

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

Evaluación microbiológica de la presencia de hongos en ambientes de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador mediante la aspiración de volumen de aire en tiempo definido como una de las causas del Síndrome del Edificio Enfermo durante el 2011.

Daniela Rivadeneira Calvache

Directora: Lic. Elena Granda Moreno

Quito, 2012

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR

DECLARACION Y AUTORIZACIÓN

Yo, Daniela Alexandra Rivadeneira Calvache, CI: 1722642541 autor del trabajo de graduación intitulado: **“Evaluación microbiológica de la presencia de hongos en ambientes de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador mediante la aspiración de volumen de aire en tiempo definido como una de las causas del Síndrome del Edificio Enfermo durante el 2011”**, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA** en la **Escuela de Bioanálisis**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito,

Nombre: Daniela Rivadeneira Calvache

C.I. 1722642541

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: NTP 335: Calidad de aire interior: Evaluación de la presencia de granos de polen y esporas fúngicas	92
ANEXO 2: Matriz de Recolección de Datos	99
ANEXO 3: NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire	101
ANEXO 4: Matriz de Identificación de Hongos Ambientales	106
ANEXO 5: Preparación de Medios de Cultivo	109
ANEXO 6: Tablas Estadísticas	112

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Género de hongos encontrados.	73
Gráfico 2: Diferencia de medias de la UFC/m ³ en los dos medios de cultivo	75
Gráfico 3: Nivel de contaminación por UFC/m ³ de hongos en ambientes del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis en PDA y RB	76
Gráfico 4: Nivel de contaminación por UFC/m ³ de los Laboratorios del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis en PDA y RB.....	76
Gráfica 5: Nivel de contaminación por UFC/m ³ en ambientes del Edificio de Microbiología en PDA y RB	77
Gráfico 6: Frecuencia de Género de Hongos por ambiente en el Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis	78
Gráfico 7: Frecuencia de Género de Hongos por ambiente en el Edificio de Microbiología	79
Gráfico 8: Frecuencia de Género de Hongos en el Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis	80
Gráfico 9: Frecuencia de Género de Hongos por ambiente en el Edificio de Microbiología	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Mínimo de aire puro.....	19
Tabla 2: Frecuencia en forma percentil de los hongos más comunes en el polvo doméstico	24
Tabla 3: Espacios físicos estudiados	38
Tabla 4: Cronograma de muestreo	43
Tabla 5: Números de muestreos según el área del local en m ²	46
Tabla 6: Características físicas del ambiente.....	60
Tabla 7: Recuento Promedio UFC por placa.....	70
Tabla 8: Géneros encontrados	72
Tabla 9: Prueba de muestras relacionadas.....	74
Tabla 10: Correlaciones de muestras relacionadas.....	74
Tabla 11: Diferencia de medias.....	75

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
ÍNDICE DE IMÁGENES	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi

CAPÍTULO 1

ASPECTOS PRELIMINARES

1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.4 OBJETIVOS	8
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	8
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Nivel de contaminación por esporas fúngicas.....	9
2.2 Síndrome del Edificio Enfermo.....	10
2.3 Método de captación de aire por impacto activo	11

2.4 Calidad de aire.....	13
2.4.1 Condiciones Generales Ambientales en el Trabajo.....	14
2.4.1.1 Superficie y cubicación en los locales y puestos de trabajo	14
2.4.1.2 Suelos, techos y paredes	14
2.4.1.3 Limpieza de locales	15
2.4.1.4 Medio ambiente y riesgos laborales por factores físicos, químicos y biológicos	15
2.4.1.5 Ambiente térmico	16
2.4.1.6 Ruidos y vibraciones.....	16
2.4.1.7 Iluminación.....	17
2.4.1.8 Ventilación	18
2.4.1.8.1 Cantidad de aire fresco según la INEN 1 126.....	18
2.4.1.8.2 Ventilación en laboratorios	19
2.4.1.9 Olores	21
2.4.2 Riesgos biológicos - Microorganismos.....	21
2.5 Hongos en el ambiente	22
2.5.1 Generalidades	22
2.5.2 Especies de hongos más comunes en el aire interior.....	23
2.5.3 Efectos sobre la salud	24
2.5.4 Hongos contaminantes de ambientes internos	25
2.5.4.1 <i>Aspergillus spp.</i>	25
2.5.4.1.1 Características macroscópicas de la colonia	25
2.5.4.1.2 Micromorfología	26
2.5.4.1.3 Enfermedades.....	27
2.5.4.2 <i>Cladosporium spp.</i>	28
2.5.4.2.1 Características macroscópicas de la colonia	28
2.5.4.2.2 Micromorfología	29
2.5.4.2.3 Enfermedades.....	29
2.5.4.3 <i>Penicillium spp.</i>	30
2.5.4.3.1 Características macroscópicas de la colonia	30
2.5.4.3.2 Micromorfología	30
2.5.4.3.3 Enfermedades.....	31
2.5.4.4 <i>Alternaria spp.</i>	31
2.5.4.4.1 Características macroscópicas de la colonia	31

2.5.4.4.2 Micromorfología	32
2.5.4.4.3 Enfermedades.....	33
2.5.4.5 <i>Rhizopus spp.</i>	33
2.5.4.5.1 Características macroscópicas de la colonia.....	33
2.5.4.5.2 Micromorfología	34
2.5.4.5.3 Enfermedades.....	35

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Localización del estudio.....	36
3.2 Determinación de las características de lugares de muestreo.....	37
3.3 Ambientes muestreados.....	37
3.3.1 Cronograma de muestreo.....	43
3.3.2 Cálculo del número de muestras	45
3.3.3 Modelo para muestrear un espacio físico.....	46
3.3.4 Medición de los metros cuadrados.....	47
3.3.5 Recolección y transporte de las muestras	47
3.3.6 Identificación de muestras	48
3.4 Procesamiento de las muestras	48
3.4.1 Equipos MAS 100 (Microbiological Air Sampler)	49
3.4.1.1 Beneficios.....	49
3.4.1.2 Funcionamiento	50
3.4.2 Medios de cultivo	51
3.4.3 Incubación	52
3.4.4 Método para el recuento de hongos en el aire.....	53
3.4.5 Métodos para la identificación microscópica de hongos.....	54
3.4.5.1 Técnica de la cinta adhesiva.	54
3.4.5.2 Microcultivo	55
3.4.6 Equipo de bioseguridad	57
3.4.7 Materiales, Reactivos y Desinfectantes	58

3.4.7.1 Materiales	58
3.4.7.2 Reactivos	58
3.4.7.3 Desinfectantes.....	58

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Condiciones físicas y ambientales de los lugares muestreados.....	59
4.2 Crecimiento de hongos en las placas de Agar.....	68
4.3 Resultados de Recuento de UFC por placa.....	69
4.4 Identificación de género	71
4.5 Análisis estadístico del nivel de contaminación (UFC/m ³).....	73
4.6 Contaminación entre los edificios y entre los ambientes analizados respecto a UFC/m ³	74

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES	82
5.2 RECOMENDACIONES	83
5.3 BIBLIOGRAFÍA.....	84
ANEXOS	92

ABSTRACT

Spores and fungal structures scattered in the air of domestic environments can be inhaled in several concentrations, and they can become a source of contamination, allergies, asthma, rhinitis, chronic bronchitis, and overall physical and mental stress and discomfort alterations that affect work performance.

The School of Bio-analysis, works in two buildings: Exact and Natural Sciences and Microbiology, these are divided in offices, classrooms, bathrooms, auditoriums and laboratories. All these spaces have lost modernity which together with factors like humidity, lack of ventilation, inadequate temperatures, and poor lighting make possible the presence of fungi and the development of the Sick Building Syndrome.

Our main goal was to detect if the School of Bio-analysis buildings are developing Sick Building Syndrome. Because of that, several factors were analyzed.

Air was sampled using active impact uptake. Fifty nine samples were taken from 31 sites. Twenty two genera of fungi were identified in the lab. The genus *Cladosporium spp.*, was the most polluting (90.32%), followed by *Penicillium spp.*, (64.52%), then the *Rhizopus spp.*, and the *Helminthosporium spp.*, with 32.3% respectively, The data was obtained from environments of both buildings.

To grow the fungi in the lab, two culture media were used: Potato Dextrose Agar and Rose Bengal Agar. Overall, the last one was more selective and more useful to count and identify these microorganisms.

AGRADECIMIENTO

A Dios quien es guía y camino a seguir, permitiéndome culminar el presente trabajo.

A mi padre Lic. Simón Rivadeneira por todo su esfuerzo y ayuda en esta etapa académica.

A mi madre Lic. Lourdes Calvache por estar siempre a mi lado apoyándome en cada instante de mi vida.

A toda mi familia por sus oraciones y su inmenso amor.

A la M.Sc. Elena Granda por su motivación y orientación en cada una de las fases de la investigación.

Al Ing. Ismael Márquez por su gran colaboración en el proceso de este trabajo

A las lectoras de esta tesis por su interés y participación.

A todos mis amigos que de una u otra manera contribuyeron para llevar acabo esta investigación.

DEDICATORIA:

A mi madre esencia de mi ser y fortaleza de mi espíritu, quien ha sido el motor que ha impulsado el cumplimiento de este trabajo y de todas mis metas.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS PRELIMINARES

1.1. INTRODUCCIÓN

La buena o mala calidad del aire de los ambientes internos puede estar influenciada por la presencia de partículas suspendidas en la atmósfera como son: polvo, polen, bacterias, hongos y virus. En este trabajo se identificaron los agentes microbianos que causan con mayor frecuencia alergias y problemas respiratorios en el personal que permanece al menos 4 horas en los ambientes internos.

Los agentes microbianos que se mencionan son los hongos, cuya proliferación depende principalmente, de la presencia de sustancias orgánicas, condiciones microclimáticas como: temperatura, humedad relativa, escasa ventilación, microbiota del aire externo y número de personas presentes, e incluso factores como la limpieza, el tiempo y tipo de materiales de construcción de las edificaciones.

“El problema de la presencia de agentes biológicos en el aire interno se ha abordado en diversas directrices: la relativa a la salud, normas nacionales de calidad del aire y normas profesionales según la Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo”^{39,1} En el presente trabajo se hará referencia a la calidad del aire y a los efectos que produzcan los hongos como una de las causas del Síndrome del Edificio Enfermo.

La manera en que se evaluó la calidad microbiológica del aire interno de la Escuela de Bioanálisis, fue mediante el recuento de esporas y estructuras fúngicas como un parámetro importante para establecer la posible existencia del Síndrome del Edificio Enfermo. El recuento de unidades formadoras de colonias de hongos se realizó mediante la captación de aire por impacto activo y la identificación del género de los hongos a través de cultivo en el laboratorio. Además, se establecen los parámetros necesarios de mantener las condiciones físicas y ambientales para asegurar óptimas condiciones de higiene y salud laboral.

¹ Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo, 2007

³⁹ Muzi, G. et., al, 2007

1.2. JUSTIFICACIÓN.

La Escuela de Bioanálisis fue creada como la primera Escuela de Tecnología Médica del Ecuador en agosto de 1968, con misión de formar profesionales que prestarían su ayuda en la orientación al diagnóstico clínico. En 1994 se crea la Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada, posteriormente en 1998 la Licenciatura en Bioanálisis Clínico y en el 2001 la Licenciatura en Histocitología.

Las tres carreras se imparten en los espacios correspondientes al Edificio de Ciencias Exactas y Naturales y al Edificio de Microbiología donde funciona también el DISerLAB - PUCE desde el año 2005. Estos espacios han sido adaptados para que funcionen laboratorios, oficinas, aulas, auditorios.

“Los propios ocupantes del edificio pueden ser una de las fuentes importantes de contaminación, ya que el ser humano produce de forma natural dióxido de carbono (CO_2), vapor de agua, partículas y aerosoles biológicos, siendo a la vez responsables de la presencia de otros contaminantes entre los que destaca el humo de tabaco que en sí contiene más de 3000 compuestos, entre ellos, monóxido de carbono (CO), aldehídos, óxidos de nitrógeno, metales, etc”⁶.

Por otra parte los materiales usados para el trabajo de oficina, pueden aportar contaminantes al ambiente. “Los productos como correctores, el ozono desprendido por las fotocopiadoras, los biocidas, los productos de limpieza, los desodorantes, y los mismos agentes biológicos con los que se trabaja en el laboratorio, etc”²¹.

En los exteriores de los edificios analizados hay árboles, arbustos y jardines, mismos que son hospederos de esporas fúngicas, además los humos de escape de automóviles, el óxido de azufre y otros son fuente de contaminación.

Los contaminantes biológicos pueden ser responsables de enfermedades infecciosas y también de alergias, por lo que hay que considerar los efectos de bacterias, virus, hongos,

⁶ Berenguer, M. José, 1990

²¹ Granados, T., 2008

ácaros, etc. “Los límites ambientales conocidos hasta el momento de estos contaminantes son muy pocos. En el caso de los contaminantes químicos, los efectos sobre el organismo pueden ser aditivos, sinérgicos o antagónicos y el conocimiento de estas interacciones aun es limitado”⁶.

“Las causas más frecuentes del Síndrome del Edificio Enfermo (SEE) son una ventilación insuficiente (50% a 52%); contaminación generada en el interior, como la producida por máquinas de oficina, humo del tabaco o productos de limpieza (17% a 19%); contaminación procedente del exterior del edificio por una disposición inadecuada de las entradas de aire (11%); contaminación microbiológica por agua estancada en los conductos del sistema de ventilación, humidificadores (5%); compuestos orgánicos emitidos por materiales de construcción y decoración (3% a 4%)”².

“Los sistemas de ventilación de los edificios deben ser diseñados no sólo para calentar y enfriar el aire, sino también para hacer circular el aire exterior, regenerando el aire del interior del edificio.”⁵⁰ Si están mal diseñados o sin un mantenimiento adecuado, pueden contribuir a la problemática de la calidad del aire interior.

La calidad del aire interior en los edificios, precisa de una mejor atención y caracterización del contenido de los bioaerosoles existentes. Cualquier foco de crecimiento de microorganismos puede conducir a la diseminación e incremento de estos organismos por toda la estructura edificada y al contrario de lo que sucede con los contaminantes químicos, los biológicos son capaces de reproducirse, por lo que es necesario el mantenimiento de sus niveles lo más bajos posibles.

“La OMS establece que a nivel Mundial, el 30% de los Edificios Públicos han sido afectados por este Síndrome y señala estudios realizados en Gran Bretaña, sobre una muestra de 4.500 oficinistas de 46 Edificios, de los cuales el 29% se encontraba afectado por 5 o más síntomas asociados al SEE”⁹.

² Aguiar, X., 2009

⁶ Berenguer, M. José, 1990

⁵⁰ Venegas, E., 2010

⁹ Burgos, D., 2007

El problema del SEE es reciente y se ha dado principalmente en edificios construidos en los últimos 20 años. “El Instituto Nacional Americano de Seguridad e Higiene (NIOSH) ha efectuado más de 1.000 investigaciones acerca de calidad de aire en Edificios de Estados Unidos”⁹, contribuyendo a la determinación de éste Síndrome.

“En la actualidad, en el Ecuador no se ha realizado investigaciones minuciosas sobre el Síndrome del Edificio Enfermo, y se desconoce el número de edificaciones que pueden tener este problema y el grado de incidencia de afecciones en la salud integral de los trabajadores”⁸.

En base a todos los datos indicados, es de suma importancia la realización del presente trabajo, para analizar la situación actual de la calidad del aire interior en los ambientes de la Escuela de Bioanálisis; áreas donde se manejan microorganismos como bacterias y hongos, y que son susceptibles a diseminación.

A todo lo anterior se suman las condiciones del edificio como son: escasa ventilación, poca iluminación, humedad y tiempo de permanencia de sus ocupantes, que son factores que ayudan al desencadenamiento del Síndrome. Con los resultados del estudio se evaluará si la Escuela de Bioanálisis presenta hongos que son una de las causas del Síndrome del Edificio Enfermo.

Dentro de los edificios de la PUCE hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio aerobiológico y microbiológico constituyéndose éste, como el primer trabajo que evalúa la calidad del aire de estas dependencias.

⁸ Bowen, G, 2011

⁹ Burgos, D., 2007

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las alfombras, pisos flotantes, y cerámicas, así como también la falta de iluminación, mala ventilación, humedad, materiales de construcción de bajo costo, según la OMS son características para que se desarrolle el Síndrome del Edificio Enfermo. En la mayoría de oficinas y auditorios objeto del estudio se mantienen alfombras y muebles tapizados, en archivos, bodegas y sótanos la iluminación es deficiente, en cuartos de lavado, baños, y ciertos laboratorios se evidencia humedad.

“El hombre permanece alrededor de un 90% de su tiempo en el interior de edificios, en muchos de los cuales la calidad del aire interior se encuentra disminuida por la acumulación de compuestos orgánicos volátiles (COVs), bacterias, hongos, etc.”²². En el estudio es importante resaltar el tiempo de permanencia de los ocupantes, el cual varía de 4 a 8 horas.

“Los hongos se encuentran íntimamente relacionados con el Síndrome del Edificio Enfermo, ya que sus esporas son fácilmente dispersadas por el aire”⁵⁰. La prevalencia de alergias y problemas respiratorios en el personal se pueden relacionar con la respiración de altas concentraciones de esporas y estructuras fúngicas, lo que provoca altas reacciones de hipersensibilidad e incluso asma.

Las reacciones de hipersensibilidad pueden ser: “inmediata o alergia que afecta al aparato respiratorio superior causando rinitis y asma, producida por partículas de 30µm como las esporas de *Puccinia spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, y retardada, que afecta al aparato respiratorio inferior produciendo alveolitis, neumonitis, debida a partículas menores de 5µm, principalmente esporas de *Aspergillus* y *Penicillium*”¹⁶.

“Algunos microorganismos se encuentran en forma de células vegetativas, pero las más frecuentes son las formas esporuladas, ya que las esporas son metabólicamente menos

²² Guardino, X., 2009

⁵⁰ Venegas, E., 2010

¹⁶ De la Rosa, M., 2002

activas y sobreviven mejor en la atmósfera porque soportan la desecación. Las esporas son producidas por hongos, algas, líquenes, algunos protozoos y algunas bacterias”¹⁶.

La presencia de microorganismos en edificios y materiales dañados, está ligada a la actividad del agua de los materiales que han colonizado. “Entre las especies que crecen de manera óptima con una actividad de agua elevada (>0,90-0,95) se encuentran los siguientes hongos: *Aspergillus fumigatus*, *Exophiala spp.*, *Phialophora spp.*, *Trichoderma spp.*, *Ulocladium spp.*, *Stachybotrys spp.* *Fusarium spp*”³⁹. La presencia de tales especies indica un elevado contenido de agua en los materiales colonizados y puede ser un indicio de que hay daños por agua.

“Algunas enfermedades fúngicas son transmitidas por el aire. Ciertos hongos levaduriformes: *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Histoplasma* son responsables de enfermedades pulmonares, desde donde pueden invadir otros tejidos y producir una enfermedad sistémica”¹⁶.

“Una vez que los hongos se han desarrollado sobre una superficie, la incidencia de diversos factores como las corrientes de aire que ejercen un efecto de arrastre mecánico, la desecación que favorece la pulverulencia, o las vibraciones causadas por actividades cotidianas, ocasionan que el polvo se suspenda en el aire conteniendo metabolitos fúngicos, como micotoxinas o fragmentos fúngicos (esporas, hifas y propágulos)”²⁹.

“Las partículas inhaladas mayores de 10µm quedarán retenidas por el sistema de limpieza mucociliar en la región nasofaríngea, donde pueden causar irritación. Las partículas inhaladas menores de 2,5µm, como son la mayoría de las esporas y el polvo orgánico, pueden llegar hasta las vías respiratorias bajas, incluso a los alveolos, donde pueden originar reacciones asmáticas, si son partículas de naturaleza antigénica, o ser absorbidas y surtir efecto biológico en el caso de las micotoxinas”²⁹.

