esta nota técnica, que forma parte de la serie dedicada a la medición de agentes biológicos, se describen los principales ensayos analíticos aplicables a los diferentes tipos de agentes biológicos.

Introducción

Esta nota técnica de prevención trata de exponer los principales métodos de análisis de los diferentes tipos de muestras: ambientales, materias (polvo, líquido) o de superficie disponibles para la caracterización de los agentes biológicos.

Las muestras son analizadas cuantitativamente y cualitativamente con el objetivo de:

- Identificar los agentes biológicos y comprender las condiciones ambientales que han favorecido su presencia.
- Demostrar las vías de exposición, desde los focos de contaminación hasta los trabajadores.
- Medir la exposición laboral a agentes biológicos y comprender las relaciones exposición - respuesta.

Elección del método de análisis

Una de las primeras cuestiones que un técnico debería formularse cuando decide realizar la medición de agentes biológicos es: ¿Qué tipos de agentes biológicos pueden estar presentes en un ambiente?, seguida de: ¿En qué cantidad pueden estar presentes?

La respuesta a estas cuestiones le permitirá abordar el estudio con las mejores garantías, es decir, que la medición le posibilitará confirmar las hipótesis establecidas y de la manera más fiable y representativa posible. Asimismo, anticipar esas respuestas puede facilitar el ahorro de tiempo y dinero en la medición y evitar los datos que nada aportan al estudio, antes bien, pueden conducir a errores en la evaluación de las exposiciones a agentes biológicos.

Dependiendo del objetivo de la medición se pueden distinguir tres aproximaciones a la misma: estudios generales, estudios de indicadores y estudios focalizados.

Estudios generales

En esos casos el interés se centra en conocer, de la forma más amplia que sea posible, los diferentes tipos de agentes biológicos que pueden estar presentes. Estos estudios son de aplicación cuando, en principio, se desconoce la composición (tipos y concentraciones) de agentes biológicos ligados a la actividad laboral.

Los métodos más comúnmente empleados en la actualidad, son los basados en el cultivo de los microorganismos en medio gelatinoso (agar). Otros métodos son los que consisten en la observación directa al microscopio y los que evalúan la diversidad microbiana.

La práctica totalidad de métodos generales de ensayo presentan un cierto sesgo; por ejemplo, el cultivo de microorganismos (bacterias y hongos), permite detectar sólo algunos grupos de microorganismos, no poniendo de manifiesto la presencia de otros que, por alguna razón, no son cultivables. Estos métodos permiten la detección, por tanto, de microorganismos que están vivos, en condiciones de crecer en cultivo y capaces de competir con éxito con otros microorganismos.

Estudios de indicadores

En este caso el agente biológico de interés está perfilado, pero para su análisis se ha seleccionado alguno de los indicadores que pueden ser representativos de la presencia de grandes grupos de microorganismos. Por ejemplo: el análisis de glucanos o de ergosterol como indicadores de la biomasa fúngica o la determinación de guanina como indicador de la presencia de ácaros en el polvo doméstico.

El análisis de indicadores constituye un método relativamente claro que proporciona información general sobre los distintos tipos de agentes biológicos presentes en un ambiente; sin embargo, estos ensayos no siempre proporcionan información suficientemente específica que permita establecer correlaciones con los efectos para la salud causados por el agente biológico y no por el indicador medido.

Estudios focalizados

Este tipo de estudios permiten documentar la presencia de un agente biológico asociado a efectos concretos. Por ejemplo: durante el estudio de un brote de legionelosis, los métodos de ensayo estarán dirigidos a la detección de Legionella en muestras de agua y clínicas. Típicamente, los análisis deberían incluir el cultivo y aislamiento de la bacteria en las muestras de agua de las instalaciones implicadas y en muestras biológicas obtenidas de las personas potencialmente infectadas. Además de las técnicas de cultivo de microorganismos, otros métodos comprenderían: la detección de antígenos o la comprobación de la existencia de títulos elevados de anticuerpos en muestras de sangre.

La elección de este tipo de estudios parte de una hipótesis sobre la existencia de un agente específico en un ambiente. La hipótesis puede estar basada en la observación de efectos concretos asociados al agente en cuestión, o en la existencia de determinadas condiciones ambientales que permitan sospechar la presencia del agente.

En la tabla 1 se recogen las principales características de los métodos de captación y análisis utilizados para la detección de microorganismos.

Los métodos que se vayan a utilizar dependerán del tipo y la forma en que los diferentes agentes biológicos puedan estar presentes: microorganismos íntegros, vivos y viables, estructuras o componentes químicos y/o biológicos. Durante los procesos de aerosolización, suspensión en el aire, captación, transporte y análisis, los bioaerosoles están sometidos a la acción de distintas fuerzas y condiciones que pueden causarles daños con diferentes niveles de afectación, puede matarlos o simplemente desactivar un proceso metabólico que les impedirá, por ejemplo, su crecimiento en las condiciones de laboratorio.

TABLA 1. Características de la captación y análisis de agentes biológicos

AGENTE BIOLÓGICO	MÉTODO B	ANÁLISIS	DATOS OBTENIDOS
VIRUS	Impingers, Ciclones, Impactadores, Filtros	Cultivo celular	Concentración (n°/m^3); Identificación.
		Inmunoensayo (Anticuerpo marcado con colorante)	Confirmación de presencia de un virus específico.
		Microscopio electrónico	Identificación.
		Pruebas genéticas. PCR	Confirmación de presencia de un virus específico.
BACTERIAS	Impactadores, Impingers, Ciclones, Filtros. Muestras de superficies	Microscopio/recuento	Concentración (células/ m^3 o cm^2 o g)
		Inmunoensayo (Anticuerpo marcado con colorante)	Confirmación de presencia de una bacteria específica.
		Pruebas genéticas. PCR	Confirmación de presencia de una bacteria específica.
		Cultivo	Concentración (ufc/ m^3 o cm^2 o g).
		Microscopio: Morfología, Tinción	Identificación (general).
		Bioquímica	Identificación (específica).
Antígenos bacterianos	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración ($\mu g/g$).
Componentes de la pared bacteriana (Endotoxinas, Otros)	Filtros, Impingers, Polvo	Bioensayo (LAL)	Actividad biológica (UE/ m^3 o g).

		Químico (CG-EM, HPLC)	Concentración (LPS, ng/m ³ o g; Ác. Murámico, µg/m ³ o g).
HONGOS	Impactadores, Impingers, Ciclones, Filtros. Muestras de superficies	Microscopio/recuento	Concentración (esporas/m ³ o cm ² o g). Identificación.
		Cultivo	Concentración (ufc/m ³ o cm ² o g).
		Microscopio/morfología	Identificación.
Levaduras (Ác. Grasos, Lípidos)	Impactadores, Impingers, Ciclones, Filtros. Muestras de superficies	Químico (CG)	Identificación.
Alergenos fúngicos	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (ng o unidades/g).
Componentes de la pared fúngica	Filtros, Polvo	LAL, Inmunoensayo	Actividad biológica (glucano, unidades o µg/m ³).
		Químico (HPLC, CG-EM)	Concentración (glucano o ergosterol, unidades o µg/g)
Toxinas fúngicas	Impactadores, Impingers, Ciclones, Filtros. Muestras de superficies	Químico (HPLC, CG-EM)	Confirmación de la presencia de la toxina, Concentración (Toxina, ng/ m ³ o g).
		Inmunoensayo, citotoxicidad	Confirmación de la presencia de la toxina, Detección de la actividad tóxica (sin identificación).
ENDOPARÁSITOS (Amebas)	Agua, Impactadores, Impingers	Cultivo	Concentración (n°-/m ³ o ml)
		Microscopio/morfología	Identificación.
		Inmunoensayo (Anticuerpo marcado con colorante)	Confirmación de la presencia de amebas específicas.
ALERGENOS / ANTÍGENOS	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (alergeno/ antígeno, µg/g o unidades de alergeno/g o unidades de antígeno/g).
ÁCAROS	Polvo	Microscopio/morfología	Concentración (n°- de ácaros/g de polvo o por m ² de superficie muestreada), Identificación.
Alergenos de ácaros	Polvo	Inmunoensayo (ELISA)	Concentración (alergeno de ácaros, ng/g de polvo o por m ² de superficie muestreada).
Guanina	Polvo	CL, Colorimetría	Concentración (guanina/g de polvo o por m ² de superficie muestreada).
COVM	Adsorbentes, Bolsas de aire	Químico (CG.EM)	Concentración (compuesto, mg/m ³ , Identificación de compuestos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbentes ligados a enzima.

LAL: Lisado de amebocitos del Limulus.

UE: Unidades de Endotoxina.

CG-EM: Cromatografía de gases - Espectrometría de masas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

LPS: Lipopolisacáridos.

CL: Cromatografía líquida.

COVM: Compuestos orgánicos volátiles de origen microbiano.

Cultivo de microorganismos (bacterias y hongos)

A menudo en la literatura se puede leer el término "vivo" asociado a los microorganismos y ese término, generalmente, se explica a través de su viabilidad y supervivencia, es decir, por la capacidad de los microorganismos de formar una colonia en un medio nutritivo (una colonia es el conjunto de individuos formados por los procesos de reproducción microbiana del individuo inicial y de las sucesivas generaciones).

De hecho, eso no es más que la expresión del fenómeno que ocurre en las condiciones de incubación establecidas en un laboratorio. Esos aspectos son los que definen los principales rasgos de este método de análisis, pero no hay que olvidar de que todo ello dice poco acerca la capacidad del microorganismo para colonizar y/o infectar a un huésped susceptible. Un buen ejemplo de ello lo

constituye la bacteria *Legionella pneumophila*, la cual es extremadamente difícil de cultivar in vitro, pero es fácil demostrar su presencia a través del desarrollo de la enfermedad in vivo.

El cultivo de microorganismos en medio sólido ha sido el ensayo estándar durante muchos años. En sus orígenes, fue utilizado para el aislamiento de microorganismos, sin embargo, la posibilidad de efectuar el recuento de colonias y relacionarlo con un volumen de aire, lo han convertido en una técnica para cuantificar microorganismos, aunque, a menudo, se olvidan las limitaciones que el método presenta.

En principio, la única información que proporciona el recuento de colonias es la proporción de la población muestreada que mantiene la capacidad de crecer en el medio de cultivo seleccionado y en las condiciones de incubación establecidas. Para la evaluación de la exposición laboral a agentes biológicos esta información resulta parcial, ya que los microorganismos, además de causar infecciones, pueden presentar efectos tóxicos y alérgicos que no son valorados por este método, y que se pueden manifestar tanto si el microorganismo es o no viable, e incluso, aunque el microorganismo esté muerto. Por otra parte, el estrés físico que pueden sufrir los microorganismos durante la generación del aerosol, su permanencia en el aire o durante su captación, pueden dañarlos impidiendo así su desarrollo en cultivo y en consecuencia provocar la infravaloración de la concentración. Debe tenerse siempre presente que no todos los microorganismos serán cultivables y el hecho de que no formen colonias no necesariamente significa que el organismo no esté en la muestra o que esté muerto. Existen diferentes razones por las que un microorganismo no forma una colonia, siendo las más destacadas las siguientes:

- La acción de las fuerzas que se ejercen sobre la célula durante la generación del aerosol, su captación y la manipulación y transporte de las muestras, la pueden matar.
- La acción de esas fuerzas se puede reducir a una alteración de los procesos metabólicos que marcan su desarrollo: crecimiento, aprovechamiento de determinados nutrientes, mutaciones, etc.
- La posible acción tóxica de los elementos químicos que constituyen el medio de cultivo.
- Un desequilibrio entre los elementos del medio que le son necesarios para el crecimiento.
- La competitividad entre especies.