¹⁶ De la Rosa, M., 2002

³⁹ Muzi, G., et al, 2007

²⁹ Mancha, F., 2007

El análisis microbiológico de los microambientes de la Escuela de Bioanálisis, es indispensable realizarlo, porque permitirá determinar la presencia de hongos, el nivel de contaminación por ellos causado, y las características físicas que presentan los ambientes como parámetros importantes para el desarrollo del Síndrome del Edificio Enfermo.

Preguntas directrices:

¿Qué tipo de hongos existen en los ambientes de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador que alteren la calidad del aire interior?

¿Cuál es la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias de hongos por metro cúbico que afectan la calidad del aire interior?

¿Dónde se realizó el estudio de la calidad de aire interior?

¿Qué características físicas presentan los edificios que favorezcan la presencia de hongos en los ambientes?

1.4. OBJETIVOS.

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar la calidad microbiológica del ambiente en la Escuela de Bioanálisis-PUCE mediante el recuento de esporas fúngicas como un parámetro importante para establecer la existencia del Síndrome del Edificio Enfermo.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la importancia de mantener las condiciones físicas y ambientales adecuadas en los ambientes de la Escuela de Bioanálisis-PUCE para asegurar óptimas condiciones de higiene y salud laboral.
- Establecer el nivel de contaminación por esporas fúngicas en los edificios donde funciona la Escuela de Bioanálisis-PUCE mediante la captación de aire por impacto activo.
- Identificar el género de los hongos presentes en los ambientes de la Escuela de Bioanálisis-PUCE mediante el cultivo en el laboratorio.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Nivel de contaminación por esporas fúngicas

La contaminación del aire en espacios cerrados o intramuros es una de una de las mayores amenazas para la salud en la actualidad. “Investigaciones realizadas en Estados Unidos por EPA (Environmental Protection Agency) y otros autores mostraron que el ambiente en áreas intramuros puede estar hasta diez veces más contaminado que el extramuro”¹⁷.

Además, muchas personas realizan la mayor parte de sus actividades en oficinas, salones de clase y habitaciones, convirtiéndose en una fuente de contaminación porque producen cantidades considerables de humo de tabaco, compuestos orgánicos e inorgánicos en elaboración de comidas y combustión de equipos eléctricos.

“Los contaminantes tienen dos orígenes: Los del aire exterior que se introducen por los sistemas de ventilación natural o forzada en los edificios; y los del ambiente interior creado por las actividades rutinarias de limpieza, el mobiliario, los materiales de construcción, los recubrimientos de superficies y los tratamientos del aire”²². Los contaminantes presentes en el aire interior son de interés para el estudio.

Las esporas fúngicas se encuentran diseminadas en el aire tanto interior como exterior y pueden ser inhaladas en varias concentraciones por el hombre y los animales, lo que aumenta el riesgo de síntomas respiratorios y alergias en las personas. “Estos padecimientos incluyen, entre otros, irritación de las membranas mucosas, bronquitis crónica, rinitis alérgica y asma, aparte de alteraciones físicas y mentales como estrés, ansiedad e incomodidad, los cuales pueden repercutir en el rendimiento laboral”¹⁷.

¹⁷ Díaz, M., et al, 2010

²² Guardino S., 2009

“Cuando se describen estos síntomas, provocados por los microorganismos y contaminantes en los ocupantes de intramuros, se habla del Síndrome del Edificio Enfermo”¹⁷.

Las razones por las que ocurre este Síndrome no son muy claras y se ha indicado que la exposición a contaminantes, como las esporas y estructuras de hongos, pueden ser un factor que contribuya a desencadenar padecimientos como los anteriormente señalados.

2.2 Síndrome del Edificio Enfermo

El Síndrome del Edificio Enfermo (SEE) se define como un síndrome leve, “que se manifiesta en los ocupantes de un edificio y cuyas causas radican en el propio inmueble”³⁰. El SEE es preocupante, especialmente en los entornos laborales, ya que sus principales consecuencias son económicas, al provocar una disminución de la productividad de los trabajadores afectados.

Este Síndrome lo presentan las personas que realizan sus actividades profesionales a través de varios síntomas, los cuales no van acompañados de ninguna lesión orgánica o signo físico. “Los pacientes presentan quejas referentes a su salud en una proporción mayor a la que sería razonable y las causas son difíciles de identificar dado que en muchos casos tienen un origen multifactorial.”²⁰.

Los síntomas que se relacionan con el Síndrome son: “irritaciones de los ojos, nariz y garganta, ronquera, sensación de sequedad en membranas de las mucosas y la piel; eritemas (erupciones cutáneas), respiración dificultosa, comezón, hipersensibilidades inespecíficas, náuseas, mareos y vértigos, dolor de cabeza, fatiga mental, elevada incidencia de infecciones respiratorias y resfriados, entre otros.”⁶.

En ciertos edificios pueden estar potenciadas algunas enfermedades como la sinusitis y algunos tipos de eczemas.

¹⁷ Díaz, M., et al, 2010

³⁰ Manzana, A., 2007

⁶ Berenguer, M. José, 1990

²⁰ Garrett, M, 1997

Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) diferencia dos tipos distintos de edificios enfermos.

“El que presentan los edificios temporalmente enfermos, (edificios nuevos o de reciente remodelación en el que los síntomas disminuyen y desaparecen con el tiempo; aproximadamente medio año), y el que presentan los edificios permanentemente enfermos (cuando los síntomas persisten, a menudo durante años, a pesar de haberse tomado medidas para solucionar los problemas)”⁶.

La OMS sostiene que estos edificios tienen una serie de características comunes:

- “Casi siempre poseen un sistema de ventilación forzada y estandarizada a todo el edificio o a amplios sectores y existe una recirculación parcial del aire.
- Algunos edificios son de construcción ligera y poco costosa. Generalmente tienen mal ubicadas las tomas de renovación de aire; mientras otros utilizan intercambiadores de calor que transfieren los contaminantes desde el aire de retorno al aire de suministro.
- Las superficies interiores están en gran parte recubiertas con material textil, incluyendo paredes, suelos y otros elementos de diseño interior, lo cual favorece a la relación entre superficie interior y volumen.
- Al interior de los inmuebles se practica el ahorro energético y se mantienen relativamente calientes con un ambiente térmico homogéneo. No obstante, muchos de ellos son herméticos, es decir, tienen sus ventanas selladas, sin que se puedan abrir”.⁴⁴

2.3 Método de captación de aire por impacto activo^{31, 32, 33, 34}

“Para la captación de polen y esporas presentes en el aire existen diferentes procedimientos, agrupables en procedimientos pasivos (gravimétricos y de impacto pasivo) y activos o volumétricos (de impacto activo, y de filtración activa)”⁶.

^{31,32,33,34}, Martí, M. Carmen, et al, 2003

⁶ Berenguer, M. José, 1990

⁴⁴ Pinzón V., 2010

“Este método se basa en la aspiración de un volumen de aire, el cual es conducido a través de una superficie perforada sobre una placa conteniendo un medio de cultivo adecuado, se utiliza para la captación de bacterias y hongos”^{31,32}, ha sido empleado en algunos estudios como en España en el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), en Colombia en la Universidad de la Salle, en Costa Rica y en otros países.

En el estudio realizado se utilizó el método de captación de aire por impacto activo o volumétrico para lo cual se empleó el equipo MAS 100 (Microbiological Air Sampler), mismo que regula el volumen de aire de acuerdo a la presión y a la temperatura y por lo tanto da todo el tiempo resultados comparables.

“El equipo dispone de un conector de control de tiempo, dividido en unidades que van de 1 a 15, representando cada una de ellas un tiempo de 20 segundos. El volumen de aire muestreado en cada unidad es equivalente a 30 litros, lo que implica que se pueden realizar muestreos con una duración de 20 segundos hasta 5 minutos y con unos volúmenes de 30 a 450 litros de aire”^{31,32}. “El tiempo y el volumen de muestreo dependen de la contaminación ambiental que se sospeche. Cuanto mayor sea ésta, menor es el tiempo de muestreo que se debe aplicar y viceversa”³¹.

El método para el recuento de bacterias y hongos en el aire, descrito en la NTP 299 (Nota técnica de Prevención), se basa en el muestreo del aire problema mediante un equipo en este caso el MAS 100 (Microbiological Air Sampler), mismo que es portátil, de fácil manejo, y que permite elegir el medio de cultivo adecuado para cada requerimiento.

La elección del medio de cultivo se hace según lo que se quiera investigar, en este estudio se requiere la utilización de medios que permitan el crecimiento de hongos. “Posteriormente se procede a la incubación a una temperatura adecuada y finalmente se efectúa el conteo de colonias expresando el resultado en UFC/m³ (Unidades Formadoras de Colonias por metro cúbico)”³¹.

^{31,32} Martí, M. Carmen, et al, 2003

La norma NTP 335 (ANEXO 1), permite además del recuento e identificación de hongos, la identificación de esporas fúngicas y de granos de polen directamente por observación al microscopio óptico.

“Las bacterias saprofitas y hongos se desarrollan en el interior de los edificios y pueden crecer en las superficies de recubrimiento de paredes, suelos y lugares donde se acumula polvo y en los sistemas de calefacción, ventilación, y aire acondicionado, liberando esporas y células en el aire, siendo el *Cladosporium spp.* y *Penicillium spp.* los mohos más abundantes”³¹.

“El polen y las esporas son elementos reproductores de las plantas fanerógamas y de los hongos respectivamente, que son liberados de las anteras y esporangios por dehiscencia de estos órganos. Esta liberación puede ser de forma explosiva, de una sola vez, o de forma gradual, dependiendo de la planta u hongo que se trate”³¹. Por ello, podemos considerar a las plantas y hongos como centros emisores de partículas, en este caso de partículas biológicas.

2.4 Calidad del aire

Para el estudio propuesto es importante mencionar los temas relacionados con la calidad de aire entre ellos la situación de la salud ambiental en nuestro país.

“El monitoreo de calidad de aire se realiza especialmente en las grandes ciudades como Quito, Guayaquil y Cuenca, pero se desconoce las consecuencias producidas en el aparato respiratorio así como otras enfermedades crónicas especialmente en grupos vulnerables como niños, ancianos y mujeres embarazadas”²⁸.

“Las cuatro enfermedades en las que más influyen las malas condiciones ambientales son: la diarrea, las infecciones de las vías respiratorias inferiores, diversas formas de traumatismos involuntarios, y la malaria”²⁸.

³¹ Martí, M. Carmen, 2003

²⁸ Logroño, M, 2011

“Las infecciones de las vías respiratorias inferiores (37 millones de AVAD (años de vida ajustados en función de la discapacidad: el número de años que habría podido vivir una persona, perdidos por su defunción prematura, y los años de vida productiva perdidos por discapacidad) por año; el 41% de los casos registrados a nivel mundial), producidas en gran medida por la contaminación del aire en espacios tanto exteriores como interiores”²⁸.

“La neumopatía obstructiva crónica es una enfermedad en ligero aumento que se caracteriza por la pérdida gradual de la función pulmonar (12 millones de AVAD por año; el 42% de los casos registrados a nivel mundial), provocada en gran medida por la exposición a polvos y humos en el lugar de trabajo y otras formas de contaminación del aire en espacios exteriores e interiores”²⁸.

2.4.1 Condiciones Generales Ambientales en el Trabajo

2.4.1.1 Superficie y cubicación en los locales y puestos de trabajo

1. “Los locales de trabajo reunirán las siguientes condiciones mínimas:
 - a) Los locales de trabajo tendrán 3 metros de altura del piso al techo como mínimo
2. Los puesto de trabajo en dichos locales tendrán:
 - a) Dos metros cuadrados de superficie por cada trabajador
 - b) Seis metros cúbicos de volumen para cada trabajador”³⁷

2.4.1.2 Suelos, Techos y Paredes

1. “Los techos y tumbados deberán reunir las condiciones suficientes para resguardar a los trabajadores de las inclemencias del tiempo
2. Las paredes serán lisas, pintadas en tonos claros y susceptibles de ser lavadas y desinfectadas.”³⁷

³⁷Ministerio de Trabajo y Salud, 2000

²⁸ Logroño, M, MSP 2011

2.4.1.3 Limpieza de locales

1. “Los locales de trabajo y dependencias anexas deberán mantenerse siempre en buen estado de limpieza.
2. En los locales susceptibles de que se produzca polvo, la limpieza se efectuará preferentemente por medios húmedos o mediante aspiración en seco, cuando aquella no fuera posible o resultare peligrosa.
3. Todos los locales deberán limpiarse perfectamente, fuera de las horas de trabajo, con la antelación precisa para que puedan ser ventilados durante media hora, al menos, antes de la entrada al trabajo.
4. Cuando el trabajo sea continuo, se extremaran las precauciones para evitar los efectos desagradables o nocivos del polvo o residuos, así como los entorpecimientos que la misma limpieza pueda causar en el trabajo.
5. La limpieza de ventanas y tragaluces se efectuará, con la regularidad e intensidad necesaria.
6. Para las operaciones de limpieza se dotará al personal de herramientas y ropa de trabajo adecuadas y, en su caso, equipo de protección personal.”³⁷

2.4.1.4 Medio Ambiente y Riesgos Laborales por factores físicos, químicos y biológicos

1. “En los locales de trabajo se procurará mantener, por medios naturales y artificiales, condiciones atmosféricas que aseguren un ambiente cómodo y saludable para los trabajadores.
2. En los locales de trabajo cerrados el suministro de aire fresco y limpio por hora y trabajador será por lo menos de 30 metros cúbicos, salvo que se efectúe una renovación total del aire no inferior a 6 veces por hora.
3. La circulación de aire en locales cerrados se procurará adicionar de modo que los trabajadores no estén expuesto a corrientes molestas y que a velocidad no sea superior a 15 metros por minuto a temperatura normal, ni de 45 metros por minuto en ambientes calurosos

³⁷ Ministerio de Trabajo y Salud, 2000

4. En los centros de trabajo expuestos a altas y bajas temperaturas se procurará evitar las variaciones bruscas³⁷.

2.4.1.5 Ambiente térmico

“El más aceptado es el conjunto de las normas de confort térmico recomendadas en ISO 7730-1984 que establece un intervalo óptimo de temperaturas (aire, radiante y simetría radiante) y condiciones para personas con diferentes intervalos metabólicos y usando diferentes ropas.

Los valores recomendados son:

- Temperatura operativa del aire: 22 °C \pm 2 °C para invierno y 24,5 °C \pm 1,5 °C para verano.
- Diferencia vertical de temperatura del aire entre 1,1 y 0,1 metros (cabeza y tobillo) inferior a 3 °C.
- Temperatura de superficie de suelo entre 19 y 26 °C (29 °C para sistemas de calefacción por suelo).
- Velocidad media del aire inferior a 0,15 m/seg en invierno y 0,25 m/seg en verano.
- Asimetría de temperatura radiante debida a planos verticales (ventanas, etc.) inferior a 10 °C.
- Asimetría de temperatura radiante debida a planos horizontales (techos, etc) inferior a 5 °C.”²¹

2.4.1.6 Ruidos y vibraciones

1. “Se fija como límite máximo de presión sonora el de 85 dB escala A del sonómetro, medidos en el lugar en donde el trabajador mantiene habitualmente la cabeza, para el caso de ruido continuo con 8 horas de trabajo. No obstante los puestos de trabajo que demanden fundamentalmente actividad intelectual, o tarea de regulación o de vigilancia, concentración o cálculo, no excederán a 70 dB de ruido.

³⁷ Ministerio de Trabajo y Salud, 2000

²¹ Granados Toni, 2011

2. Para el caso de ruidos continuos los niveles sonoros, medidos en dB con el filtro “A” en posición lenta, que se permitirán, estarán relacionados con el tiempo de exposición según los siguientes valor:

Nivel sonoro /dB (A-lento)	Tiempo de exposición por jornada/hora
85	8
90	4
95	2
100	1
110	0,25
115	1,25

3. Las vibraciones producidas en las cercanías de un edificio o debidas a máquinas instaladas en el mismo también pueden afectar.”³⁷

2.4.1.7 Iluminación

1. “Todos los lugares de trabajo y tránsito deberán ser dotados de suficiente luz natural y artificial para que el trabajador pueda efectuar sus labores con seguridad y si daño para los ojos.
2. En las zonas de trabajo que por su naturaleza carezcan de iluminación natural, sea esta insuficiente o se proyecten sombras que dificulten las operaciones, se empleará la iluminación artificial adecuada que deberá ofrecer garantías de seguridad, no viciar la atmósfera del local ni presentar peligro de incendio o explosión.
3. Cuando la índole del trabajo exija la iluminación intensa de un lugar determinado, se combinará la iluminación general con otro local, adaptada a la labor que se ejecute, de tal modo que evite deslumbramientos, en este caso la iluminación general más débil será como mínimo de un tercio de la iluminación localizada, medidas ambas en lux (Unidad derivada, basada en el lumen, que a su vez es una unidad derivada basada en la candela o intensidad luminosa)”³⁷.

³⁷ Ministerio de Trabajo y Salud, 2000

2.4.1.8 Ventilación

“Una ventilación insuficiente es una de las causas más frecuentes de SEE. Las normativas sobre aportes mínimos de aire existen en muchos países, pero varían de unos a otros, así como entre zonas de no fumadores y de fumadores (intervalo entre 2,5 - 20 litros por segundo y por persona).

La International Energy Agency (IEA) indica que un aporte de aproximadamente 8 litros por segundo (cerca de 30 m³ /h) por persona (actividad sedentaria) será adecuada para extraerlos bioefluentes humanos (olores) en áreas de no fumadores”⁶.

Para una oficina: “se recomienda un aporte mínimo por persona de 10 L/seg (cerca de 35 m³ /h) y para una sala de fumadores este valor debe aumentarse hasta 30 L/seg por persona

La ventilación en sí no debiera ser causa de problemas adicionales, sin embargo hay que cuidar el mantenimiento y limpieza de los equipos de ventilación y evitar recirculaciones de aire que puedan introducir nuevos contaminantes”⁶.

2.4.1.8.1 Cantidad de aire fresco según la INEN 1 126

1. “La cantidad de aire fresco que se requiere para mantener el dióxido de carbono del aire dentro de los límites de seguridad y para proporcionar el contenido de oxígeno suficiente en el aire para la respiración, es muy pequeña.
2. Las normas mínimas de ventilación se basan en el control del olor del cuerpo y el retiro de producto de combustión, o en mantener un ambiente termal satisfactorio, dependiendo de la zona climatológica.

⁶Berenguer, M. José, 1990

3. El volumen de aire fresco que se requiere para la renovación del olor perceptible del cuerpo está influenciado por el espacio de aire por persona.”²⁵ (Tabla 1)

Tabla 1. Mínimo de aire puro

TIPO DE LOCAL	Mínimo de aire fresco recomendable por persona m³/h
Sala con menos de 6 m ³ /persona	28
Sala de 6 m ³ a menos de 9 m ³ /persona	20
Sala de 9 m ³ a menos de 12 m ³ /persona	17
Sala de 12 m ³ a más por persona	10
Baños y lavatorios	28

Fuente: INEN 1 126, 2004

2.4.1.8.2 Ventilación de Laboratorios

“En cuanto al número de renovaciones de aire/ hora a conseguir en el laboratorio, se recomienda aportes de aire de 25 a 35 m³/hora por persona, o hasta 20 e incluso 30 renovaciones por hora en laboratorios de tipo medio.