Una característica muy importante de esta técnica es que permite el aislamiento de microorganismos en cultivos puros que constituyen un paso necesario en los procedimientos de identificación de las especies captadas, datos que completarán la información de la medición.

Los métodos de ensayo basados en el cultivo de microorganismos consisten en proporcionar entornos que favorezcan la multiplicación de los microorganismos captados en la muestra. Dependiendo del tipo de muestreo realizado, los microorganismos impactan directamente sobre el medio de cultivo (captación ambiental), o son posteriormente inoculados en un medio de cultivo a partir de fracciones de la muestra tomada (agua, materiales o superficies). En buena parte de los casos, el análisis empieza en la toma de las muestras con la elección del soporte de captación.

Soporte de captación: placa con medio de cultivo

El medio de cultivo es el material donde se multiplicarán los microorganismos formando colonias, por lo tanto, deberá reunir las condiciones que permitan y favorezcan el desarrollo. En una muestra, ya sea ambiental, de agua o de un material, van a coexistir muchos microorganismos diferentes con requisitos vitales distintos. El cultivo de esa muestra en una placa con un medio de características determinadas, bajo una serie de condiciones, permitirá la formación de las colonias de algunos tipos de microorganismos, aunque esas mismas características harán que otros muchos pasen inadvertidos. Existen diferentes variedades de medios de cultivo en función del objetivo del análisis. Una práctica habitual en el laboratorio es utilizar en las siembras diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para poder poner de manifiesto el mayor número de microorganismos que sea posible.

En términos generales, los soportes habitualmente utilizados para la captación ambiental de microorganismos se pueden clasificar en:

- Los medios de cultivo generales: son aquellos que permiten el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. En estos medios, y si no se añade un inhibidor de crecimiento, pueden desarrollarse tanto bacterias como hongos.
- Un medio de cultivo selectivo: es el que se ha preparado para inhibir el crecimiento de determinados microorganismos y permitir el de otros.
- Un medio de cultivo diferencial: es aquel que permite el crecimiento de varios microorganismos, pero que contiene ingredientes que producen diferencias de apariencia de algunos de ellos, por ejemplo: un medio de cultivo que es a la vez selectivo y diferencial es el Agar Eosina - Azul de metileno; este medio se utiliza para aislar y diferenciar las bacterias del grupo entérico, es selectivo por que la presencia del azul de metileno inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivo de este grupo, y es diferencial puesto que, de las Gram negativo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* forman colonias de color azul púrpura con brillo metálico, mientras que *Shigella*, *Salmonella* o *Pseudomonas* forman colonias incoloras o rosadas. La utilización de estos medios constituyen la base de los métodos clásicos de la identificación bacteriana.

Independientemente del objetivo perseguido, todos ellos deben cumplir con el requisito de proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo. No se trata aquí de realizar una descripción, ciertamente insuficiente, de los distintos medios de cultivo y sus componentes, puesto que la literatura ofrece abundante información sobre el tema, sino de repasar brevemente los compuestos que van a ser imprescindibles para el desarrollo.

Todos los organismos requieren de una fuente de energía en forma de donadores de hidrógeno (H^+) o dicho de otra forma, de substratos oxidables, pero, además se precisan aceptores de hidrógeno en las reacciones de oxidorreducción que proporcionen energía. Los microorganismos aerobios necesitan oxígeno (O_2), mientras que los anaerobios pueden utilizar compuestos inorgánicos (sulfatos, nitratos, etc.), o compuestos orgánicos. Todos los organismos necesitan de una fuente de carbono para la síntesis de sus propios componentes. Para los organismos fotosintéticos la única fuente de carbono que utilizan es el dióxido de carbono (CO_2), el resto puede utilizar cualquier compuesto orgánico.

Muchos constituyentes celulares, principalmente las proteínas, contienen nitrógeno. La forma en la cual se precisa el nitrógeno depende de las facultades enzimáticas reductoras del organismo, de manera que una especie microbiana dada puede obtenerlo del medio en una o más formas (NO_3^- , NO_2^- , N_2 , NH_4^+ , $R-NH_2$).

Para su desarrollo, las células precisan, además de los mencionados, de otros elementos, entre los que destacan el azufre, que forma parte de las proteínas y que los microorganismos pueden tomar de los compuestos orgánicos de azufre, y el fósforo, componente esencial de las moléculas de ATP (adenosín trifosfato), de los ácidos nucleicos y de las coenzimas, que es siempre incorporado por los microorganismos como fosfato inorgánico libre. Al formular el medio de cultivo de la mayor parte de microorganismos, es necesario aportar fuentes de minerales magnesio, hierro, calcio, potasio, generalmente en forma iónica (Mg^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , K^+) que son necesarios como activadores enzimáticos o formando parte de moléculas o elementos del organismo. Otros minerales como el cobre, el manganeso, el zinc, etc., asimismo necesarios, son aportados por el agua de suministro. Muchos microorganismos son capaces de sintetizar todos sus componentes esenciales cuando disponen de los elementos anteriormente mencionados. Pero en ocasiones, por ejemplo, una mutación genética, hace que el microorganismo pierda la capacidad de síntesis de algún componente que todavía le es imprescindible. En esos casos hay que suministrarlo con el medio, son los "factores de crecimiento" que variarán en función de las especies y de las pérdidas en la capacidad de síntesis que se hayan producido.

Preparación de la muestra

En la impactación directa sobre medio de cultivo, la única precaución es comprobar que los soportes de captación (placas con medio de cultivo) están en perfecto estado y no presentan contaminación (observar si en alguna placa se ha formado alguna colonia y si es el caso desechar el lote).

Tras el muestreo de materiales (líquidos o sólidos) puede resultar conveniente efectuar suspensiones de la muestra en un líquido y diluciones seriadas de la misma para favorecer la dispersión de los agregados y evitar la sobrecarga de las placas de cultivo.

Condiciones de incubación

Uno de los aspectos más importantes en el cultivo de microorganismos es la temperatura de incubación, que habitualmente se corresponderá con la del normal desarrollo del microorganismo en la naturaleza.

Este aspecto se puede utilizar para aislar selectivamente algún microorganismo, por ejemplo: numerosos hongos y bacterias libres crecen de manera óptima a temperaturas que oscilan entre $18^\circ C$ y $25^\circ C$, la mayoría de los hongos lo hace bastante mal a temperaturas por encima de $35^\circ C$, solo unos pocos (*Aspergillus fumigatus*) crecen bien a temperaturas más elevadas, de manera que este hongo puede aislarse de forma selectiva si se incuban las muestras a $35 - 40^\circ C$.

La temperatura óptima de incubación para microorganismos patógenos es de $37^\circ C$, que es la temperatura del cuerpo humano donde se desarrollan esos microorganismos; estas condiciones de incubación sólo son apropiadas cuando de las muestras se trata de aislar patógenos. Para los actinomicetes termofílicos la temperatura de incubación debe ser superior a $50^\circ C$, lo que excluye el desarrollo de cualquier otro microorganismo que no sea termotolerante.

Tras la toma de muestras se debe procurar el transporte inmediato de las mismas al laboratorio o, por lo menos, el mantenimiento de las muestras a bajas temperaturas. Con ello se trata de impedir que las especies que crecen a temperatura ambiente inicien su desarrollo lo que les puede conferir cierta ventaja sobre el resto de especies presentes en la muestra. Asimismo, se debe evitar la conservación de las muestras a temperaturas extremas que podrían dañarlas.

Atmósfera de incubación

Otro de los aspectos importantes en el cultivo de microorganismos es la atmósfera de incubación. Muchos de los análisis basados en el cultivo están limitados al estudio de las especies aerobias (obligadas o facultativas), es decir, aquellas que solo se desarrollan en presencia de oxígeno o a las que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia del mismo.

Casi todos los hongos y las bacterias son aerobios; sin embargo, en el ambiente se pueden encontrar las esporas (formas resistentes de vida) de especies anaerobias o las formas vegetativas, creciendo en zonas donde no hay oxígeno. El análisis de las bacterias anaerobias requiere mecanismos especiales de transporte e incubación. Las muestras deben colocarse en recipientes que contenga un gas libre de oxígeno al que se añade una cantidad de una solución diluida de sales con un agente reductor, como el tioglicolato y un indicador redox cuyo cambio de color indicará contaminación por oxígeno.

Cuando se precisa de una incubación en anaerobiosis, las placas de agar se colocan en recipientes sellados de los que se reemplaza el aire del recipiente por una mezcla de gas (nitrógeno y dióxido de carbono) libre de oxígeno. Otros medios para lograr condiciones anaeróbicas consisten en la utilización de medios de cultivo que contengan agentes reductores (cisteína o tioglicolato) y el uso de cabinas para el cultivo de anaerobios.

Recuento de colonias

La obtención de la concentración de microorganismos se basa en la relación entre el número de colonias que se han contabilizado y el volumen de aire aspirado, que es función del caudal al que esté calibrado el muestreador y el tiempo de muestreo. A menudo ocurre que el número de colonias contadas no responde a la realidad; las causas son diversas: en ocasiones, es difícil identificar como separadas, colonias formadas por agregados microbianos; o diferenciar colonias debido a que su morfología es muy similar; o por que una determinada especie segrega productos químicos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos; o la morfología y/o tamaño de unas colonias obscurecen completamente otras. En la figura 1 se muestra una placa de cultivo en la que se aprecian las señales de la impactación de las partículas tras el proceso de muestreo y una placa en la que aparecen las colonias formadas.



Figura 1. Recuento de colonias

Para evitar la infravaloración de las colonias crecidas, cuando la captación ha sido hecha con un impactador multiorificio, es preciso realizar un ajuste estadístico sobre el número de colonias contadas que contemple la probabilidad de que más de una partícula haya impactado en el mismo lugar. En ese tipo de muestreadores las partículas, a las que puede ir asociado un microorganismo o un agregado de ellos, atraviesan el cabezal del equipo que está perforado por un número determinado de orificios e impactan sobre un punto del soporte de captación y allí se inicia el desarrollo de la o las colonias. Al efectuar el conteo puede resultar difícil ver si en la zona de impactación hay una o varias colonias, pudiéndose contar como una cuando hay más. A medida que aumenta el número de partículas depositadas en el medio, la probabilidad de que la siguiente partícula pase por un orificio "limpio" es más baja. La fórmula básica para el cálculo de la corrección por coincidencia es la siguiente:

$$Pr = N [1/N + 1/(N-1) + 1/(N-2) + \dots + 1/(N-r+1)]$$

Pr es el número estimado de partículas cultivables.

r es el número de colonias contadas en la placa.

N es el número total de orificios por plataforma del impactador.

Identificación de microorganismos cultivables

La taxonomía es la ciencia que permite la clasificación de las formas vivas; su objetivo es establecer las relaciones que existen entre un grupo de organismos y otro, y también diferenciarlos. Los métodos de que se sirve la taxonomía para establecer esas relaciones o diferencias son diversos; el más clásico de todos ellos consiste en la observación de las características de las colonias crecidas en cultivo: su forma, tamaño, olor y pigmentación son los primeros datos que se pueden obtener.

A nivel celular, la forma, tamaño, la agrupación de las células bacterianas y la presencia o ausencia de flagelos, cápsula o endosporas, son las características que definen las distintas clases de microorganismos. Para la observación al microscopio de estos aspectos es preciso, en muchas ocasiones, utilizar colorantes. Una de las primeras pruebas que se realizan para la identificación de las especies bacterianas es la tinción de Gram que se basa en las diferencias físicas que existen entre las paredes celulares de las bacterias.

El resultado de la prueba permite clasificar todas las bacterias en dos grupos que se denominan: Gram positivo y Gram negativo. En esta prueba se utilizan dos colorantes: el cristal violeta que tiñe de azul las bacterias Gram positivo, mientras que las negativas permanecen incoloras, y un colorante de contraste, la safranina, que tiñe ligeramente de rosa las bacterias Gram, negativo y permite reconocerlas y diferenciarlas al microscopio. La identificación de los hongos se basa en la observación de la morfología de sus esporas, aunque también se pueden utilizar pruebas de tinción.