El control del ambiente del laboratorio, entendiendo por tal la evacuación de contaminantes, exige en principio dos actuaciones bien diferenciadas: la retirada de contaminantes y la renovación del aire. Cualquier proceso o tarea susceptible de liberar contaminantes, debe ser tratado convenientemente con el fin de que aquellos no afecten la atmósfera de trabajo, o lo hagan en el mínimo grado posible. Debe insistirse en que el recurso eficaz para eliminar la contaminación química o biológica generada por la actividad del laboratorio es la extracción localizada.”²³

“Evidentemente existen numerosos laboratorios que únicamente disponen del recurso de la ventilación natural. Obviamente esta ventilación sólo es viable en ciertas épocas del año,

²⁵ INEN, 2004

²³ Heras, C., 1992

con lo cual el discomfort será la nota dominante en época de verano y durante el invierno, se presentará el dilema de padecer bajas temperaturas o bien soportar la contaminación residual y los olores típicos del laboratorio. Además de estos inconvenientes, la ventilación natural plantea que las corrientes de aire que apagan las llamas de los mecheros, provocan golpes continuos de puertas y ventanas, enfrían los elementos calefactores y montajes, causan evaporaciones inconvenientes, y alteran el funcionamiento de los sistemas clásicos de extracción localizada en los laboratorios: las campanas, las vitrinas de gases y las cabinas de seguridad biológica.

Se hace necesario plantear la necesidad de establecer circulaciones de aire, eludiendo la generación de zonas muertas, y consiguiendo que el aire limpio barriera perfectamente las zonas contaminadas en su recorrido hacia los puntos de extracción. Así, las entradas de aire deberían localizarse en las partes opuestas a las que hayan acogido a los extractores, a base de rejillas en puertas y pasillos (siempre que el laboratorio no presentara riesgos de incendio o explosión y siempre que su presión fuera inferior a la de los pasillos).

Los extractores de renovación de aire deben ser usados para la eliminación de contaminación causada por un accidente (vapores generados por el vertido de un producto químico, formación de un aerosol, etc.)

Sea cual fuere el sistema adoptado para renovar el ambiente del laboratorio, la retirada del aire extraído del laboratorio exige una adecuada distribución de las tomas de aire y de las salidas. Si todas ellas se encuentran en las fachadas del edificio, las entradas se dispondrán en fachadas con distinta orientación con respecto a las salidas. Si ambas deben quedar dispuestas en los tejados, habrán de tenerse en cuenta los vientos dominantes y las alturas relativas. El aire del laboratorio no debe ser nunca recirculado, excepto en casos muy especiales y siempre que se contara con un previo tratamiento a fondo.²³

“Cuando se planifique una nueva instalación, habrá que prever un sistema mecánico de ventilación que introduzca aire del exterior sin recirculación. Cuando no se disponga de

²³ Heras C., 1992

ventilación mecánica, las ventanas deberán poder abrirse y, a ser posible, estarán provistas de mosquiteras.

Debe haber un sistema de ventilación que establezca un flujo direccional hacia el laboratorio. Se instalará un dispositivo de vigilancia visual, con o sin alarma, para que el personal pueda comprobar en todo momento que la corriente de aire circula en el sentido deseado.”⁴¹

2.4.1.9 Olores

“Algunos gases y vapores pueden ocasionar disconformidad sensorial debido a olores e irritaciones que pueden producir ansiedad y estrés, especialmente cuando sus fuentes no están identificadas.

Factores psicosociales: estos factores pueden desempeñar un papel importante aumentando el estrés del personal. La organización del trabajo, la insatisfacción en general, el tiempo de trabajo, el contenido.”⁶

2.4.2 Riesgos Biológicos - Microorganismos

1. “En aquellos trabajos en que se manipule microorganismos o sustancias de origen animal o vegetal susceptibles de transmitir enfermedades infecto contagiosas, se aplicarán medidas de higiene personal y desinfección de los puestos de trabajo, dotándose al personal de los medios de protección necesarios. Se efectuarán reconocimientos médicos específicos de forma periódica. En su caso, se utilizará la vacunación preventiva.
2. Todo trabajador expuesto a virus, bacterias, insectos, ofidios, microorganismo, etc., nocivos para la salud, deberán ser protegidos en la forma indicada por la ciencia médica y la técnica en general.

⁴¹ Organización Mundial de la Salud, 2005

⁶ Berenguer M. José, 1990

3. Se evitará la acumulación de materias orgánicas en estado de putrefacción. Igualmente deberá mantenerse libre de insectos y roedores, los medios de transporte, las industrias, talleres, almacenes, comercios, centros de trabajo, viviendas y locales reunión, sus instalaciones y alrededores.”³⁷

2.5 Hongos en el ambiente

2.5.1 Generalidades

“Los hongos se dividen en dos grupos: las levaduras y mohos microscópicos conocidos como microhongos, y los macrohongos, ya que producen esporas macroscópicas apreciables a simple vista. Los hongos colonizan sustratos formando redes (micelio) o filamentos (hifas). Los hongos filamentosos producen numerosas esporas que se dispersan por el aire a partir de estructuras microscópicas y de estructuras grandes”¹⁹ .

“La mayoría de los hongos son pluricelulares o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas asexuales y sexuales”³⁴.

“Las esporas fúngicas son componentes normales de ambientes externos. Actualmente, se conoce que el aire presente en los ambientes exteriores puede ser la fuente de esporas fúngicas contaminantes de los ambientes internos. A su vez, muchos de estos últimos pueden servir como sitios de amplificación para el crecimiento de los hongos. Así, cuando se presenta una alta humedad, las esporas pueden germinar y el hongo puede crecer produciendo miles de nuevas esporas que utilizan la materia orgánica de esos sitios”²⁶.

³⁷ Ministerio de Trabajo y Salud, 2000

¹⁹ Flannigan, B., 1993

³⁴ Martí, M. Carmen, 1997

²⁶ Karoldu, 2010

Las esporas identificadas en este estudio, están enmarcadas dentro de la división deuteromycota (hongos imperfectos), que reúne un elevado número de hongos de importancia económica y sanitaria y que no se reproducen sexualmente.

“La mayoría de los hongos presentes en los ambientes internos son saprófitos, porque ellos obtienen lo que necesitan para su metabolismo de materiales muertos, materia orgánica o sustratos como madera, papel, pintura, suelo, polvo, piel y alimentos. No hay un cierto nivel de los hongos ambientales que puede ser considerado como seguro. Esto depende de la concentración fúngica en los ambientes externos y de los tipos de esporas presentes en el ambiente interno”²⁶.

“Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición.

Algunas especies de hongos pueden producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas como, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, que es un hongo filamentoso. Por otra parte, algunos hongos son difásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras”³⁴.

“Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en una superficie son: existencia de esporas, base nutriente, humedad y temperatura entre 4°C y 38°C”³⁴.

2.5.2 Especies de hongos más comunes en aire interior³⁴

“Las especies de hongos más comunes que se encuentran en aire interior están reflejadas en la Tabla 2, a partir de los resultados obtenidos en dos estudios diferentes publicados en Biocontaminants in Indoor Environment. Los hongos más comunes existentes en el polvo de origen doméstico pueden fácilmente pasar al aire; y si se dan las condiciones adecuadas para su desarrollo en cuanto a temperatura y humedad relativa, también pueden acantonarse en cualquier tipo de material como alfombras, moquetas, empapelado de una pared, etc. y

²⁶ Karoldu, 2010

³⁴ Martí, M. Carmen, et al, 2003

crecer desmesuradamente, proyectando al ambiente un número elevado de esporas con el consiguiente riesgo para la salud”³⁴.

Tabla 2. Frecuencia en forma de percentil de los hongos más comunes en el polvo doméstico.

ESPECIES DE HONGOS	PORCENTAJE
<i>Cladosporium spp.</i>	>80%
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	
<i>Cladosporium herbarum</i>	
<i>Penicillium spp.</i>	80%
Levaduras rosas y blancas	>79%
<i>Botrytis cinérea</i>	>50%
<i>Aspergillus spp. Aspergillus fumigatus,</i> <i>Aspergillus niger, Aspergillus ochroaceus,</i> <i>A. oryzae, Aspergillus versicolor,</i> <i>Aspergillus glaucus</i>	37%
<i>Paecilomyces variotii</i>	< 20%
<i>Stachybotrys atra</i>	< 20%
<i>Phoma spp.</i>	< 20%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	20 – 30%
<i>Alternaria alternata</i>	< 20%
<i>Epicoccum purpurascens</i>	20 – 30%
<i>Geotrichum candidum</i>	20 – 30%
<i>Ulocladium spp., Ulocladium chartarum,</i> <i>Ulocladium consortiale</i>	20 – 30%
<i>Trichoderma viride</i>	< 20%
<i>Trichoderma harzianum</i>	< 20%
<i>Mucor spp.</i>	<20%

Fuente: Health y Welfare, 1987 by Flannigan, et al, 1993

2.5.3 Efectos sobre la salud³⁴

“Los hongos a través de sus esporas, micotoxinas y por la emisión de VOC (compuestos volátiles orgánicos), pueden causar diferentes tipos de enfermedades o alteraciones de la salud”^{3,34}

³⁴ Martí M. Carmen, 2003

³ Albright DM, 2001

- “Enfermedad infecciosa o patogénica: Aspergillosis (por exposición a *Aspergillus fumigatus*), Histoplasmosis (por *Histoplasma spp.*), Criptococosis (por *Cryptococcus spp.*) y Coccidiomicosis (por *Coccidioides spp.*)
- Reacciones alérgicas, como rinitis y asma
- Neumonitis por hipersensibilidad
- Cáncer debido a micotoxinas carcinogénicas
- Desórdenes inmunológicos por micotoxinas inmunosupresivas
- Reacciones tóxicas por micotoxinas
- Reacciones de inflamación debidas al β -1,3-glucano, compuesto de la pared celular de los hongos
- Irritación debida a VOC fúngicos como por ejemplo alcohol
- Síndrome del Edificio Enfermo”^{3,34}

2.5.4 Hongos contaminantes de ambientes internos

Desde la perspectiva ambiental, un aumento de estos microorganismos en ambientes internos trae consigo una serie de alteraciones en el medio ambiente llegando a producir una contaminación del aire, de la manera ya antes mencionada como es la dispersión de numerosas esporas fúngicas desde sus reservorios a los diferentes ambientes.

A continuación se describe el género de algunos hongos contaminantes ambientales, con sus características morfológicas y las enfermedades que ellos producen.

2.5.4.1 *Aspergillus spp.*:

2.5.4.1.1 Características macroscópicas de la colonia:

En medios como el PDA y Sabouraud

Anverso: “El tamaño es ilimitado, tiende a cubrir todo el medio en 1 a 2 días. La textura es variable entre: aterciopelada, granular, algodonosa”⁷. ”Las coloraciones pueden ser según

³ Albright DM, 2001

³⁴ Martí, M. Carmen, 2003

⁷ Bonifaz, A, 2008

la especie: blanco o verde azulado (*Aspergillus fumigatus*), verde amarillento (*Aspergillus flavus*), negro (*Aspergillus niger*), marrón (*Aspergillus terreus*). Esta coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales”⁴⁹.

Reverso: “no presenta pigmento, o blanquecino”⁷

Imagen 1. Macromorfología

Aspergillus spp., PDA, 20°C, 3 días de crecimiento



Fuente: Rivadeneira D. 2001

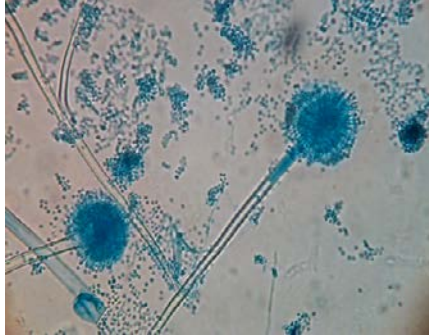
2.5.4.1.2 Micromorfología:

“El tipo de micelio es nutritivo o vegetativo, macrosifonado (2-4µm), septado y hialino; Reproducción anamórfica: a base de microconidios redondos o elípticos, de 2-5 µm de diámetro; estructuras especializadas: la cabeza aspergilar mide de 100 – 200 µm, está compuesta por conidióforos largos (100-250 µm), vesícula redonda (50-100 µm), en donde nacen alrededor de un ángulo de casi 360 °C, 2 series de esterigmas (fiálides), la primera de gran tamaño, mientras que la segunda tiende a ser pequeña. Fase teleomórfica: no ha sido reportada”⁷.

⁴⁹ Val, D., 2004

⁷ Bonifaz, A, 2008

Imagen 2. Micromorfología *Aspergillus spp.*, 40 x



Fuente: Rivadeneira D. 2011

2.5.4.1.3 Enfermedades:

“La mayoría de las personas frecuentemente están expuestas al *Aspergillus spp.*, las infecciones causadas por el hongo rara vez ocurren en personas con un sistema inmunitario normal”⁷.

Existen varias formas de aspergilosis:

- “Aspergilosis pulmonar de tipo broncopulmonar alérgica: es una reacción alérgica al hongo que generalmente se desarrolla en personas que ya tuvieron problemas pulmonares, como asma o fibrosis quística.
- Aspergiloma: es un tumor (bola fúngica) que se desarrolla en un área de enfermedad pulmonar o cicatrización pulmonar previas, como una tuberculosis o un absceso pulmonar.
- Aspergilosis pulmonar de tipo invasivo: es una infección grave con neumonía que se puede diseminar a otras partes del cuerpo. La infección ocurre casi exclusivamente en personas con sistemas inmunitarios debilitados debido al cáncer, SIDA, leucemia, trasplante de órganos, quimioterapia u otras afecciones o

⁷ Bonifaz, A, 2008

medicamentos que reducen el número de glóbulos blancos normales o debilitan el sistema inmunitario”¹⁸.

“La incidencia de aspergillosis invasora por *Aspergillus spp*, se sitúa aproximadamente en el 0,7% en receptores de trasplante renal, 1,3% en páncreas, 1,7% en hígado, 6,2% cardiaco y 8,4% en el pulmonar. La mortalidades superior al 75% en los casos de enfermedad pulmonar invasora y se aproxima al 100% en los enfermos con enfermedad diseminada y afectación del sistema nervioso central”³⁸.

2.5.4.2 *Cladosporium spp.*:

2.5.4.2.1 Características macroscópicas de la colonia:

En medios como el PDA y el Sabouraud

Anverso: “Las colonias alcanzan un diámetro de 2 a 4,5 cm en 7 días a 25°C, la textura y forma puede ser plana, seca, o aterciopelada, el color es verde oscuro; con algunos surcos”⁶**Reverso:** “Presenta pigmento negro difuso al medio”⁷.

Imagen 3. Macromorfología

Cladosporium spp., PDA, 20°C, 4 días de crecimiento



Fuente: Rivadeneira D. 2011

⁷ Bonifaz, A, 2008

¹⁸ Dugdale, D, 2011

³⁸ Montejo, M, 2002

2.5.4.2.2 Micromorfología

“Tipo de micelio: macrosifonado de aproximadamente 2 a 4 μm de diámetro, septado y oscuro (café-verdoso); modalidad de micelio: algunas cepas forman cuerpos nodulares. Reproducción anamórfica: por microconidios dispuestas en *hormodendrum* corto (2 y 3 unidades), estructuras especializadas: conidióforo corto; fase teleomórfica: algunas especies presentan ascosporas”⁷.

Imagen 4. Micromorfología *Cladosporium spp.*, 100 x



Fuente: Arias, E, 2008

2.5.4.2.3 Enfermedades

“Este es el hongo con más frecuencia en el aire, y uno de los hongos alergénicos respiratorios más importantes y se le ha implicado en casos de asma y fiebre.

Este hongo se asocia a los casos de rinitis en los que los síntomas no parecen coincidir con la cantidad de polen de gramíneas.

No es agente infeccioso importante, pero en climas cálidos, puede producir infecciones cutáneas, subcutáneas y queratitis. Estas infecciones tienen un desarrollo lento y su tratamiento incluye exéresis quirúrgica de los tejidos afectados en combinación con el empleo de antotéricina B”⁴³.

⁷ Bonifaz, A, 2008

⁴³ Persoon, 2002

2.5.4.3 *Penicillium spp.*:

2.5.4.3.1 Características macroscópicas de la colonia:

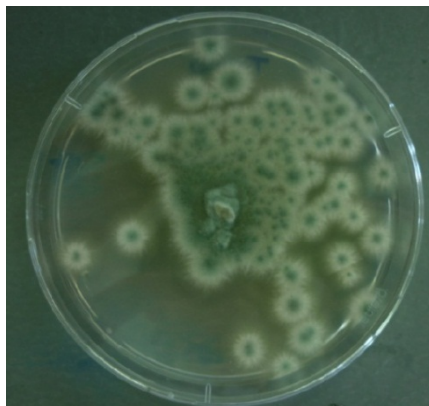
En medios como el PDA y Sabouraud

Anverso: “Alcanzan un diámetro de 1,6 cm en 7 días, el color es verde, con un halo blanquecino en la periferia la forma y el aspecto es plana, polvosa, aterciopelada”⁷ .

Reverso: “La mayoría de cepas no presentan pigmentos; algunas especies como *Penicillium notatum* da color café ocre.”⁷

Imagen 5. Macromorfología

Penicillium spp., PDA, 20°C, 5 días de crecimiento



Fuente: Rivadeneira D. 2011

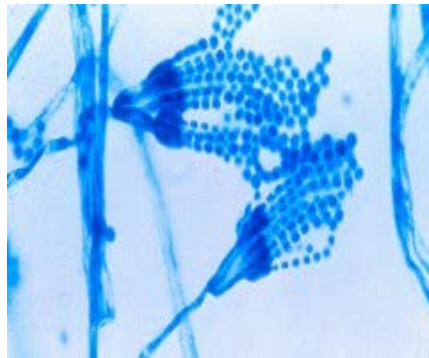
2.5.4.3.2 Micromorfología

“Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico. Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres

⁷ Bonifaz, A, 2008

micrómetros. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 µm y la parte terminal no supera los 3 µm de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies”¹¹.

Imagen 6. Micromorfología *Penicillium spp.*, 100 x



Fuente: Salfelder, 2000

2.5.4.3.3 Enfermedades

“En general, las especies de *Penicillium* son de baja patogenicidad y la infección generalmente se ha visto en individuos inmunocomprometidos. Casos aislados se ha informado, sin clara supresión inmunológica. La presentación clínica de la enfermedad causada por *Penicillium* es diversa, y se sabe que causan la patología a través de la infección directa, reacción de hipersensibilidad, y la fibrosis pulmonar”⁵.

2.5.4.4 *Alternaria*:

2.5.4.4.1 Características macroscópicas de la colonia:

En medios como PDA y Sabouraud

¹¹ Carrillo L., 2001

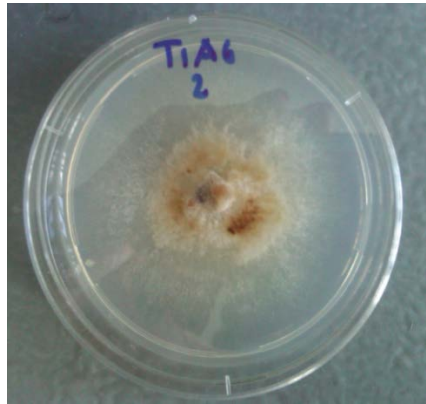
⁵ Barcus, A, et al, 2005

Anverso: “Las colonias son de tamaño similar entre 56-63mm de diámetro en una semana a 27°C, el color es negro con tonalidades café-oscuro, la forma y aspecto es plana, aterciopelada, seca y en ocasiones lo cubre un velo velloso blanco.”⁷

Reverso: “Es oscuro en el centro, rodeado de un anillo anaranjado pálido.”⁷

Imagen 7. Macromorfología

Alternaria alternata, PDA, 27°C, 7 días de crecimiento



Fuente: Rivadeneira D. 2011

2.5.4.4.2 Micromorfología

“Los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote. *Alternaria alternata* produce cadenas de 10 o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos.

La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales. La figura 5 muestra conidios de *Alternaria alternata* (Ellis 1971) con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos”¹¹.