Un paso más permite identificar las bacterias a nivel de género, especie e incluso subespecie. En este caso, son las pruebas bioquímicas, fisiológicas o nutricionales las que permiten evaluar los constituyentes de las paredes bacterianas, sus inclusiones, los

antígenos, el rango de temperaturas a las que crecen, y su óptimo, sus requerimientos de oxígeno, la tolerancia al pH, sales o presiones osmóticas, su sensibilidad a los antibióticos, sus fuentes de energía, carbono y nitrógeno, los productos de fermentación y el tipo de metabolismo. En el mercado se encuentran disponibles diferentes sistemas que permiten el ensayo múltiple de varios de los aspectos mencionados. En la figura 2 se muestra un ejemplo de estos sistemas. En la tabla 2 se resumen las principales pruebas para el diagnóstico de bacterias.

TABLA 2. Pruebas para el diagnóstico de bacterias

PRUEBA	PRINCIPIO	MÉTODO	USO MÁS FRECUENTE
Fermentación de hidratos de carbono	Producción de ácido y/o gas durante el crecimiento fermentativo con azúcares o alcoholes azucarados.	Un caldo de cultivo con hidratos de carbono y rojo fenol como indicador de pH; tubo invertido para el gas.	Diferenciación de enterobacterias.
Catalasa	La enzima descompone el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).	Añadir una gota de a un cultivo denso H ₂ O ₂ y buscar burbujas (O ₂)	Diferenciar: Bacillus (+) de Clostridium (-); Streptococcus (-) de Micrococcus - Staphylococcus (+).
Utilización del citrato	La utilización del citrato como única fuente de carbono produce la alcalinización del medio.	Un medio de citrato con azul de bromotimol como indicador de pH. Buscar un color azul intenso (pH alcalino).	Diferenciar: Klebsiella - Enterobacter (+) de Escherichia (-); Edwardsiella (-) de Salmonella (+).
Coagulasa	La enzima provoca la aglutinación del plasma sanguíneo.	Mezclar una suspensión líquida densa de bacterias con plasma, incubar y buscar un coágulo de fibrina.	Diferenciar: Staphylococcus aureus (+) de S. Epidermis (-)
Descarboxilasas (lisina, ornitina, arginina)	La descarboxilación de los aminoácidos libera dióxido de carbono (CO ₂) y amina.	Medio enriquecido con aminoácidos. El púrpura de bromocresol como indicador de pH vira a púrpura (pH alcalino) si actúa la enzima.	Ayuda a la determinación del grupo bacteriano entre las enterobacterias.
Prueba de la β-Galactosidasa (ONPG)	El ortonitrofenil - β - galactósido (ONPG) es un sustrato artificial para la enzima. Cuando se hidroliza, se forma el nitrofenol (amarillo).	Incubar una suspensión pesada de un cultivo lisado con ONPG. Buscar un color amarillo.	Diferenciar: Citrobacter y Arizona (+) de Salmonella (-). Identificación de algunas especies de Shigella y Pseudomonas.
Licuefacción de la gelatina	Muchas hidrolasas hidrolizan la gelatina y destruyen el gel.	Incubar un caldo con 12% de gelatina. Enfriar para comprobar la formación del gel. Si se hidroliza la gelatina, el tubo permanece líquido cuando se refrigera.	Ayuda a la identificación de Serratia, Pseudomonas, Flavobacterium, Clostridium.
Producción de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	La producción de H ₂ S por rotura de los aminoácidos azufrados o reducción del tiosulfato.	El sulfuro de hidrógeno se detecta en un medio rico en hierro a partir de la formación de sulfito ferroso negro.	En enterobacterias, ayuda a la identificación de Salmonella, Arizona, Edwardsiella y Proteus.
Prueba del indol	Conversión del triptófano de las proteínas en indol.	Detección de indol en el medio de cultivo con dimetil - aminobenzaldehído (color rojo).	Distinguir Escherichia (+) de Klebsiella (-) y Enterobacter (-) Edwardsiella (+) de Salmonella (-).
Prueba del rojo de metilo	Los fermentadores mixtos de ácidos producen suficiente ácido para disminuir el pH por debajo de 4,3.	Caldo de glucosa. Después de la incubación, añadir indicador rojo a la muestra.	Diferenciar Escherichia (+, cultivo rojo) de Enterobacter y Klebsiella (generalmente -, cultivo amarillo).
Reducción del nitrato	El nitrato como aceptor de electrones alternativo, reducido a NO ₂ ⁻ o N ₂ .	Caldo con nitrato. Tras la incubación, detectar nitrito con ácido a- naftilamina sulfanílico (color rojo). Si es negativo, confirmar que el NO ₃ ⁻ está aún presente añadiendo polvo de zinc para reducir NO ₃ ⁻ a NO ₂ ⁻ .	Ayudar a la identificación de enterobacterias (generalmente +).

Prueba de la oxidasa	El citocromo c oxida al aceptor de electrones artificial: tetrametil -p-fenilendiamina.	Caldo o agar. Las colonias oxidasa positivas en agar pueden detectarse sumergiendo la placa en un reactivo y buscando colonias azuladas o marrones.	Separa Neisseria y Moraxella (+) de Acinetobacter (-). Separar enterobacterias (todas -) de Pseudomonas (+). Ayudar a la identificación de Aeromonas (+).
Oxidación-fermentación	Algunos organismos producen ácido solamente cuando crecen en aerobiosis.	Producción de ácido en la parte alta del tubo de cultivo que contiene azúcar.	Diferenciar Micrococcus (producción de ácido solamente en aerobiosis) de Staphylococcus (producción anaeróbica del ácido). Caracterizar Pseudomonas (producción aeróbica de ácido) de enterobacterias (producción anaeróbica del ácido).
Prueba de la fenilalaníndesaminasa	La desaminación produce ácido fenilpirúvico que se detecta en una prueba colorimétrica.	Medio enriquecido en fenilalanina. Después del crecimiento, añadir cloruro férrico y buscar el color verde.	Caracterizar el género Proteus y el grupo Providencia.
Hidrólisis del almidón	El yodo - ioduro da un color azul con el almidón.	Crecimiento de un organismo en placa que contiene almidón. Sumergir la placa en ioduro de Gram y buscar zonas claras alrededor de las colonias.	Identificar los hidrolizadores típicos de almidón como Bacillus spp.
Prueba de la ureasa	La urea se escinde en 2 $\text{NH}_3 + \text{CO}_2$	Medio con un 2 % de urea y rojo fenol como indicador. La liberación de amonio eleva el pH, intenso color rojo rosado.	Distinguir Klebsiella (+) de Escherichia (-). Distinguir Proteus (+) de Providencia (-)
Prueba del Voges-Proskauer	La acetoina es producida a partir de la fermentación de azúcares.	Prueba química para acetoina utilizando α -naftol.	Separar Klebsiella y Enterobacter(+) de Escherichia (-). Caracterizar los miembros del género Bacillus.



Figura 2. Métodos de diagnóstico dependientes del crecimiento bacteriano

Microscopía

El uso del microscopio es una técnica fundamental para el recuento del número total de microorganismos, además, constituye una gran ayuda en la identificación de las especies; permite reconocer la forma de las células, observar el resultado de las pruebas de tinción o la movilidad de las bacterias. Los tipos de microscopios más usados son el microscopio óptico, el microscopio de contraste de fase, el microscopio de fluorescencia y el microscopio electrónico

Microscopio óptico

Se trata de un microscopio convencional en el que la observación se basa en la iluminación de los especímenes que destacan contra un fondo oscuro. La visibilidad de la imagen disminuye a medida que el índice de refracción de la sustancia/microorganismo en observación y el medio de montaje de la preparación son más parecidos.

El examen microscópico de muestras ambientales permite el recuento total de hongos y bacterias. La observación de hongos y sus esporas puede realizarse directamente, reconociendo su forma, o utilizando métodos de tinción. Algunas limitaciones del método consisten en la dificultad de identificar esporas de especies de hongos distintas, pero que tienen una gran similitud morfológica, por ejemplo: las esporas de *Aspergillus* y *Penicillium*, que a menudo son contadas como un único grupo. En estos casos, el cultivo de los microorganismos captados puede proporcionar más información sobre las especies en cuestión.

Para la observación de bacterias es necesario servirse de colorantes y en especial de los fluorescentes. Uno de los inconvenientes del método era que no permitía diferenciar entre células con forma y tamaño similares, ni sus propiedades tintoriales (Gram positivos o negativos), ni si son formas vivas o muertas. Estas limitaciones se han superado con la comercialización de Kits de tinción de Gram fluorescente o de reactivos que permiten discernir entre formas vivas y muertas.

Microscopio de contraste de fases

El principio de funcionamiento se basa en la difracción de la luz que al incidir sobre los especímenes provoca distintos grados de brillo y de contraste. Es una técnica apropiada para la observación de especies que son prácticamente invisibles al microscopio óptico, o para el estudio de las endosporas bacterianas, puesto que éstas presentan índices de refracción distintos al de la forma vegetativa.

Microscopio de fluorescencia

Esta técnica se basa en la observación de la fluorescencia emitida por determinados fluorocromos (naranja de acridina) ligados a las células cuando son excitados por la luz ultravioleta de una determinada longitud de onda. Esta técnica se utiliza para el conteo directo de partículas. Microscopio electrónico

En estos casos, en lugar de luz se utiliza un haz de electrones. El microscopio electrónico de transmisión tiene una gran resolución lo que permite poner de manifiesto estructuras y orgánulos internos de las células, resolviendo estructuras de tamaño inferior que $0,2 \mu\text{m}$. Otro tipo de microscopio electrónico es el de barrido en el se ponen de manifiesto la forma externa de las partículas proporcionando imágenes en tres dimensiones. Es una técnica útil para la observación e identificación de esporas fúngicas, granos de polen, etc. En la figura 3 se muestran algunos ejemplos de observaciones realizadas al microscopio de contraste de fases, electrónico de transmisión y de barrido.

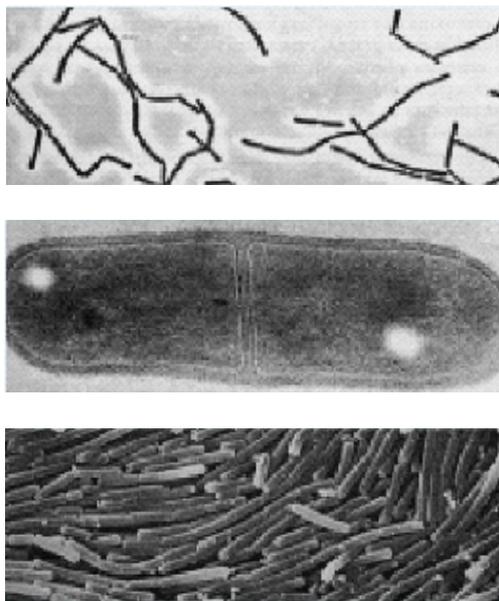


Figura 3. Imágenes al microscopio de contraste de fases, electrónico de transmisión y de barrido

Bioensayos

El término "bioensayo" hace referencia a los métodos cuantitativos, ya sean in vivo o in vitro, cuyo objetivo es algún efecto observable en un sistema biológico o en algún organismo. Algunos ejemplos de bioensayos son: los cultivos celulares para la detección de virus y bacterias, la exposición de células u organismos completos a muestras que puedan contener toxinas, el inmunoensayo basado en la respuesta de las moléculas biológicas (anticuerpos) frente a un antígeno o el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* para la detección de endotoxinas.