⁷ Bonifáz, 2008

¹¹ Carrillo L., 2001

Imagen 8. Micromorfología *Alternaria alternata*, 100 x



Fuente: Leonor Carrillo

2.5.4.4.3 Enfermedades

“Puede provocar lesiones cutáneas y subcutáneas después de traumatismos en personas con inmunosupresión. También es causa de endoftalmitis postquirúrgica y de onicomycosis. Se han observado infecciones invasoras sistémicas en pacientes con sida. En China se ha sugerido una asociación entre el ácido tenuazónico y el cáncer esofágico que también ha sido implicado en enfermedades hemáticas endémicas, como el onyalai, en África. Las lesiones cutáneas curan espontáneamente con la mejora o la resolución de los factores subyacentes del enfermo. El tratamiento de las infecciones invasoras graves es más complicado porque se suman las enfermedades severas subyacentes del enfermo con la variable sensibilidad a los antifúngicos de *Alternaria*. El tratamiento se basa en la administración intravenosa de concentraciones elevadas de anfotericina B desoxicolato durante varias semanas.”²⁷

2.5.4.5 *Rhizopus spp.*:

2.5.4.5.1 Características macroscópicas de la colonia:

En medios PDA y Sabouraud

Anverso: “Colonias de crecimiento rápido que cubren prácticamente toda la superficie de la placa en tres días a 25 °C, el aspecto es consistente, con denso micelio aéreo,

²⁷ Keissler, F., 2002

algodonosas, el color en un principio es blanco, después gris oscuro, el micelio rojizo, grisáceo o marrón.

Se reconoce fácilmente por sus espolones hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios negros y lustrosos”⁷

Reverso: “Incoloro, no presenta exudación”⁷

Imagen 9. Macromorfología

Rhizopus spp., PDA, 25°C, 3 días de crecimiento



Fuente: Rivadeneira, D. 2011

2.5.4.5.2 Micromorfología:

“Las especies de *Rhizopus spp.* producen esporas asexuales y sexuales. Los esporangiosporos asexuales se producen dentro de una estructura aguzada, el esporangium. El esporangio es soportado por una gran columela, y el esporangióforo asoma entre rizoides distintivos. Zigosporos negros se producen después de dos fusiones compatibles de micelios durante la reproducción sexual.

Esporangios esféricos negros de hasta 275 µm de diámetro con columela. Esporangiosporas negras de 8 a 15 µm. Abundantes rizoides y zigosporas esféricas de pared gruesa, desnuda de hasta 200 µm de diámetro. Clamidosporas ausentes.”⁴⁷

⁷ Bonifaz, A, 2008

⁴⁷ Solis, M., 2007

Imagen 10. Micromorfología

Rhizopus spp., 100x



Fuente: Arias, E, 2008

2.5.4.5.3 Enfermedades

“Algunas especies de *Rhizopus spp.* son agentes oportunistas de zigomicosis humana. Pueden causar serias y con frecuencia fatales infecciones en humanos y en animales debido a su rápido crecimiento a relativamente altas temperaturas. Algunas especies son patógenos vegetales. Las esporas de estos hongos no son abundantes en el aire libre, aunque su frecuencia aumenta en lugares donde hay humedad y se acumula vegetación muerta. La exposición a concentraciones elevadas de esporangiosporas de *Rhizopus spp.* Se ha descrito como causa de alveolitis alérgica extrínseca conocida como pulmón de serrador.”⁴⁷

Se hace necesario “la identificación no solo morfológica sino también molecular y una forma de identificar estas especies es por medio de la técnica de ADN recombinante como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La identificación por PCR ha sido el método de selección más utilizado por su rapidez, reproducibilidad y potencial para la identificación de hongos así como para la de otros microorganismos”⁵¹.

⁴⁷Solis, M., 2007

⁵¹Zurizadai, C, 2006

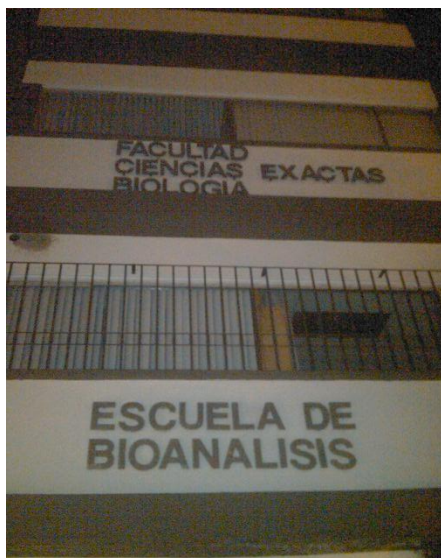
CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Localización del estudio

El estudio fue realizado en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en los ambientes del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales, en áreas de la Planta Baja de la Escuela de Bioanálisis y en el Edificio de Microbiología. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio N°2 de docencia de la Carrera de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Imagen 11. Edificio de Ciencias Exactas y Naturales - Exterior



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Imagen 12. Edificio Microbiología - Exterior



Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.2. Determinación de las características de lugares de muestreo

Para la determinación de los lugares a muestrear, se recorrió la Escuela de Bioanálisis, donde se aplicó una Matriz de Recolección de Datos (ANEXO 2). Dicha matriz ayudó a determinar el tipo de lugar, según se detalla a continuación. La mayoría de ellos fueron laboratorios y oficinas:

- Oficina
- Auditorio
- Archivo
- Bodega
- Laboratorio
- Baño
- Cafetería
- Cuarto de Lavado

La matriz de recolección de datos permitió determinar las características ambientales entre las de interés estuvieron las siguientes:

- Ventilación
- Iluminación
- Presencia de cortinas
- Presencia de alfombras
- Paredes húmedas
- Techos húmedos

La matriz preliminar nos permitió conocer los lugares propicios para el muestreo y también logramos determinar datos valiosos para en lo posterior establecer una comparación con el recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

3.3 Ambientes Muestreados

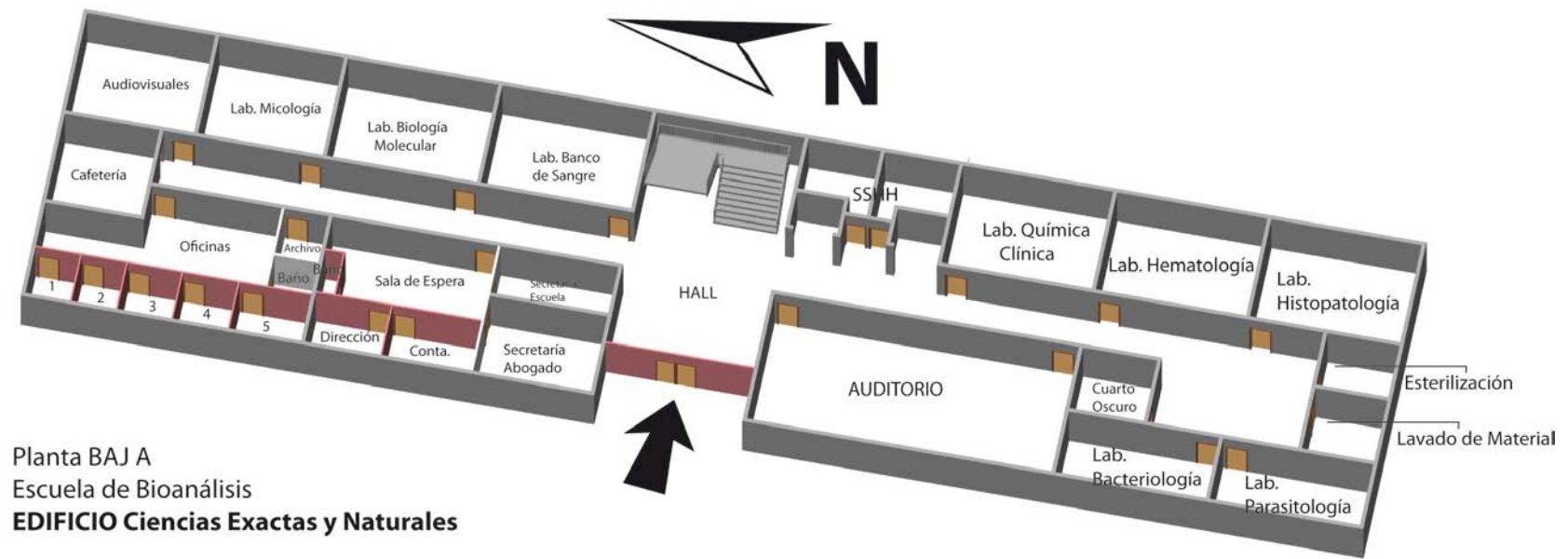
Los lugares muestreados (Imagen 13, 14, 15, 16) fueron en total 31, detallados en la Tabla 3. El orden en que se muestreó cada ambiente dependió de la disponibilidad de las personas que laboran en estos lugares, porque al momento de muestrear con el equipo el lugar debía estar vacío.

Tabla 3. Espacios Físicos Estudiados

Edificio de Ciencias Exactas y Naturales: Escuela de Bioanálisis– Planta Baja		Edificio de Microbiología – DiSerLab		
Corredor Norte-Sur	Corredor Sur-Norte	Subsuelo	Piso 1	Piso 2
Lab. Hematología	Secretaría	Cuarto de lavado	DiSerLab. Recepción	Lab. Docencia Microbiología #1
Lab. Histopatología	Baño		DiSerLab Lab. Clínica # 1	Lab. Docencia Microbiología #2
Lavado y preparación de materiales	Oficina Contabilidad		DiSerLab Lab. Clínica # 2	Oficina de profesores #1
Lab. Urianálisis y Parasitología	Secretaría Jurídica		DiSerLab Lab. Microbiología Clínica	Oficina de profesores #2
Lab. Bacteriología	Cafetería			Oficina de profesores #3
Lab Química Clínica	Oficina de profesores #1			
Auditorio	Oficina de profesores #2			
	Oficina de profesores #4			
	Oficina de profesores #5			
	Archivo			
	Dirección			
	Oficina de profesores #3			
	Lab. Banco de Sangre			
	Lab. Micología			

Fuente: Rivadeneira D. 2011

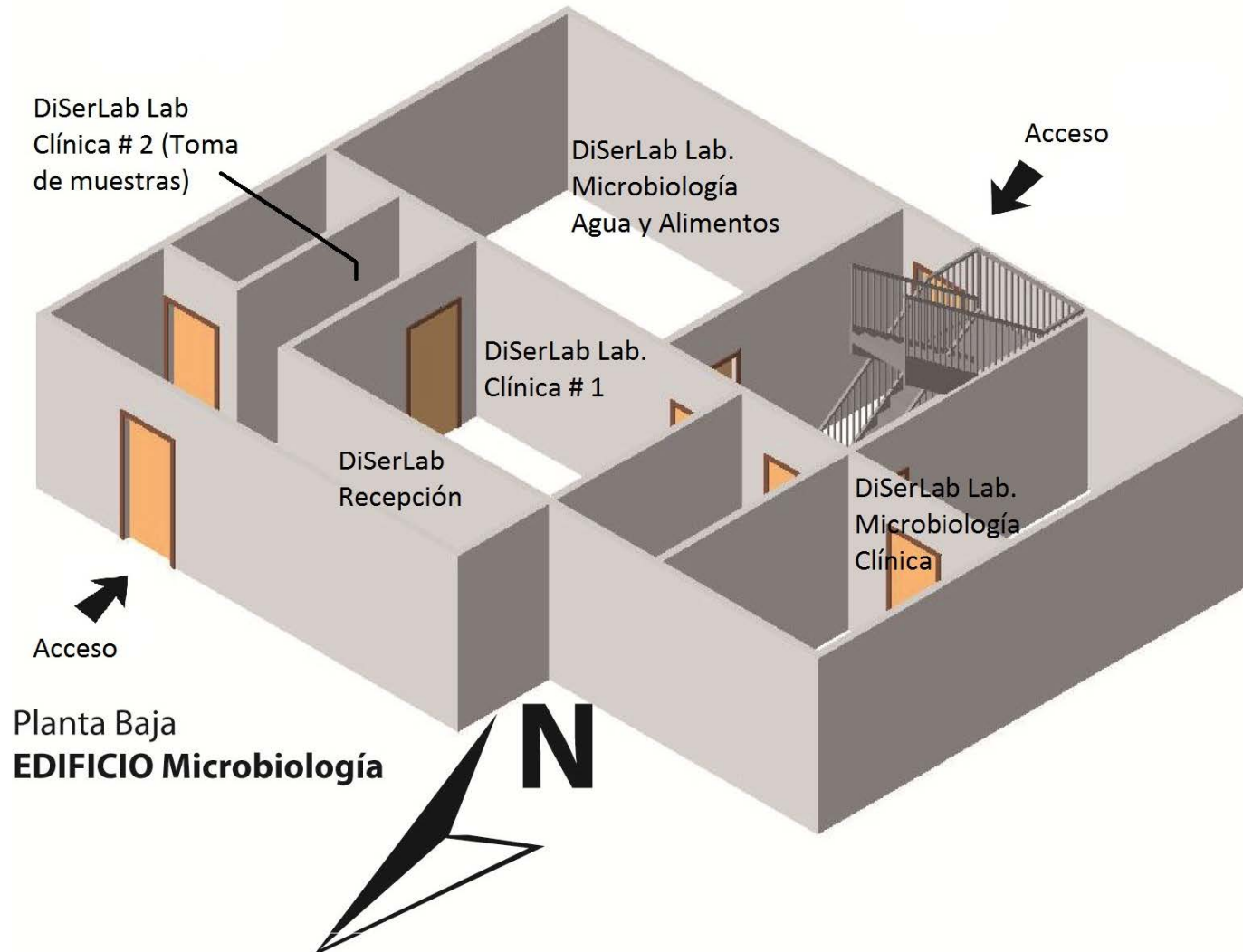
Imagen 13. Plano de la Planta Baja del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis



Planta BAJ A
Escuela de Bioanálisis
EDIFICIO Ciencias Exactas y Naturales

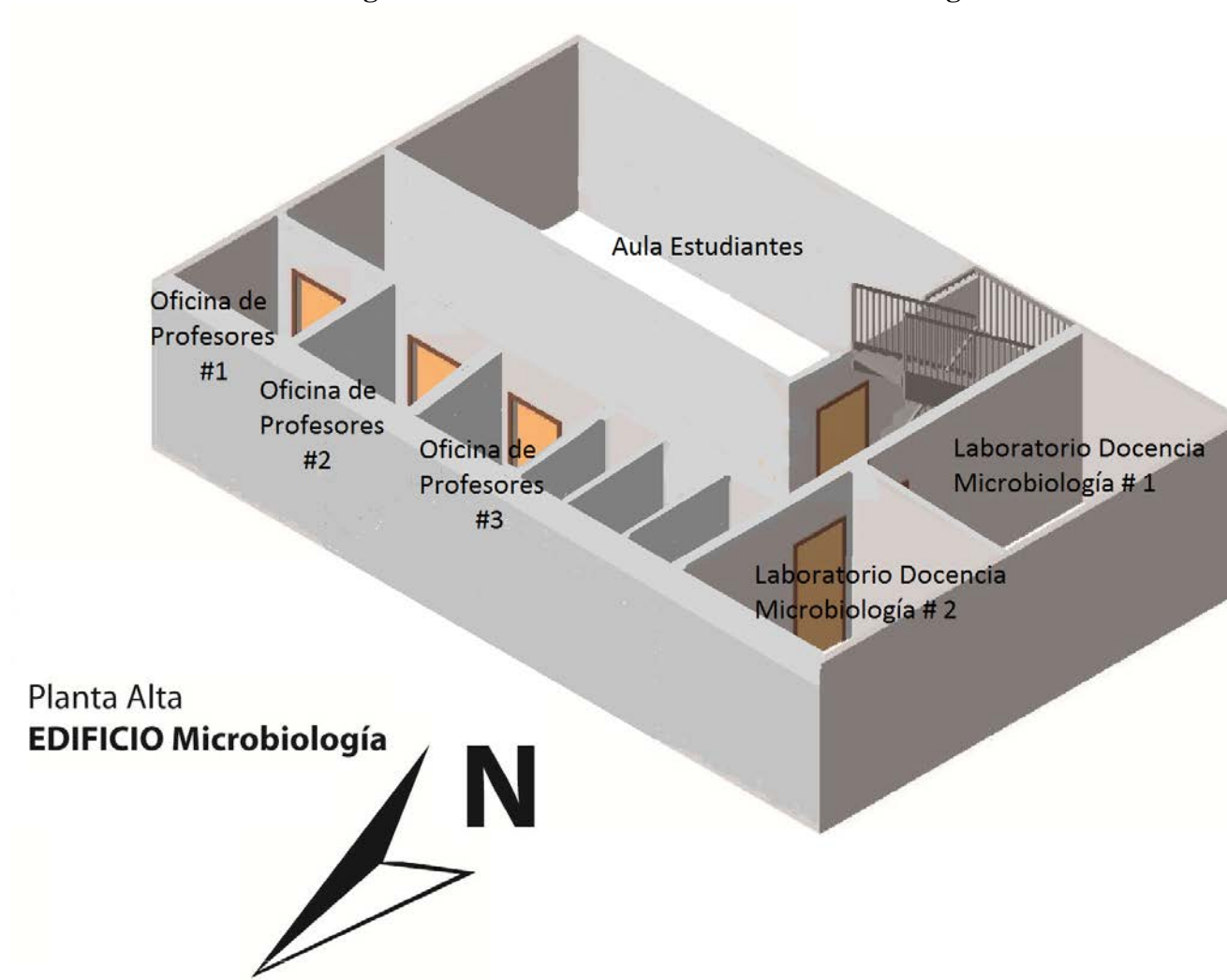
Fuente: Sánchez, D. 2012

Imagen 14. Planta Baja del Edificio de Microbiología



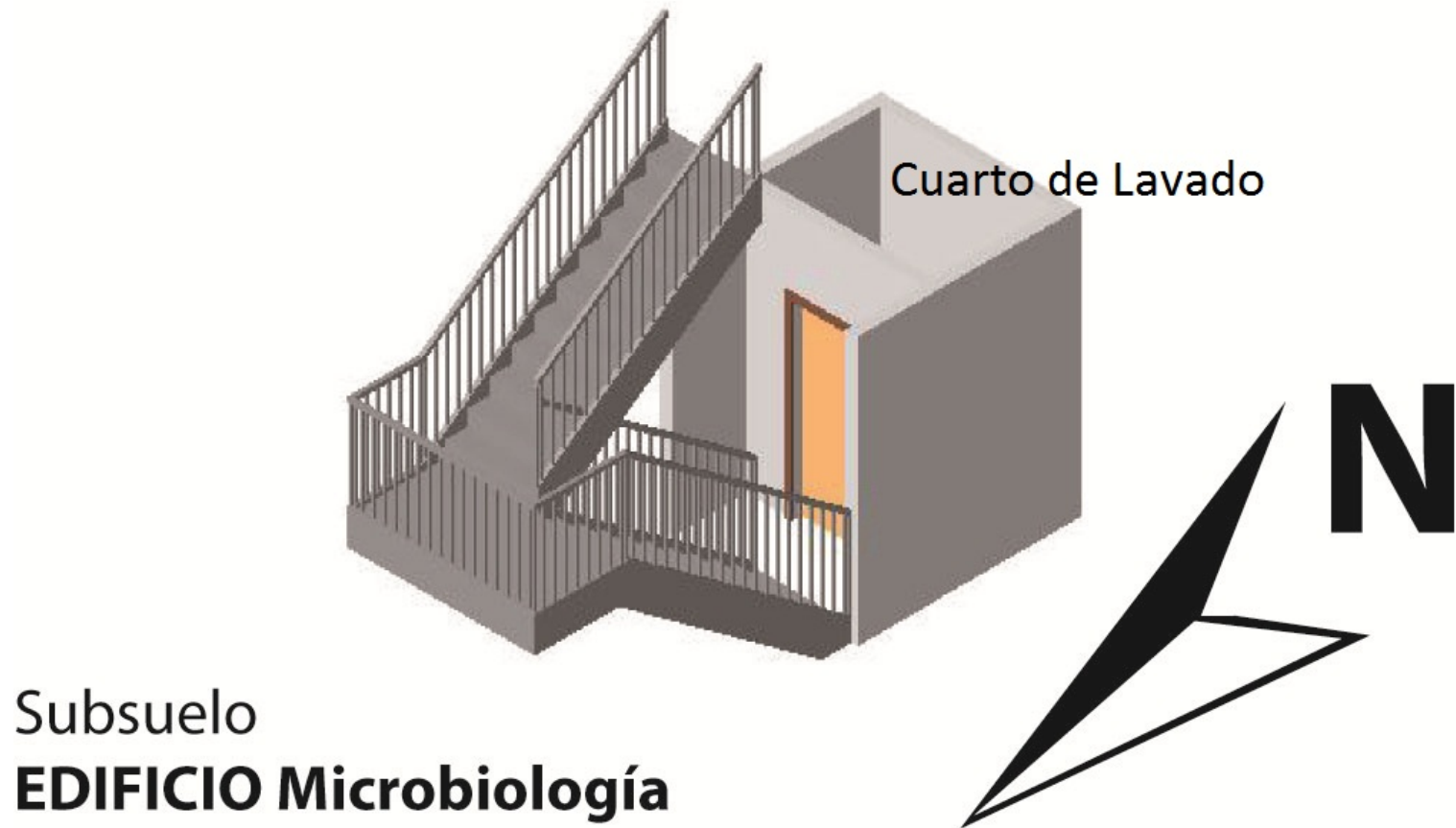
Fuente: Sánchez, D. 2012

Imagen 15. Planta Alta del Edificio de Microbiología



Fuente: Sánchez, D. 2012

Imagen 16. Plano Subsuelo del Edificio de Microbiología



Fuente: Sánchez D. 2012

3.3.1 Cronograma de muestreo

Tomando en cuenta los lugares aptos para el muestreo, se elaboró un cronograma de actividades que facilitó el trabajo y la organización del mismo.