Ensayos de infectividad

Dado que los virus y algunas bacterias son parásitos obligados (no pueden sobrevivir fuera de células vivas), el análisis de virus supone la inoculación de cultivos celulares o de animales con la muestra en estudio. En el cultivo celular cada partícula viral se revela como un foco de infección y ésta se evidencia por la formación de una lesión. Este método proporciona información sobre el número de partículas víricas que fueron capaces de infectar el tipo de células del cultivo. El uso de este método para muestras ambientales tiene sus limitaciones, ya que otros microorganismos pueden crecer en el cultivo celular alterando los resultados.

Inmunoensayo

El inmunoensayo es un método basado en la reacción específica que ocurre entre el antígeno y el anticuerpo y un marcador (enzimas, moléculas fluorescentes o radioactivas) que haga visible y cuantificable el resultado del ensayo. Esta especificidad ha sido utilizada en un gran número de aplicaciones, entre ellas, la detección de: alérgenos de ácaros, alérgenos de origen animal o vegetal, antígenos microbianos, glucanos fúngicos, aflatoxinas, látex, etc.

ELISA

Uno de los ensayos más ampliamente utilizado para determinar la concentración de alérgenos en polvo es el test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). En el ensayo, las paredes de los pocillos de una placa están recubiertas por el anticuerpo de captura que es específico para antígenos concretos. Las muestras de polvo tomadas son tamizadas hasta obtener la fracción de polvo fino de la que se extraerán las proteínas solubles (alérgeno); este extracto se diluye de forma seriada. El mismo proceso se lleva a cabo con el alérgeno patrón. Alícuotas de ambos extractos son añadidas a los pocillos que contienen el anticuerpo de captura. Las placas son incubadas produciéndose la reacción antígeno - anticuerpo; posteriormente se procede al lavado de las mismas para eliminar los materiales no ligados.

El complejo antígeno - anticuerpo se detecta utilizando un segundo anticuerpo al que va unido un enzima que reconoce dicho complejo, finalmente, se añade una sustancia cromógena que cambia de color al reaccionar con el enzima y se lee el cambio de color. La concentración de los antígenos buscados se obtiene por comparación de las lecturas de las muestras con las curvas generadas por concentraciones conocidas de los patrones.

Anticuerpos fluorescentes

En este caso, los anticuerpos llevan ligados covalentemente compuestos orgánicos fluorescentes como rodamina B, que da una fluorescencia roja, o isotiocianato de fluoresceína, que da una fluorescencia amarilla verdosa. Esto no altera la especificidad del anticuerpo, pero permite la detección del antígeno al observar el preparado con el microscopio de fluorescencia.

Las aplicaciones de esta técnica son múltiples; por ejemplo, se utilizan en el diagnóstico de la legionelosis. En ese caso, el proceso consiste en la tinción de una biopsia de tejido pulmonar con anticuerpos fluorescentes. También son utilizados en el diagnóstico de infecciones víricas o en el recuento de determinados tipos celulares en mezclas complejas.

Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) utiliza isótopos radiactivos en vez de enzimas como conjugados de los anticuerpos. El isótopo yodo-125 (I^{125}) es el más utilizado como sistema de detección, ya que las proteínas se pueden iodar con facilidad sin alterar su especificidad. El ensayo directo consiste en una técnica en dos pasos. En primer lugar, se añaden los anticuerpos antígeno radiactivos específicos del antígeno a una serie de micropocillos que contienen concentraciones conocidas de antígeno puro. Después se mide la radiactividad en cada uno de los pocillos, pudiéndose generar una gráfica patrón. A continuación, se deja que la muestra en la que se quiere detectar el antígeno se ligue en otro pocillo con los anticuerpos radiactivos y se mide la radiactividad. La concentración de antígeno se obtiene al comparar la medición del ensayo con la gráfica estándar preparada. La mayor utilidad clínica de esta prueba es la detección de proteínas.

El RIA presenta el mismo rango de sensibilidad que el ELISA y también se puede realizar muy rápidamente. Como inconvenientes, presenta el elevado coste de la instalación y la considerable cantidad de residuos radiactivos que se generan, junto a la necesidad de su adecuada gestión.

Ensayos de toxicidad

El ensayo más representativo es el del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), en el que los efectos observables son la coagulación, el aumento de la turbidez o una reacción cromogénica. Su utilidad principal es la medición de endotoxinas bacterianas, aunque también se utiliza para la medición de glucanos.

Las endotoxinas son un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativo. Se trata de agregados macromoleculares de alrededor de 1 millón de daltons (endotoxina libre). En forma pura, las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) cuya fracción lipídica (lípidos A), es la responsable de la toxicidad característica de la molécula. Se ha observado que las propiedades toxicológicas de las endotoxinas son diferentes según las especies y el estadio de desarrollo de las bacterias. Al calentar las endotoxinas, su efecto tóxico aumenta, ya que las proteínas se desnaturalizan y en consecuencia las endotoxinas acceden más fácilmente a los receptores celulares.

En la práctica, la captación se realiza en filtros, que se tratan con agua destilada, preparándose una serie de diluciones con las cuales se efectúa el ensayo. La congelación de las suspensiones de endotoxinas puede producir pérdidas significativas, por lo que las muestras no deben congelarse, empleándose la pasteurización como alternativa para su conservación.

La determinación de endotoxinas en aire se efectúa mediante un ensayo que se basa en la activación de la cadena enzimática de coagulación de la linfa del cangrejo *Limulus polyphemus*.

Basándose en la propiedad de la reacción de lisado existen diferentes técnicas de LAL:

- **LAL de gelificación.** Se basa en que el enzima activado causa la gelificación de una proteína coagulable. Cuando la concentración de endotoxinas de la muestra excede el valor de la sensibilidad del reactivo LAL, se forma un gel consistente. De esta manera se pueden hacer determinaciones cualitativas del nivel de endotoxinas.
- **LAL turbidimétrico.** El enzima activado inicia la gelificación de una proteína coagulable del lisado. Midiendo el aumento de la

turbidez antes de que se forme el coágulo de gel, es posible cuantificar la cantidad de endotoxina presente en la muestra.