A continuación se detalla el cronograma de muestreo en la Tabla 4, donde se indican los lugares muestreados por facultades con la respectiva codificación y fecha de toma de muestra.

Tabla 4. Cronograma de Muestreo

EDIFICIO	ESPACIOS FÍSICOS MUESTRADOS	NÚMERO DE MUESTRAS	CODIFICACIÓN	FECHA DE MUESTREO
EDIFICIO DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES: ESCUELA DE BIOANÁLISIS	Lab. Hematología	1	EBA 01. 1	07/07/2011
		2	EBA 01. 2	
		3	EBA 01. 3	
	Lab. Histopatología	1	EBA 02. 1	07/07/2011
		2	EBA 02. 2	
		3	EBA 02. 3	
	Lavado y preparación de materiales	1	EBA 03	07/07/2011
	Secretaría	1	EBA 04	08/07/2011
	Baño	1	EBA 05	08/07/2011
	Oficina Contabilidad	1	EBA 06	08/07/2011
Secretaría Jurídica	1	EBA 07	11/07/2011	
Cafetería	1	EBA 08	11/07/2011	
Oficina de profesores #1	1	EBA 09	11/07/2011	
Oficina de profesores #2	1	EBA 10	12/07/2011	

EDIFICIO	ESPACIOS FÍSICOS MUESTRADOS	NÚMERO DE MUESTRAS	CODIFICACIÓN	FECHA DE MUESTREO
EDIFICIO DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES: ESCUELA DE BIOANÁLISIS	Oficina de profesores #4	1	EBA 11	14/07/2011
	Oficina de profesores #5	1	EBA 12	14/07/2011
	Archivo #05	1	EBA 13	26/07/2011
	Dirección	1	EBA 14	26/07/2011
	Oficina #3	1	EBA 15	27/07/2011
	Lab. Urianálisis y Parasitología	1	EBA 16. 1	03/08/2011
		2	EBA 16. 2	
		3	EBA 16. 3	
	Lab. Bacteriología	1	EBA 17. 1	03/08/2011
		2	EBA 17. 2	
		3	EBA 17. 3	
	Lab. Banco de Sangre	1	EBA 18. 1	11/08/2011
		2	EBA 18. 2	
		3	EBA 18. 3	
	Lab. Micología	1	EBA 19. 1	11/08/2011
		2	EBA 19. 2	
		3	EBA 19. 3	
	Lab Química Clínica	1	EBA 20. 1	12/08/2011
		2	EBA 20. 2	
		3	EBA 20. 3	
	Auditorio	1	EBA 21. 1	12/08/2011
2		EBA 21. 2		
3		EBA 21. 3		
4		EBA 21. 4		
5		EBA 21. 5		
EDIFICIO DE MICROBIOLOGÍA	Lab. #1	1	EMA 22. 1	18/08/2011
		2	EMA 22. 2	
		3	EMA 22. 3	
	Lab. #2	1	EMA 23. 1	18/08/2011
		2	EMA 23. 2	
		3	EMA 23. 3	
	DiserLab. Recepción	1	EMA 24	19/08/2011

EDIFICIO	ESPACIOS FÍSICOS MUESTRADOS	NÚMERO DE MUESTRAS	CODIFICACIÓN	FECHA DE MUESTREO
EDIFICIO DE MICROBIOLOGÍA		1	EMA 25. 1	
	Lab. Clínica #1	2	EMA 25. 2	19/08/2011
		3	EMA 25. 3	
		1	EMA 26. 1	
	Lab. Clínica #2	2	EMA 26. 2	22/08/2011
		3	EMA 26. 3	
		1	EMA 27. 1	
	Lab. Microbiología Clínica	2	EMA 27. 2	22/08/2011
		3	EMA 27. 3	
	Oficina de profesores #1	1	EMA 28	23/08/2011
	Oficina profesores #2	1	EMA 29	23/08/2011
	Oficina profesores #3	1	EMA 30	23/08/2011
	Cuarto de lavado	1	EMA 31	24/08/2011

Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.3.2 Cálculo del Número de Muestras por Ambiente

Para determinar el número de muestras por espacio físico se utilizó la serie geométrica de Fibonacci que tiene como factor serial el número de oro de Pitágoras. “Este número se lo obtiene de la serie:

1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, 34, 55, 89, 144, 233, 377, 610, 987, 1597, 2584, 4181, 6765, 10946, 17711

$17711/10946 = 1,618033985 \rightarrow \# \text{ de oro de Pitágoras}^{12}$

La serie inicia con el número 1, lo cual significa que se tomó 1 muestra si el local mide de 8m^2 a 21m^2 ; según aumente la superficie (m^2) aumentará también el número de muestras, de acuerdo a la serie geométrica, como se detalla en la siguiente Tabla 5.

¹² Castellanos, 2007

Tabla 5. Número de muestreos según el área del local en m²

# de muestras	Área del local en (m ²)
1	de 8 a 21
3	de 21 a 55
5	de 55 a 144
8	de 144 a 377
13	de 377 a 987

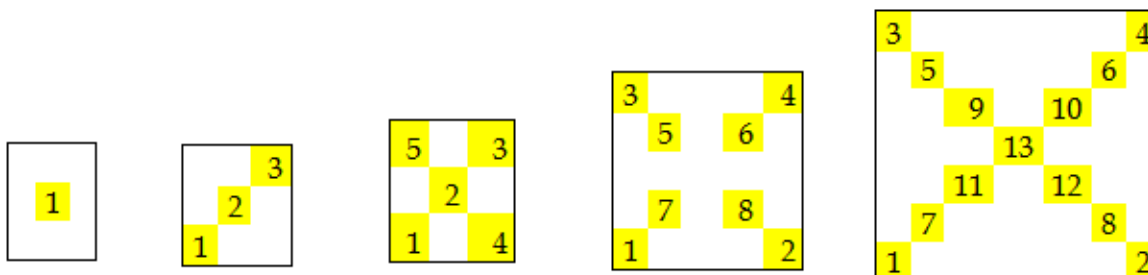
Fuente: Comunicación personal Ing. Danilo Arroyo

3.3.3 Modelo para muestrear un espacio físico

Las muestras que se tomaron por cada espacio físico se las trabajó en dos medios de cultivo diferentes: Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Rosa de Bengala (RB), El recuento de Unidades Formadoras de Colonias por muestra se realizó en los medios de cultivo respectivos.

“El muestreo de los ambientes se realizó siguiendo un sentido diagonal (Imagen 17). En el cual se tomó 1 muestra de aire en la mitad del espacio físico. Cuando se tomaron 3, 5, 8, etc., muestras se realizó el muestreo de aire en las esquinas del espacio físico, puesto que en estos lugares las corrientes de aire son nulas.”¹³.

Imagen 17. Modelo para muestrear un espacio físico



Fuente: Comunicación personal Ing. Danilo Arroyo, 2011

¹³ Comunicación personal Ing. Danilo Arroyo, 2011

3.3.4 Medición de los metros cuadrados

Para esto se utilizó un metro inalámbrico, con puntero láser de color rojo de la marca Craftsman el cual dispara el rayo láser dando con exactitud el número de metros cuadrados (área) de cada espacio físico, para establecer el número de muestras que se tomaron durante el estudio. (Imagen 18)

Imagen 18. Metro Inalámbrico



Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.3.5 Recolección y Transporte de las muestras.

Las muestras ambientales de los 31 espacios físicos se tomaron con el equipo MAS 100, mismas que se recolectaron entre el 7 de julio y el 24 de agosto del 2011 y fueron transportadas en una maleta especial de muestreo. No se necesitó cadena de frío, pues el estudio se realizó dentro del mismo Campus universitario (Imagen 19, 20).

Imagen 19. Maleta para el muestreo



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Imagen 20. Maletín del Equipo MAS 100



Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.3.6 Identificación de muestras

Todas las muestras fueron identificadas con la siguiente información:

- Nombre del edificio
- Número de Área Muestreada
- Fecha de muestreo

Para la rotulación se utilizó un sistema de códigos con el siguiente orden:

- Iniciales del nombre del edificio
- Iniciales del área
- Número del área muestreada

Así por ejemplo: EBA 01 (Escuela de Bioanálisis – Área – muestra número 01) y EMA 22 (Edificio de Microbiología – Área- muestra número 22).

3.4 Procesamiento de las muestras

“Para la captación de aire se aplicó un procedimiento volumétrico por impacto activo; ya que este procedimiento permite expresar los resultados cuantitativamente por unidad de volumen y estos datos son relacionables con la unidad de volumen respirada por la persona susceptible de padecer reacciones alérgicas”³³.

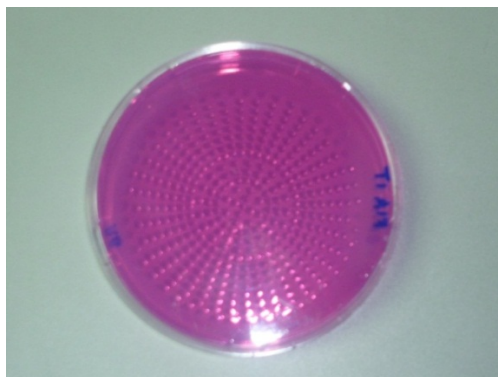
³³ Marti, M. Carmen, 1990

3.4.1 Equipo MAS (Microbiological Air Sampler) 100

“Los Sistemas de Control Microbiológico del Aire, son instrumentos de alto rendimiento basados en el principio del muestreador de aire Andersen. El aire se aspira a través de una tapa perforada y es impulsado sobre una superficie de medios de cultivo de un disco Petri estándar de 90 mm (Imagen 21). Los microorganismos impactan sobre los medios de cultivo y las colonias se cuentan después de un periodo de incubación.

El sistema mide el flujo de aire y regula el volumen aspirado en un valor constante de 100 litros/minuto.”³⁶. “El equipo fue programado para captar 250 lt de aire en 2 minutos 30 segundos tomando en cuenta que se utilizó la mitad de la capacidad del equipo que es de 450 lt de aire en 5 minutos.”¹⁴. Una vez programado con este tiempo y volumen de aire, se encendió el equipo y se procedió a tomar la muestra (Imagen 22).

Imagen 21. Muestra de aire en el medio Rosa de Bengala



Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.4.1.1 Beneficios

- “Mediciones precisas y reproducibles
- La más alta eficiencia de recogida
- Compensación de flujo de aire integrada

¹⁴ Comunicación personal de Granda Elena

³⁶ Merck KGaA, 2011

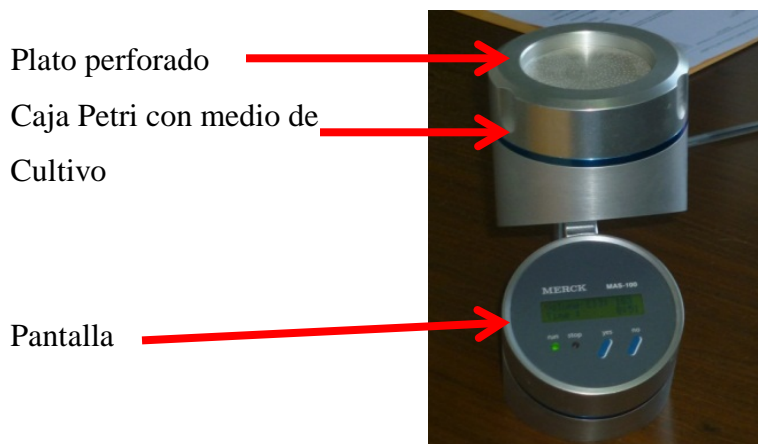
- Independencia gracias al uso de discos Petri de 90 mm o placas de contacto de 60 mm estándar
- Calibración totalmente automática
- Hardware y software validados para HACCP
- Documentos de validación conformes con ISO 14698³⁶

3.4.1.2 Funcionamiento

“El equipo dispone de un conector de control de tiempo, dividido en unidades que van de 1 a 15, representando cada una de ellas un tiempo de 20 segundos. El volumen de aire muestreado en cada unidad es equivalente a 30 litros, lo que implica que se pueden realizar muestreos de una duración de 20 segundos hasta 5 minutos y con unos volúmenes de 30 a 450 litros de aire. Por otra parte el tiempo y volumen que se muestreen dependen de la contaminación ambiental que se sospeche³¹.

Con el medio de cultivo listo, se colocó la caja Petri dentro del equipo, se destapó la caja y se lo tapó el equipo. Luego se programó el tiempo y el volumen a aspirarse y finalizado esto se tapó y se sacó la caja con la muestra de aire tomada.

Imagen 22. Partes del equipo MAS 100



Fuente: Rivadeneira D. 2011

³⁶ Merk KGaA, 2011

³¹ Martí, M. Carmen, 1990

3.4.2 Medios de cultivo

Se evaluaron dos medios de cultivo el PDA y el Rosa de Bengala (Imagen 23). El Agar Papa Dextrosa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras, “al igual que para el aislamiento de *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos; así también para los parásitos de plantas y los hongos saprofitos los cuales crecen y esporulan muy bien en este medio.”¹⁰

“Este medio de cultivo es utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados leche y productos cosméticos. Puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano y es recomendado para realizar el recuento colonial. De la misma manera, puede ser empleado para promover el crecimiento de hongos y levaduras de importancia clínica. La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos.”³⁵

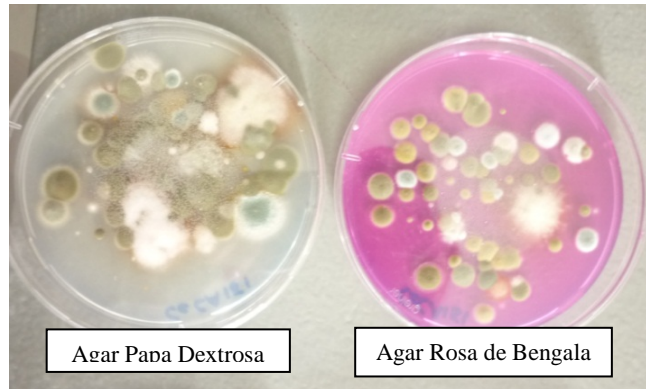
El Agar Rosa de Bengala “reduce el crecimiento de bacterias y disminuye la dispersión de las colonias de hongos. Esta reducción en el tamaño de las colonias de hongos facilita su recuento y además permite el crecimiento de otras especies con desarrollo más lento. El Rosa de Bengala es absorbido por las colonias de levaduras y mohos facilitando así su reconocimiento y enumeración. La presencia del cloranfenicol aumenta la selectividad del medio, no permitiendo el crecimiento de bacterias. La Glucosa y la Peptona son las bases nutritivas del medio.”¹⁵ (ANEXO 5). Esta razón nos motivo a utilizar este medio.

¹⁰ Cañedo, 2004

³⁵ MCD LAB, 1995

¹⁵ Cultimed, 2000

**Imagen 23. Diferencias de crecimiento en
PDA y RB**

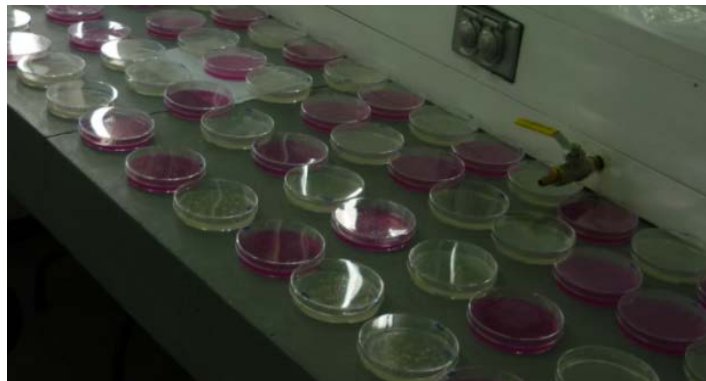


Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.4.3 Incubación

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente entre 15°C y 20°C, durante 5 días en el Laboratorio 2 de Microbiología y al quinto día se procedió al contaje de las colonias. Antes de colocar las cajas en los mesones se realizó la desinfección de los mismos con Hipoclorito al 1%. (Imagen 24.)

Imagen 24. Incubación de muestras de aire en PDA y RB



Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.4.4 Método para el recuento de hongos en el aire

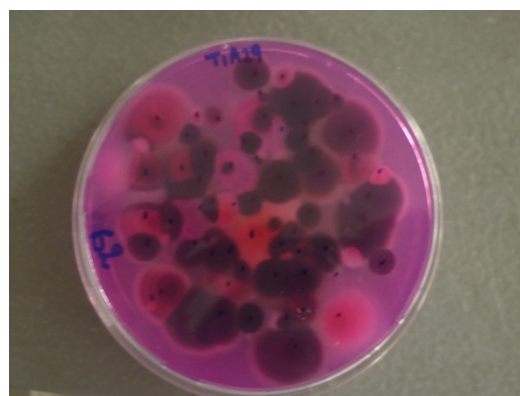
Se realizó un contaje interno de UFC por placa (Imagen 25 y 26), para posteriormente expresar el resultado en UFC/m³ (unidades formadoras de colonia por metro cúbico), donde se tuvo en cuenta las constantes de volumen de aire aspirado y tiempo de aspiración. Los datos obtenidos del contaje se registraron por cada medio de cultivo utilizado para realizar un análisis comparativo entre ellos.

**Imagen 25. Recuento en PDA
(Anverso)**



Fuente: Rivadeneira D. 2011

**Imagen 26. Recuento en RB
(Reverso)**



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Para el recuento de hongos en el aire, se utilizó un método basado en la norma NTP 299 (ANEXO 3) que permitió obtener el número exacto de UFC/m³ de los hongos presentes en cada ambiente. Posteriormente se identificó el género de estos microorganismos.

Se aplicó la Fórmula 1.

Fórmula 1

$$n^{\circ} UFC/m^3 = \frac{NC \times 1000}{VA \times NU}$$

Fuente: NTP 299

Siendo:

NC: Número de colonias por placa

NU: Número de unidades de tiempo empleadas en el muestreo

VA: Volumen de aire en litros

“Los niveles de hasta 100 UFC/m³ de hongos saprofitos pueden ser considerados normales, siempre y cuando se trate de ambientes en los que no exista población con deficiencias o enfermedades del sistema inmunitario”²⁴

“En lugares que, por el tipo de trabajo que se realiza, no precisan ser estériles, se recomienda llevar a cabo el recuento de hongos y bacterias en aire cuando exista una sintomatología en la población expuesta que sugiera una posible contaminación biológica causada por estos microorganismos”³¹.