- **LAL cromogénico.** La presencia de endotoxina activa la cascada enzimática, incidiendo sobre un sustrato cromogénico que libera p-nitroanilina proporcionalmente a la presencia de endotoxina. Las técnicas cuantitativas de LAL cromogénico pueden ser a punto final o cinéticas.

Todas estas técnicas precisan de un patrón de endotoxina para elaborar una curva de calibración. Los resultados de actividad de las muestras se expresan en UE (unidades de endotoxina) por m³ o ml o g, basadas en la endotoxina estándar de referencia de la USP (United States Pharmacopeia).

Pruebas genéticas

En ocasiones, más que la medición de todos los agentes biológicos presentes en un ambiente, lo que interesa es detectar de forma rápida y fiable la presencia de una determinada especie, para ello se precisan métodos muy específicos y sensibles. Los avances en biología molecular ofrecen diversos métodos que, genéricamente, están basados en el reconocimiento de secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico).

Hibridación de ácidos nucleicos

La hibridación de ácidos nucleicos no detecta organismos completos o sus productos, sino la presencia o ausencia de secuencias de ADN específicas que se asocian a un organismo específico. El elemento clave en el análisis es disponer de una sonda de ácido nucleico para un microorganismo, una sola hebra de ADN que contenga secuencias características del organismo; cuando en una muestra un microorganismo contiene secuencias de ADN complementarias a las de la sonda, se produce la hibridación, formándose una molécula de doble cadena. Para detectar la reacción se marca la sonda con moléculas indicadoras (enzimas, isótopo radiactivo o compuesto fluorescente).

Reacción en cadena de la Polimerasa. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR es un método in vitro de síntesis de secuencias de ácidos nucleicos seleccionados por el cual segmentos concretos de ADN son específicamente replicados. El ADN se mezcla con bases de nucleótidos y el enzima polimerasa y se incuba en condiciones de temperatura controlada. En el proceso las cadenas se separan, se copian, se vuelven a separar y se vuelven a copiar; de esta manera en muy poco tiempo se obtienen millones de copias de moléculas de ADN listas para el ensayo, al que se añaden sondas seleccionadas de ADN con un marcador fluorescente o radioactivo capaces de hibridarse con regiones específicas del ADN buscado. La sonda puede hibridarse en cantidades detectables si el organismo de interés está presente en la muestra inicial y si el segmento de ADN se amplificado.

La sensibilidad de este método lo ha convertido en una excelente herramienta de diagnóstico; entre sus aplicaciones destacan: el diagnóstico de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos; el diagnóstico de anomalías genéticas; las huellas de paternidad; la cuantificación viral (VIH) o la investigación en el área alimentaria y medio ambiental.

Entre las ventajas que presenta el método se pueden destacar: la sensibilidad y especificidad, la rapidez y su capacidad para detectar microorganismos que son muy lentos o difíciles de cultivar e, incluso, aquellos que no son cultivables. Además, del incremento de la seguridad para el trabajador que supone no tener que manipular microorganismos peligrosos, sino parte de los mismos. Entre los inconvenientes, el principal es que es un método muy focalizado y sólo detecta agentes biológicos predeterminados si éstos están presentes. Es un método cualitativo: sólo indica si el microorganismo está o no está presente.

Ensayos químicos

Las limitaciones y los errores que se derivan del uso de métodos basados en el cultivo de microorganismos ha conducido a la aplicación de métodos químicos para la detección de los mismos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (CG) y la espectrometría de masas (EM), usadas de forma independiente o en combinación, son los ensayos que habitualmente se utilizan para la detección de indicadores químicos.

Estos indicadores químicos son moléculas biológicas que forman parte estructural de los microorganismos o que son producidos por ellos. Estos indicadores químicos incluyen:

- Moléculas estructurales de las membranas y paredes de los microorganismos, por ejemplo: carbohidratos como peptoglúcidos o beta glucanos, ácidos grasos, lípidos como el ergosterol de las membranas fúngicas, lipopolisacáridos como las endotoxinas de la pared de las bacterias Gram negativo.
- Productos metabólicos, por ejemplo: micotoxinas fúngicas, aldehídos, alcoholes y otros compuestos orgánicos volátiles.
- Macromoléculas segregadas, por ejemplo: enzimas específicos y otras proteínas.
- Macromoléculas excretadas, por ejemplo la guanina contenida en los excrementos de los ácaros.

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) AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH)
Bioaerosols. Assessment and control
ACGIH, Cincinnati, OH, USA, 1999.
- (3) AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION
Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples
AIHA, Fairfax, VA, USA, 1996.
- (4) NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH
Manual of analytical methods, 4th ed.
DHHS (NIOSH), Publication 94-113, (August, 1994). (<http://www.cdc.gov/niosh/nmam/nmampub.html>)
- (5) MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. and PARKER, J.
Brock. Biología de los microorganismos, 80 ed.
Madrid, Prentice Hall, Inc., 2000.
- (6) KRIEG, N.R. and HOLT, J.G.
Bergey's manual of systematic bacteriology.
Baltimore, MD, USA, Williams & Wilkins, 1984.
- (7) 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.
- (8) INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO
Higiene Industrial.
INSHT, Madrid, 2002.
- (9) 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.
- (10) CROOK, B.
Review: Methods of monitoring for process microorganisms in biotechnology.
Am. Occup. Hyg. 40 (3) págs.: 245 - 260, 1996.
- (11) EDUARD, W. and HEEDERIK, D.
Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 59 (2) págs.: 113 - 127, 1998.
- (12) EDUARD, W. et al.
Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 51, págs.: 427-436, 1990.
- (13) MARTÍ, M.C., ALONSO, R.M. y CONSTANS, A.
Endotoxinas en ambientes laborales.
INSHT, Madrid, Colección Notas técnicas de Prevención, n° 422 de 1996.
- (14) GREFF-MIRGUET, G.
Échantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air.
Cahiers de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail n° 187, 2° semestre 2002.
-