3.4.5 Métodos para la identificación microscópica de hongos

3.4.5.1 Técnica de la cinta adhesiva

“Es un método que puede considerarse como el más simple, económico y adecuado para la identificación de hongos, recomendable para laboratorios microbiológicos de cualquier nivel.

En el estudio se identificaron los géneros de los hongos mediante la técnica de cinta adhesiva.

El procedimiento se lleva a cabo como sigue:

1. Apoyar el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de una colonia.
2. Colocar la cinta bien extendida sobre una gota de azul de lactofenol o azul de anilina colocada, a su vez, sobre un portaobjetos.
3. Observar al microscopio para conocer la forma y ordenamiento característico de las esporas.”³³

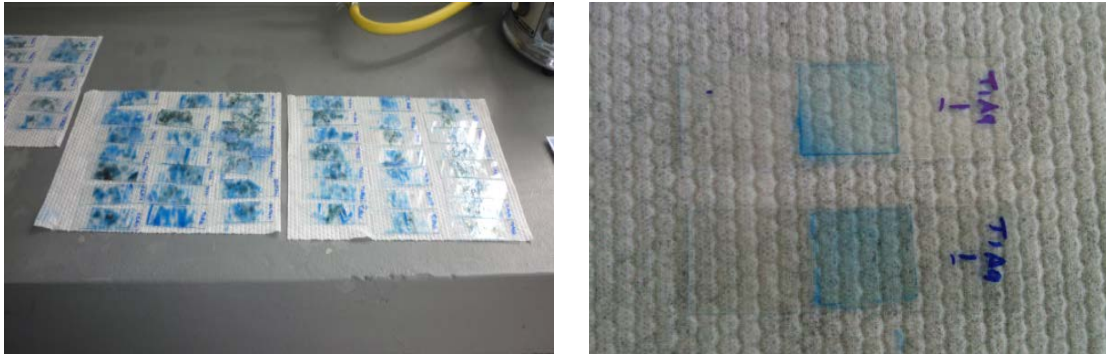
²⁴ Hernández, Ana, 1995

³¹ Martí, M. Carmen, 1990

³³ Martí, M. Carmen, et al, 2003

La preparación de la cinta adhesiva transparente (Imagen 27) permite observar al microscopio como se desarrolla el microorganismo en el cultivo. Generalmente las esporas y las estructuras fúngicas se mantienen intactas y la identificación se realiza con facilidad.

Imagen 27. Placas con la Técnica de la Cinta Scotch



Fuente: Rivadeneira D. 2011

3.4.5.2 Microcultivo

“Este método permite la observación microscópica del hongo mientras se desarrolla directamente debajo del cubreobjetos, de forma que las características microscópicas se distinguen con facilidad, las estructuras se mantienen intactas y puede observarse un gran número de áreas representativas.

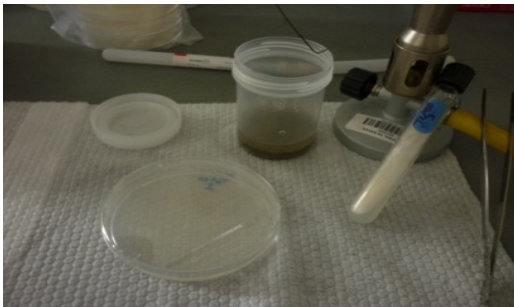
No deben realizarse cultivos en portaobjetos de hongos de crecimiento lento que pueden ser patógenos dimorfos, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Sporothrix schenckii*.³⁴. Se realizó la técnica de microcultivo solo en algunas muestras las cuales fueron difíciles de identificar. (Imagen 28 y 29)

El procedimiento fue el siguiente:

³⁴ Martí, M. Carmen, 1997.

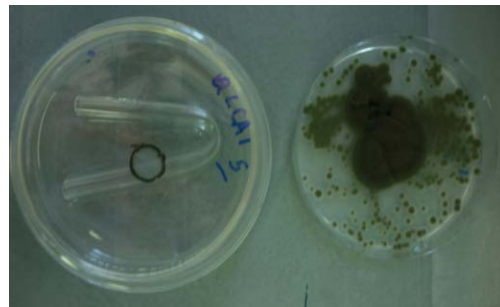
- “Cortar cuadros de PDA de una caja Petri de 1 cm de lado y 3 mm de espesor con un bisturí estéril y caliente.
- Colocar el cuadro de PDA en un portaobjetos que está sobre una varilla de vidrio doblada en forma de “V” en una caja de Petri (previamente esterilizada).
- Tomar con el asa él inóculo del moho previamente seleccionado.
- Inocular por picadura en cada uno de los lados del cuadro de agar.
- Colocar sobre el agar un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se adhiera al medio.
- Adicionar 5 ml de glicerol al 10% en la caja Petri.
- Incubar la caja a 28° C durante 48 h.
- Realizar observaciones mínimo cada 12 h para identificar los cuerpos fructíferos.
- Si el moho ya se ha desarrollado y se puede identificar, retirar el glicerol con una pipeta Pasteur.
- Desprender con cuidado el cubreobjetos que se encuentra sobre el cuadro de agar y colocarlo sobre un portaobjetos que contenga una gota de azul de algodón, sellar la preparación con barniz de uñas transparente.
- Desprender con cuidado el cuadro de agar y colocar una gota de azul de algodón, colocar un cubreobjetos sobre el colorante y sellar la preparación. Observar las preparaciones a 10X y 40X”⁴².

Imagen 28. Materiales para el Microcultivo



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Imagen 29. Microcultivo *Cladosporium spp.*, PDA



Fuente: Rivadeneira D. 2011

⁴² Pérez, R. 2006

3.4.6 Equipo de bioseguridad

“Las barreras primarias son barreras físicas o equipos de protección personal entre el trabajador del laboratorio y el patógeno”⁴⁰, en este estudio se utilizó el siguiente equipo de bioseguridad: gafas y mascarilla para la protección de ojos; guantes para protección de manos; mandil, gorro y zapatones para protección de vestuario. (Imagen 30) “Los laboratoristas usan estos tipos de equipos de seguridad para protegerse directamente al trabajar con microorganismos.”⁴⁰

“Las barreras secundarias son aspectos estructurales del laboratorio que hacen que el ambiente de trabajo sea más seguro frente al riesgo de infección. Estas incluyen lavamanos, áreas de contención especiales para trabajar directamente con los organismos, y patrones especiales de ventilación diseñados para prevenir la contaminación de otras salas y otros trabajadores en el edificio.”⁴⁰

Imagen 30. Equipo de bioseguridad personal



Fuente: Rivadeneira D. 2011

⁴⁰ Nelson A., 2008

3.4.7 Materiales, Reactivos y Desinfectantes

- Materiales

- Cajas Petri de vidrio 100x15mm
- Asa de nicrone con mango
- Pinzas anatómicas
- Agujas de disección
- Cajas portaplacas
- Mechero
- Fósforos
- Tubo de vidrio en V
- Cajas Petri desechables
- Frascos Schott 250ml
- Probetas de vidrio 100ml
- Fundas ziploc
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Mechero
- Marcadores
- Fósforos
- Toallas de papel absorbente
- Cinta adhesiva

3.4.7.1 Reactivos:

- Esmalte
- Azul de Lactofenol

3.4.7.2 Desinfectantes

- Hipoclorito al 1%
- Alcohol al 70%

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis pertenecen al proyecto de investigación H13233 con el título: “*Evaluación del efecto de la presencia de hongos en la calidad del aire como causa del síndrome del edificio enfermo en las edificaciones antiguas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador*”, realizado entre abril y noviembre del 2011.

Los resultados del análisis se detallan de acuerdo a la metodología que se utilizó en el mismo. Estos fueron procesados en la hoja de cálculo de Excel del paquete informático Microsoft Office Professional Plus 2010 utilizando el Sistema Operativo Windows 7, así como también a través del programa Estadístico SPSS del mismo sistema operativo.

4.1 Condiciones físicas y ambientales de los lugares muestreados:




La Matriz de Recolección de Datos (ANEXO 2) permitió conocer la presencia de factores como: falta de ventilación, iluminación insuficiente, humedad en paredes y techos, material inmobiliario (alfombras y cortinas) y plantas en los ambientes internos. Estas características fueron determinantes, pues se observó un aumento del nivel de contaminación del ambiente interno en los lugares escogidos.


Aunque no se analizó una sintomatología específica llámese rinitis o problemas alérgicos, en los dos edificios analizados sí se encontraron quejas acerca de los olores en las áreas de las oficinas de la Escuela de Bioanálisis que pertenece al Edificio de Ciencias Exactas y Naturales.



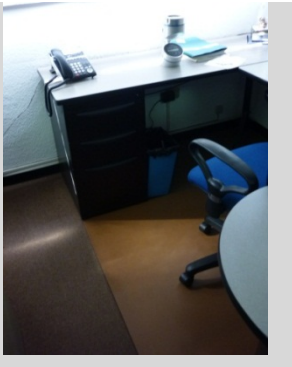

Dentro del campus universitario, específicamente dentro de los edificios existe una norma de prohibición en cuanto al humo de cigarrillo, esto es una medida preventiva para evitar la contaminación del aire interior y así mantener una calidad de aire mejor.





A continuación se evidencian los sitios muestreados con sus características físicas como las mencionadas anteriormente (Tabla 6).

Tabla 6. Características físicas de los ambientes

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
<p align="center">CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (CCEENN)</p>	<p align="center">Lab. Hematología</p>		<p>En este laboratorio, se evidenció la presencia de cortinas, con entradas de luz solar suficientes, pero aún se precisa de luz artificial; falta ventilación y no se observa señales de humedad.</p>
	<p align="center">Lab. Histopatología</p>		<p>En este lugar se observaron señales de humedad en paredes, las entradas de aire exterior y luz solar eran pocas, y se precisa de luz artificial, la temperatura ambiental es baja.</p>
	<p align="center">Lavado y preparación de materiales</p>		<p>Este sitio es oscuro, tiene escasa ventilación, pocas entradas de aire exterior y luz solar, temperatura ambiental baja, señales de humedad en paredes, y hay gran cantidad de materiales y reactivos de laboratorio.</p>

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (CCEENN)	Secretaría de la Escuela de Bioanálisis		<p>En este lugar se percibe un olor particular, evidenciando que el aire se condensa de tal forma que se hace viciado; hay ambientadores para contrarrestar este olor. Presencia de plantas.</p>
	Baño		<p>Este lugar no tiene entradas de aire externo, es oscuro, tiene un extractor de olores, aunque el olor es poco agradable y la temperatura es baja.</p>
	Oficina de contabilidad		<p>En este ambiente no hubo señales de humedad ni alfombras, existen entradas de aire externo y luz solar.</p>
	Oficina Secretario Abogado		<p>En este lugar se observa la presencia de plantas, hay buen ingreso de luz solar, pero no hay ventilación ni señales de humedad.</p>




EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (CCEENN)	Cafetería Escuela		<p>En este lugar se pudo observar que no se encuentra humedad evidente, sin embargo la temperatura ambiental es baja, y hay una entrada de aire externo.</p>
	Oficina de profesores No.1		<p>En este lugar se encontró la presencia de alfombras, una sola entrada de aire y señales de humedad.</p>
	Oficina de profesores No.2		<p>En este lugar igual se pudo evidenciar que hay alfombras, hay una sola entrada de aire y de luz solar y la temperatura es baja.</p>
	Oficina de profesores No.4		<p>En este lugar se observó alfombra, una sola entrada de luz solar y de aire; la temperatura ambiental baja y no hay señales de humedad.</p>

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (CCEENN)	Oficina de profesores No.5		<p>En este lugar se observa la presencia de alfombras, una entrada de luz solar y de aire, la temperatura de ambiente baja, y no hubo señales de humedad.</p>
	Archivo		<p>Este lugar es frío, hay gran cantidad de material bibliográfico, no hay entradas de luz solar ni de aire, porque es cerrado totalmente y no hay señales de humedad en paredes.</p>
	Dirección Escuela de Bioanálisis		<p>En este lugar no se encontró problema alguno, ya que su material inmobiliario fue remodelado.</p>
	Oficina de Profesores No.3		<p>Este lugar tiene alfombra, hay una sola entrada de aire pequeña, se observan persianas, y en el ambiente se percibe olor a humo de cigarrillo, además la temperatura del ambiente es relativamente baja y no hay señales de humedad.</p>

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (CCEENN)	Lab. Urianálisis y Parasitología		En este lugar no hay señales de humedad, las fuentes de luz naturales son suficientes al igual que las del aire, la temperatura ambiental es adecuada.
	Lab. Bacteriología		En este sitio no se encontró señales de humedad, las fuentes de luz solar y de aire son suficientes, y la temperatura ambiental es adecuada.
	Lab. Banco de Sangre		En este ambiente no hay señales de humedad, la temperatura ambiental es un poco baja, y las fuentes de luz y de aire son suficientes para dicho lugar.
	Lab. Micología		En este lugar se manejan ciertos microorganismos como los hongos, y sumado a esto las fuentes de luz solar y de aire son escasas. Así también, la temperatura del sitio es baja y no hay señales de humedad.

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (CCEENN)	Lab Química Clínica		<p>Este lugar es relativamente frío, la ventilación es moderada y las entradas de luz solar son suficientes, aunque se precisa de luz artificial.</p>
	Auditorio Escuela de Bioanálisis		<p>En este lugar se observa que tiene suficientes entradas de luz solar y de aire, hay presencia de alfombras, no existen señales de humedad y la temperatura ambiental es moderada.</p>
	Lab. Biología Molecular		<p>Este lugar tiene entradas de luz solar, no se evidencian señales de humedad, la temperatura es moderada, y las entradas de aire son moderadas.</p>
MICROBIOLOÍA	Lab. Microbiología 1		<p>En este laboratorio se evidenció la presencia de suficientes fuentes de luz solar y de aire; la temperatura ambiental fue óptima, no hay señales de humedad.</p>

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
MICROBIOLOGÍA	Lab. Microbiología 2		En este laboratorio la temperatura ambiental es elevada, porque hay suficientes entradas de luz solar y la ventilación es adecuada, y no se encontró señales de humedad en el sitio.
	DiserLab. Recepción		En este ambiente la iluminación y la ventilación son adecuadas, la temperatura ambiental es buena y no hay señales humedad.
	DiSerLab Lab. Clínico		En este lugar la iluminación y la ventilación son buenas; no se encontró señales de humedad y la temperatura ambiental es adecuada.
	DiSerLab Lab. Microbiología Clínica		En este sitio se observó que la iluminación es adecuada al igual que la ventilación; no se observó señales de humedad, pero es importante el estudio de este ambiente porque se manejan microorganismos.

EDIFICIO	AMBIENTES	FOTOGRAFÍA	DESCRIPCIÓN
MICROBIOLOGÍA	Oficina de profesores Microbiología 1		Este lugar tiene una entrada de aire, se evidencia la presencia de alfombra y persianas; la temperatura es adecuada, y tiene una entrada de luz solar.
	Oficina de profesores Microbiología 2		Este ambiente tiene alfombras y persianas; una entrada de aire y de luz solar; la temperatura es adecuada y no hay señales de humedad.
	Oficina de profesores Microbiología 3		Este lugar es alfombrado, se observa persianas, una entrada de luz solar y de aire; hay material bibliográfico y no hay señales de humedad
	Cuarto de lavado de Materiales		Este sitio se encuentra en el subsuelo, hay señales de humedad, la temperatura ambiental es baja y la ventilación es moderada.

En la mayoría de ambientes analizados no hubo señales de humedad, sin embargo, “la humedad elevada y la temperatura son las condiciones que favorecen la contaminación microbiológica del aire en ambientes internos, aunque siempre es necesario un sustrato como madera, celulosa, etc., que proporcione al hongo los nutrientes necesarios”⁴⁶

A través de la visita a todos los lugares que se muestrearon se consiguió observar varios factores que predominan en los edificios analizados; la temperatura baja fue uno de los aspectos más frecuentes. “Una temperatura más baja es en general más crítica, pues influye en la producción de moho. Puede haber por tanto áreas localmente más frías que el resto, convirtiéndose éstas en puntos críticos”⁴⁶.

Se obtuvo un conteo ligeramente elevado de UFC/placa de hongos en las muestras que se obtuvieron de las esquinas de los ambientes muestreados, aunque no se manifestó en todos los casos este conteo; no obstante “el moho a menudo comienza en las esquinas, porque, entre otras razones, son lugares que, debido a la mínima circulación de aire, la condensación absorbida no puede secarse fácilmente.”⁴⁶

“El Síndrome del Edificio Enfermo se origina por los efectos nocivos para la salud producidos por los contaminantes del aire interior de los locales y varían desde una mínima incomodidad, hasta enfermedades respiratorias, cáncer y en los casos más extremos, muerte.”⁴⁵ La existencia de este síndrome no se pudo determinar ya que hacen falta más análisis de los factores que lo causan, pero hay que tener en cuenta el nivel de polución o contaminación producida por los hongos.

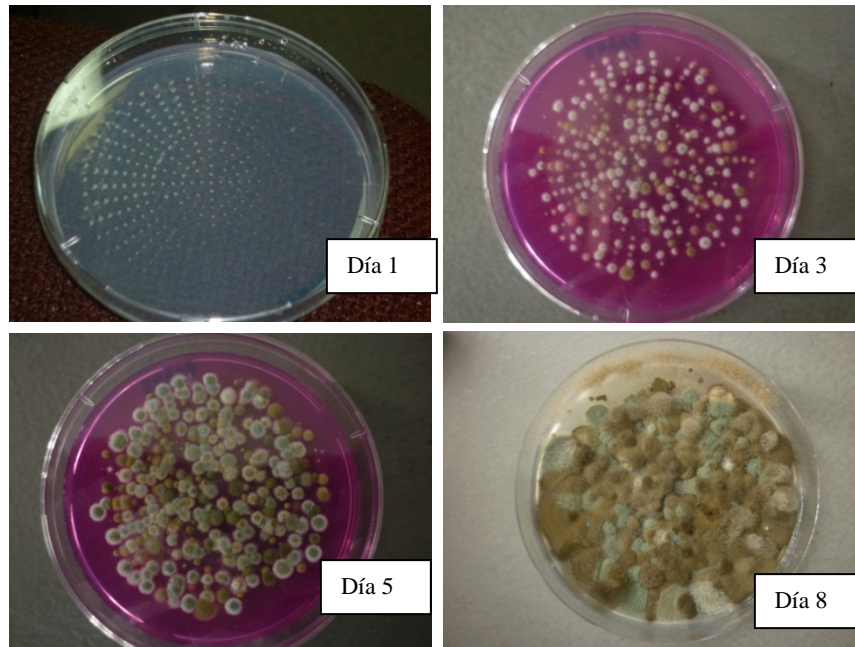
4.2 Crecimiento de hongos en las placas de Agar:

Como se observa en la Imagen 32, no existió crecimiento de hongos en las primeras 24 horas. Con el pasar de los días, el tamaño y el número de las colonias de hongos fue aumentando. La evolución de este crecimiento se demuestra a partir del día 1 hasta el día 8.

⁴⁶Regodón M. Inés, 2000

⁴⁵Quadri, N., 2009

Imagen 31. Evolución del crecimiento de hongos



Fuente: Rivadeneira D. 2011

4.3 Resultados del Recuento de UFC por placa.

El número de colonias de hongos y el promedio de las UFC en cada área definida se evidencian en los resultados de la Tabla 7. De acuerdo a las medidas en metros cuadrados de las áreas en estudio se determinó el número de muestras de aire que se tomaron por espacio físico. Se muestrearon 31 espacios físicos de los cuales se obtuvieron en total 59 muestras.

Se pudo apreciar que el Recuento de UFC de las muestras que fueron tomadas en las esquinas de cada espacio físico es mayor que las muestras que fueron tomadas en el centro de cada espacio físico, esto debido a que la circulación del aire en las esquinas es menor y las partículas que están suspendidas en el aire como polvo, polen, entre otros, se acumulan mayormente en los sitios inmóviles.

Tabla 7. Recuento Promedio UFC Por Placa

ÁREA DEFINIDA	LOCAL (m ²)	# DE MUESTRAS	CODIFICACIÓN	PROMEDIO (UFC)	
				PDA	RB
Laboratorio Hematología	45.65	1	EBA 01.1	242	240
		2	EBA 01.2		
		3	EBA 01.3		
Laboratorio Histopatología	45.68	1	EBA 02.1	253	248
		2	EBA 02.2		
		3	EBA 02.3		
Lavado y preparación de materiales	12.82	1	EBA 03	231	228
Secretaria	10.03	1	EBA 04	251	261
Baño	8.23	1	EBA 05	212	219
Oficina Contabilidad	8.76	1	EBA 06	238	240
Secretaria Jurídica	14.50	1	EBA 07	220	244
Cafetería	10.88	1	EBA 08	265	248
Oficina de profesores # 1	6.42	1	EBA 09	254	242
Oficina de profesores # 2	6.42	1	EBA 10	268	266
Oficina de profesores # 4	6.42	1	EBA 11	290	284
Oficina de profesores # 5	6.42	1	EBA 12	273	258
Archivo # 5	9.87	1	EBA 13	245	221
Dirección	17.95	1	EBA 14	250	253
Oficina de profesores # 3	6.42	1	EBA 15	282	267
Laboratorio Urianálisis y Parasitología	37.75	1	EBA 16.1	194	177
		2	EBA 16.2		
		3	EBA 16.3		
Laboratorio Bacteriología	37.12	1	EBA 17.1	198	188
		2	EBA 17.2		
		3	EBA 17.3		
Laboratorio Banco de Sangre	43.71	1	EBA 18.1	193	191
		2	EBA 18.2		
		3	EBA 18.3		
Laboratorio Micología	43.20	1	EBA 19.1	250	248
		2	EBA 19.2		
		3	EBA 19.3		
Laboratorio Química Clínica	43.40	1	EBA 20.1	198	188
		2	EBA 20.2		
		3	EBA 20.3		

ÁREA DEFINIDA	LOCAL (m ²)	# DE MUESTRAS	CODIFICACIÓN	PROMEDIO (UFC)	
Auditorio	102.25	1	EBA 21.1	166	190
		2	EBA 21.2		
		3	EBA 21.3		
		4	EBA 21.4		
		5	EBA 21.5		
Laboratorio de Biología Molecular	43.14	1	EBA 22.1	134	124
		2	EBA 22.2		
		3	EBA 22.3		
Laboratorio Docencia Microbiología # 1	37.77	1	EMA 23.1	192	186
		2	EMA 23.2		
		3	EMA 23.3		
Laboratorio Docencia Microbiología # 2	37.73	1	EMA 24.1	244	208
		2	EMA 24.2		
		3	EMA 24.3		
DISerLAB Recepción	10.18	1	EMA 25	178	165
Laboratorio de Clínica DISerLAB	46.19	1	EMA 26.1	168	170
		2	EMA 26.2		
		3	EMA 26.3		
Laboratorio de Microbiología Clínica	47.30	1	EMA 27.1	201	180
		2	EMA 27.2		
		3	EMA 27.3		
Oficina de Profesores # 1	6.42	1	EMA 28	181	177
Oficina de Profesores # 1	6.42	1	EMA 29	179	168
Oficina de Profesores # 1	6.42	1	EMA 30	165	134
Cuarto de lavado	6.42	1	EMA 31	153	121

m²: metros cuadrados

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Fuente: Rivadeneira D. 2011

4.4 Identificación de género:

Se identificaron los géneros de hongos por muestra y se realizó el cálculo de UFC por m³ (ANEXO 4), utilizando la Fórmula 1 descrita anteriormente. Con el dato de UFC por m³ se evidenció el nivel de contaminación por ambientes.

Los resultados que se obtuvieron permiten reportar que se encontraron 22 diferentes géneros dentro de los Edificios de Ciencias Exactas y Naturales y el Edificio de Microbiología. (Tabla 8 y Gráfico 1); siendo el género *Cladosporium spp.* el que se encontró con mayor frecuencia, seguido del *Penicillium spp.*, luego el *Aspergillus spp.*, *Helminthosporium spp.* y *Rhizopus spp.* de la totalidad de ambientes que fueron analizados.

Tabla 8. Géneros encontrados

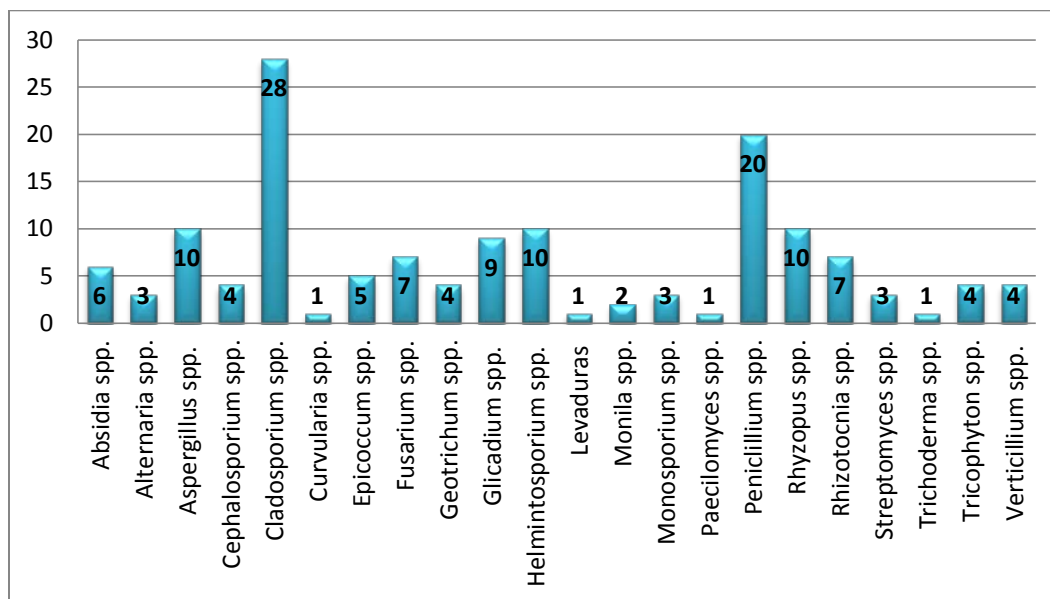
Género	Frecuencias de ambientes contaminados por Géneros	%
1 <i>Absidia spp.</i>	6 de 31	19,35
2 <i>Alternaria spp.</i>	3 de 31	9,67
3 <i>Aspergillus spp.</i>	10 de 31	32,25
4 <i>Cephalosporium spp.</i>	4 de 31	12,90
5 <i>Cladosporium spp.</i>	28 de 31	90,32
6 <i>Curvularia spp.</i>	1 de 31	3,23
7 <i>Epicoccum spp.</i>	5 de 31	16,13
8 <i>Fusarium spp.</i>	7 de 31	22,58
9 <i>Geotrichum spp.</i>	4 de 31	12,90
10 <i>Gliocladium spp.</i>	9 de 31	29,03
11 <i>Helminthosporium spp.</i>	10 de 31	32,25
12 <i>Levaduras</i>	1 de 31	3,23
13 <i>Monila spp.</i>	2 de 31	6,45
14 <i>Monosporium spp.</i>	3 de 31	9,67
15 <i>Paecilomyces spp.</i>	1 de 31	3,23
16 <i>Penicillium spp.</i>	20 de 31	64,52
17 <i>Rhizopus spp.</i>	10 de 31	32,25
18 <i>Rhizotocnia spp.</i>	7 de 31	22,58
19 <i>Streptomyces spp.</i>	3 de 31	9,67
20 <i>Trichoderma spp.</i>	1 de 31	3,23
21 <i>Trichophyton spp.</i>	4 de 31	12,90
22 <i>Verticillium spp.</i>	4 de 31	12,90

Fuente: Rivadeneira D. 2011

A pesar de que no se investigó la sintomatología relacionada con el Síndrome del Edificio Enfermo y la manera en que los géneros encontrados se relacionan con este Síndrome, es importante señalar que “ciertos géneros de hongos como *Mucor spp.*, y *Penicillium spp.*,

Curvularia spp., *Cladosporium spp.* y las formas levaduriformes como *Cándida spp.* y *Rhodotorula spp.*, además de géneros que contienen cepas productoras de micotoxinas y alérgenos como *Alternaria spp.* han originado problemas clínicos en humanos. Las esporas de estos hongos causan reacciones de hipersensibilidad inmediatas o retardadas, asma, sinusitis, alveolitis alérgica, entre otras.”⁴⁸

Gráfico 1. Géneros de hongos encontrados



Fuente: Rivadeneira D. 2011

4.5 Análisis estadístico del nivel de contaminación (UFC/m³)

Se realizó una prueba t-student respecto al nivel de contaminación observado en los medios de cultivo utilizados, donde se encontraron diferencias considerables y de los cuales el RB es más selectivo que el PDA (t=2,12; p=0,039); encontrándose que el PDA tuvo un promedio de UFC por m³ de 100,62, mientras que el medio RB fue de 97,56. (Tabla 9)

A partir de los resultados de este análisis, se estudiará los valores obtenidos del recuento en UFC/m³ por separado, es decir, en PDA y en RB.

⁴⁸ Tolosa D., 2006

Tabla 9. Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					↓ t	Gl	↓ Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 UFC/m3 PDA - UFC/m3 RB	3,060	11,106	1,446	,166	5,954	2,116	58	,039

Fuente: Sánchez, J. 2012

Conjuntamente se realizó la prueba de correlación de Pearson (Tabla 10), la cual dio una correlación muy alta entre los 2 medios ($r = 0,858$; $p = 0,000$). De tal manera que dio como resultado que el medio de cultivo PDA permitía el crecimiento de UFCs de hongos, mientras el medio RB también lo hacía.

Tabla 10. Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	↓ Sig.
Par 1 UFC/m3 PDA y UFC/m3 RB	59	,858	,000

Fuente: Sánchez, J. 2012

4.6 Contaminación entre los edificios y entre los ambientes analizados respecto a UFC/m³.

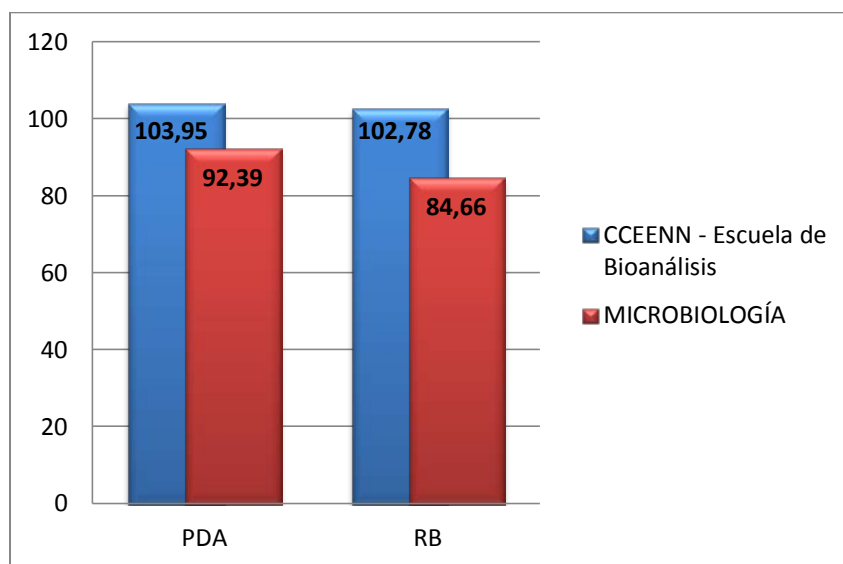
La investigación realizada dio como resultado que la media de contaminación (UFC/m³), tanto en PDA como en RB (Tabla 11), fue más alta en la Escuela de Bioanálisis que en el Edificio de Microbiología. (Gráfico 2)

Tabla 11. Diferencia de medias de las UFC/m³ en los dos medios de cultivo

		N	Media	Mínimo	Máximo
UFC/m ³ PDA	CCEENN – Escuela de Bioanálisis	42	103,95	58	139
	MICROBIOLOGÍA	17	92,39	66	120
	Total	59	100,62	58	139
UFC/m ³ RB	CCEENN – Escuela de Bioanálisis	42	102,78	54	136
	MICROBIOLOGÍA	17	84,66	58	142
	Total	59	97,56	54	142

Fuente: Rivadeneira D. 2011

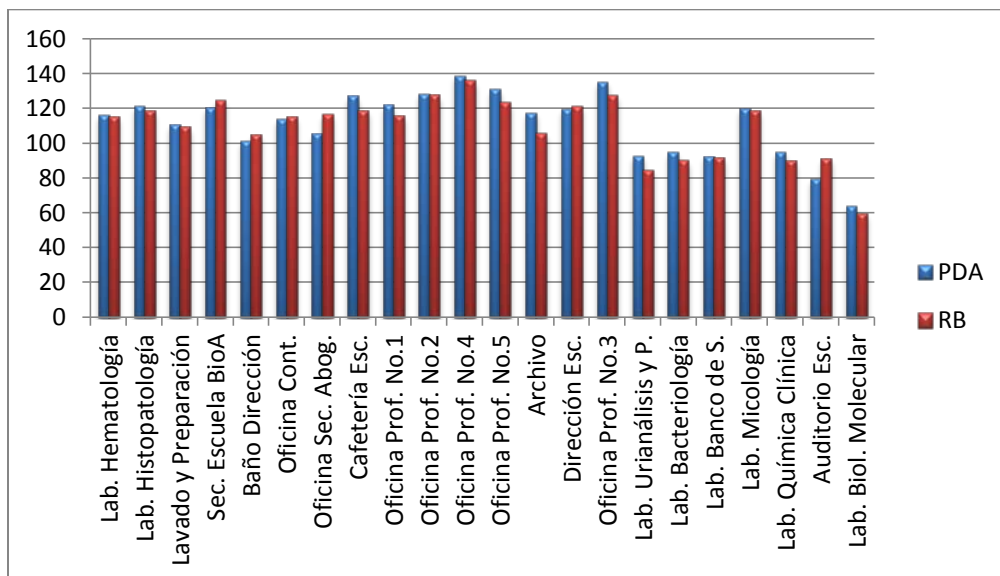
Gráfico 2. Diferencia de medias de las UFC/m³ en los dos medios de cultivo



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Por medio de este análisis se determinó que los ambientes más contaminados en el Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis, en cuanto a UFC/m³ de hongos son las Oficinas de Profesores No.4, 3, 5 y 2, siguiendo el orden de la más contaminada a la menos contaminada. Además la Cafetería y Secretaría están dentro de los ambientes más contaminados. (Gráfico 3)

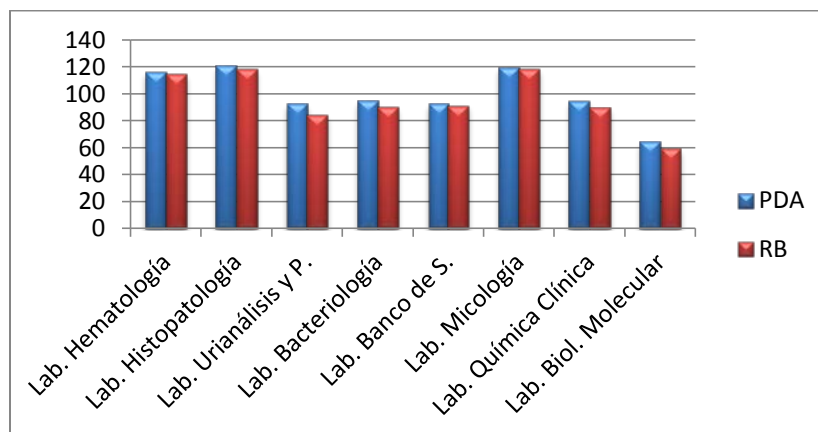
Gráfico 3. Nivel de contaminación UFC/m³ de hongos en ambientes del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis en PDA y RB



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Analizando los ambientes de los Laboratorios del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis (Gráfico 4), se puede definir que los Laboratorios de Histopatología y Micología son los ambientes que presentan mayor contaminación por UFC/m³ de hongos.

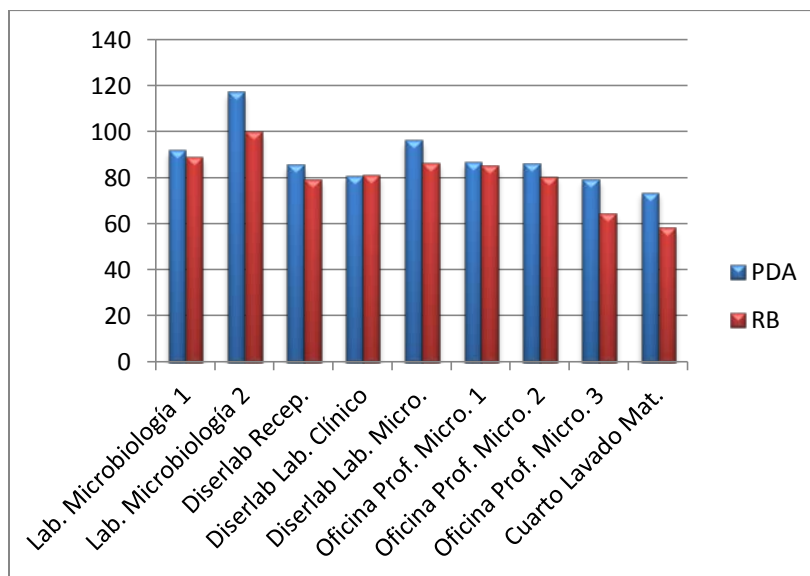
Gráfico 4. Nivel de contaminación (UFC/m³) en los Laboratorios del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis en PDA y RB



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Tomando en cuenta el análisis del Edificio de Microbiología se determinó que el Laboratorio de Microbiología 2 presenta el mayor recuento de UFC/m³ de hongos. (Gráfico 5).

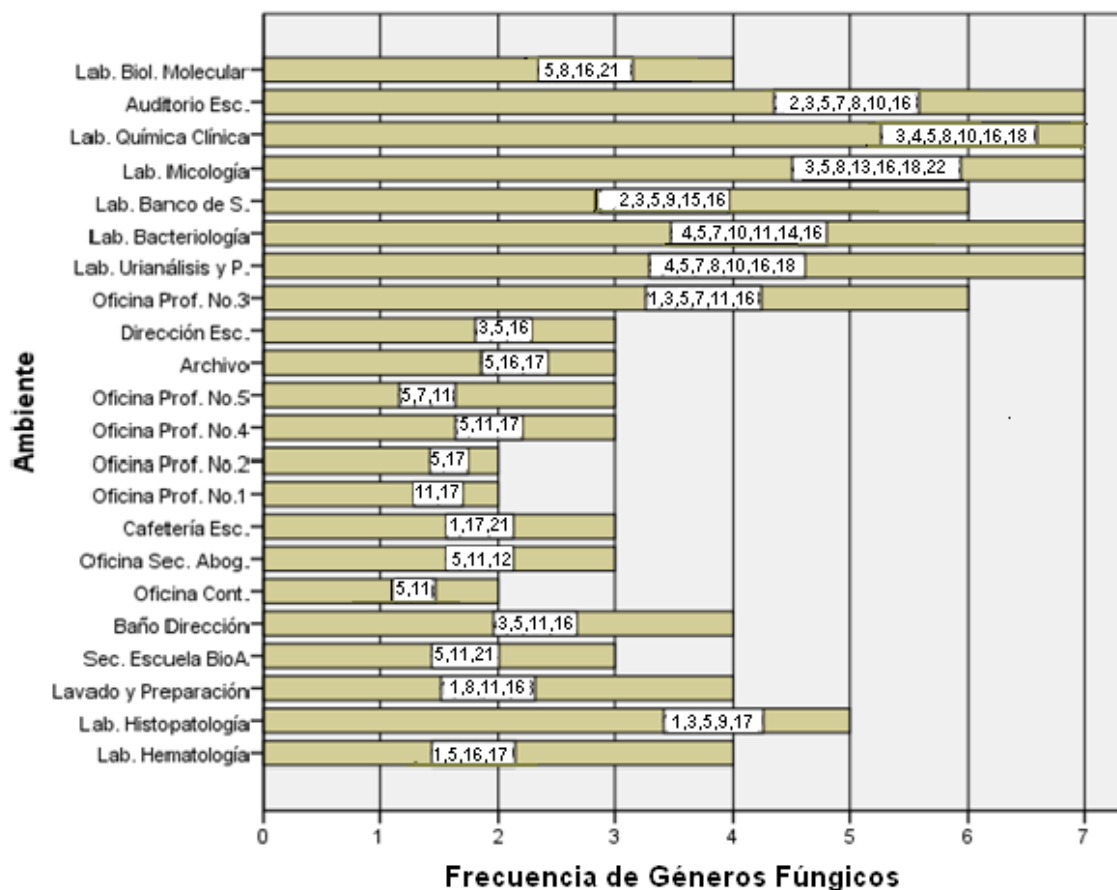
Gráfico 5. Nivel de contaminación (UFC/m³) en ambientes del Edificio de Microbiología en PDA y RB



Fuente: Rivadeneira D. 2011

La investigación permitió determinar que se encontraron 7 géneros diferentes de hongos en el Auditorio, Laboratorio de Química Clínica, Laboratorio de Micología, Laboratorio de Bacteriología, Laboratorio de Urianálisis y Parasitología, por lo tanto son estos son los ambientes con mayor diversidad de microorganismos en el Edificio analizado (Gráfico 6).

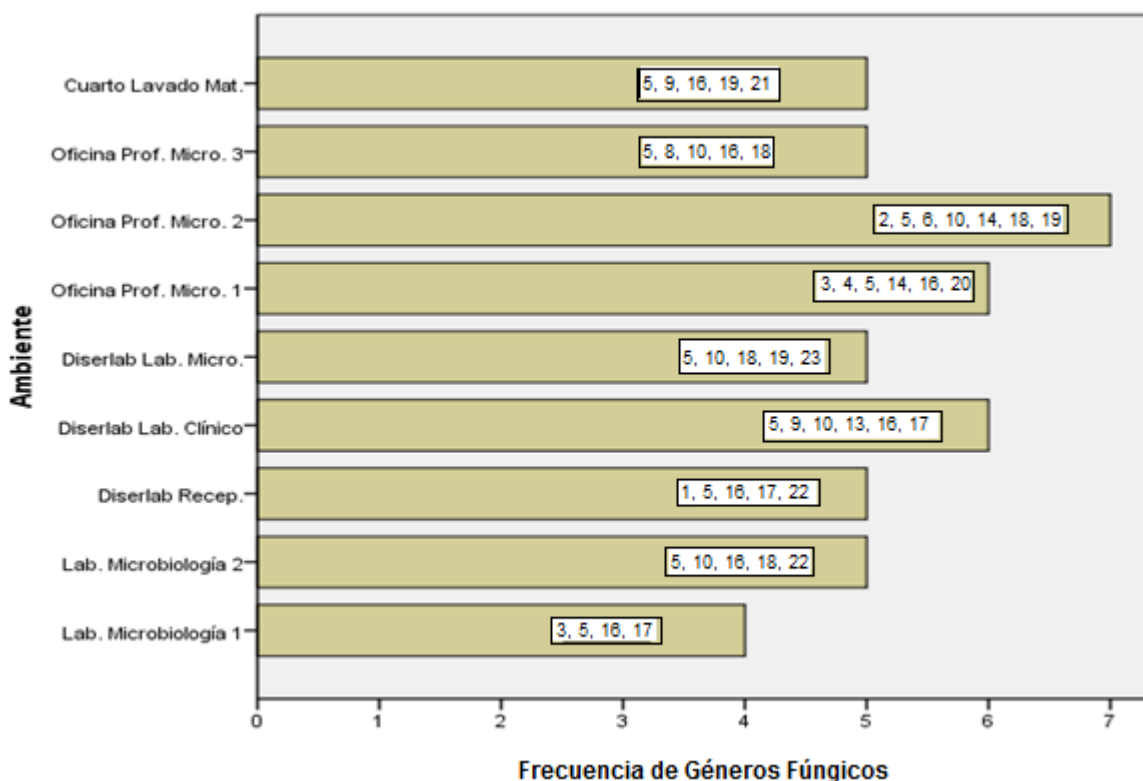
Gráfico 6. Frecuencia de Género de Hongos por ambiente en el Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Los resultados permitieron encontrar 7 diferentes géneros de hongos en la Oficina de Microbiología 2 y 6 diferentes géneros de hongos en la Oficina de Microbiología 1; ambientes que pertenecen al Edificio analizado (Gráfico 7)

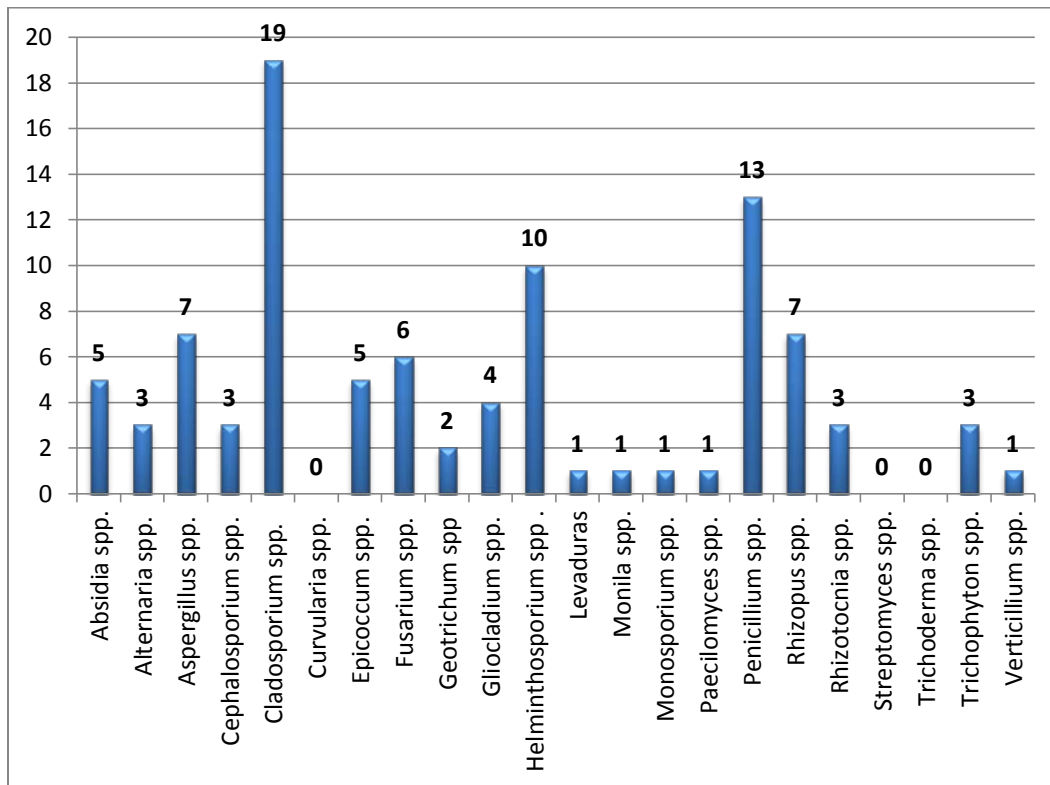
Gráfico 7. Frecuencia de Género de Hongos por ambiente en el Edificio de Microbiología



Fuente: Rivadeneira D. 2011

La frecuencia de *Cladosporium spp.* en el Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis fue en 19 de 22 ambientes en este edificio, seguido de *Penicillium spp.* fue en 13 de los 22 ambientes, *Helminthosporium spp.* que tuvo presencia en 10 de 22 ambientes, destacándose como los géneros más contaminantes en este edificio. (Gráfico 8)

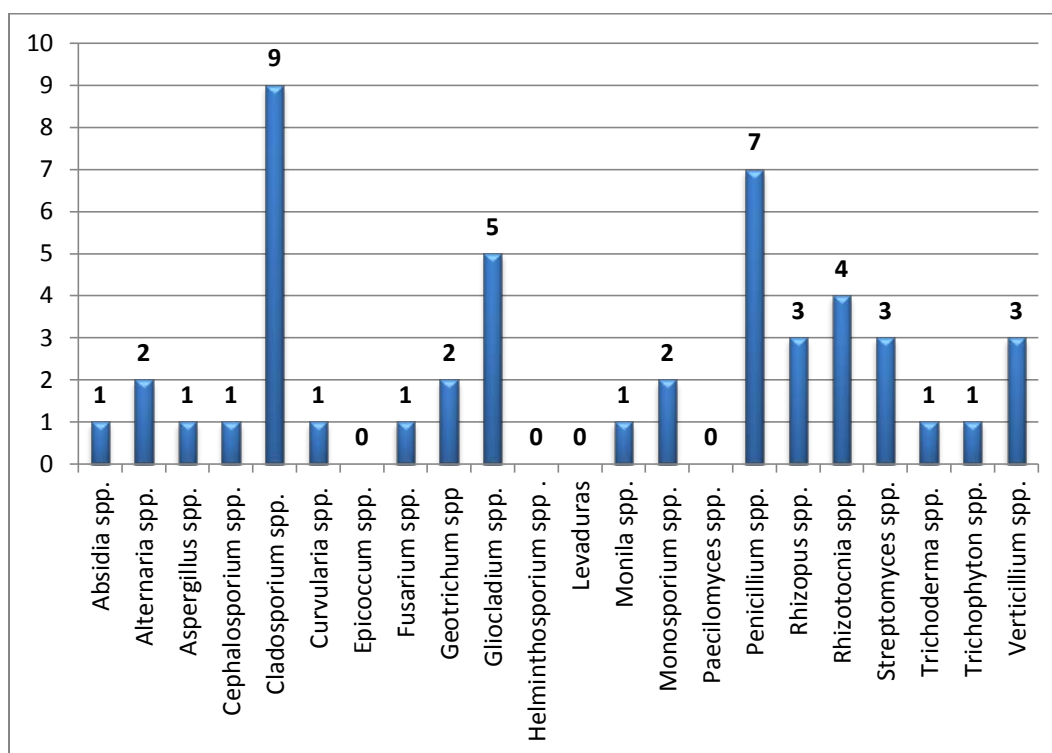
Gráfico 8. Frecuencia de géneros de hongos en el Edificio de Ciencias Exactas y Naturales – Escuela de Bioanálisis



Fuente: Rivadeneira D. 2011

Los resultados en cuanto a la presencia de géneros en el Edificio de Microbiología permitió conocer que el *Cladosporium spp.* se encontró con una frecuencia de 9 de 9 ambientes, seguido del *Penicillium spp.* en 7 de 9 ambientes y también de *Glicadium spp.* en 5 de 9 ambientes en el mismo edificio. (Gráfico 9)

Gráfico 9. Frecuencia de géneros de hongos en el Edificio de Microbiología



Fuente: Rivadeneira D. 2011

El nivel de contaminación de hongos permitió conocer diversos géneros encontrados dentro de los ambientes de los edificios de la PUCE, concordando que dentro de ellos el *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.* fueron los géneros de mayor presencia. “Diversos autores como Pitzurra *et al.* (1999), Shelton *et al.* (2002), Labarrere-Sarduy *et al.* (2003), Rivas *et al.* (2005), Aira *et al.* (2006), Rojas *et al.* (2008) han encontrado predominancia de *Cladosporium spp.* y *Penicillium spp.* en ambientes cerrados.”⁴⁸ Y aunque principalmente esos géneros hayan incidido en la contaminación de los lugares establecidos para el análisis, “otros hongos (*Alternaria spp.*, *Stachybotris spp.*, *Stemphilium spp.* y *Trichoderma spp.*) son considerados como responsables del biodeterioro de libros, objetos de arte, material audiovisual, pintura, maderas, murales y pieles”⁴⁸.

⁴⁸ Tolosa, D., 2006

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Después de la evaluación microbiológica se concluye que:

- La presencia de hongos contaminantes en los ambientes analizados es un factor predisponente para causar el Síndrome del Edificio Enfermo, tanto por el nivel de contaminación de hongos como por la diversidad en cuanto a géneros encontrados durante toda la investigación.
- El recuento de esporas fúngicas fue un parámetro importante para analizar la calidad microbiológica de los ambientes internos y para establecer el nivel de contaminación de los mismos.
- El manejo de diversos microorganismos en los laboratorios de docencia, en los diferentes ambientes de la Escuela de Bioanálisis, es un factor predisponente para incrementar el nivel de contaminación del aire en estas dependencias.
- Los ambientes que presentaron mayor contaminación por esporas de hongos fueron la oficina 4 del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales - Escuela de Bioanálisis y el laboratorio Histopatología y Micología de docencia ya que en estos ambientes influyó la presencia de factores como: alfombras deterioradas, polvo, señales de humedad en paredes que coadyuvaron en el incremento del nivel de contaminación (UFC/m³ de hongos).
- Los géneros *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Helminthosporium spp.* y *Rhizopus spp.*, fueron aquellos que se presentaron con mayor frecuencia dentro de los lugares analizados, cabe recalcar que estos Géneros son causantes de patologías respiratorias.
- El procedimiento de captación de aire por impacto activo utilizando el equipo MAS 100, permitió obtener mediciones precisas y resultados confiables consiguiendo expresarlos cuantitativamente en la investigación.
- Los medios de cultivo utilizados en esta investigación me permitió determinar que el Agar Rosa de Bengala fue más selectivo que el Agar Papa Dextrosa.

5.2 RECOMENDACIONES

- Continuar con la realización de la prevalencia de patología alérgica respiratoria por hongos.
- Establecer normas en el país acerca de los niveles de contaminación por esporas fúngicas en los ambientes internos.
- Planificar anualmente la reposición de materiales e insumos en mal estado.
- Mejorar las prácticas de limpieza y desinfección para reducir la carga fúngica de los ambientes y de esta forma disminuir las reacciones alérgicas de los trabajadores.
- Investigar la presencia de olores extraños en ambientes del Edificio de Ciencias Exactas y Naturales - Escuela de Bioanálisis para mejoramiento del entorno y calidad ambiental.
- Hacer un estudio comparativo para diferenciar los procedimientos de captación de aire tanto activo como pasivo.
- Es aconsejable implementar purificadores de ozono para el control de los microorganismos. El ozono contribuye a disminuir la cantidad de los patógenos, como desinfección, higienización, asepsia, antisepsia.
- Se recomienda realizar el estudio en época de invierno, para comparar los resultados.
- Se debería tomar las muestras de aire utilizando otros tiempos y volúmenes al momento de captar el aire, es decir, programar al equipo con distintos rangos de medición.

5.3 BIBLIOGRAFÍA

1. AGENCIA EUROPEA PARA LA SEGURIDAD Y LA SALUD EN EL TRABAJO, “Guías Técnicas”, Europeannetwork, España, 2007. Consultado el 20 de octubre del 2011.
http://osha.europa.eu/fop/spain/es/good_practice
2. AGUIAR, Ximena, PAÍS, Ana, “El Los Edificios también se enferman”, El País, Portal Digital, Uruguay, 2009. Consultado el 9 de octubre del 2011.
<http://www.elpais.com.uy/090717/pciuda-430140/informe/los-edificios-tambien-se-enferman/>
3. ALBRIGHT DM, “Human health effects of airborne mycotoxins exposure in fungi-contaminated indoor environment”, Professional Safety, USA, 2001. Consultado el 15 de diciembre del 2011.
<http://www.bvsde.paho.org/bvsast/e/fulltext/enciclopedia/44.pdf>
4. ARIAS, Edna, PIÑEROS, Paola, “Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde”, Bogotá, 2008. Consultado el 16 de Diciembre del 2011 p.
<http://www.javeriana.edu.co/biblios/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
5. BARCUS, Adrián, et al, Los invasión y difusión de las enfermedades relacionadas con el *Penicillium*, BioMed Central, Ohio – USA, 2005. Consultado el 3 de noviembre del 2011.
http://viaclinica.com/article.php?pmc_id=1343575
6. BERENGUER, María José, “NTP 289: Síndrome del Edificio Enfermo: factores de riesgo”, España, 1990. Consultado el 12 de octubre del 2011
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_289.pdf

7. BONIFAZ Alexandro, Micología Medica Básica, Tercera Edición, Mc Graw Hill, 2008
8. BOWEN, G, “Síndrome del Edificio Enfermo”, Ecuador, 2011. Consultado el 20 de Enero del 2011
<http://www.buenastareas.com/ensayos/Sindrome-Del-Edificio-Enfermo/2599698.html>
9. BURGOS FLORES, Dagoberto, “Síndrome de los Edificios Enfermos: Causas y alternativas de Solución”, Universidad de Sonora, México, 2007. Consultado el 12 de octubre del 2011
http://www.archive.org/stream/EPISTEMUS_153/epistemus4.pdf_djvu.txt
10. CAÑEDO, Verónica, “Manual de Laboratorio de Manejo de Hongos Entomopatógenos”, Centro Internacional de la Papa, Perú, 2004. Consultado el 22 de Diciembre del 2011.
<http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>
11. CARRILLO, Leonor, “Los hongos de los alimentos y forrajes”, Bogotá, 2001, Consultado el 20 de octubre del 2011.
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/05htextopenicilios.pdf>
12. CASTELLANOS, L, “El número Fibonacci”, Portal Universia, España, 2007, Consultado el 20 de Marzo
<http://funversion.universia.es/curiosidades/sorprendente/fibonacci.jsp>
13. Comunicación personal, Ing. Danilo Arroyo, 2011.
14. Comunicación personal, Msc. Elena Granda.

15. CULTIMED, “Manual Básico de Microbiología”, Panreac, 2000, USA, Consultado el 20 de diciembre del 2011. p.
http://www.panreac.es/pdf/ManualCultimed_completo.pdf

16. DE LA ROSA, M.C. MOSSO, ULLÁN, “El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos”, Observatorio Medioambiental, España, 2002. Consultado el 12 de octubre del 2011
<http://www.ucm.es/BUCM/revistas/cca/11391987/articulos/OBMD0202110375A.PDF>

17. DÍAZ ROJAS, Martín, GUTIÉRREZ ESPINZA, Jorge, GUTIÉRREZ ESPINOZA, Alejandra, GONZALEZ CHÁVEZ, María del Carmen, y otros, “Caracterización aerobiológica de ambientes intramuro en presencia de cubiertas vegetales”, Revista Internacional de contaminación ambiental, México, 2010. Consultado el 12 de octubre del 2011
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992010000400003&script=sci_arttext

18. DUGDALE, David, “Aspergilosis - Overview”, University of Maryland, Medical Center, USA, 2011. Consultado el 13 de diciembre del 2011.
http://www.umm.edu/esp_ency/article/001326.htm

19. FLANNIGAN, Brian, et al, “Calidad del aire interior”, Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, USA, 1993. Consultado el 12 de diciembre del 2011.
<http://es.scribd.com/doc/68402631/Calidad-de-Aire-Interior>

20. GARRETT H. M., HOOPER M. B., COLE M. F. Y HOOPER A. M., “Airborne fungal spores in 80 homes in the Latrobe Valley”, Level seasonality and indoor–outdoor relationship. Aerobiología, Australia 1997, Consultado el 12 de octubre del 2011
<http://ajrcm.atsjournals.org/cgi/reprint/158/3/891.pdf>

21. GRANADOS, Toni, “Contaminación Biológica y Química en el Aire, Ambientes Laborales”, Wellness Nikken, Inglaterra, 2008. Consultado el 3 de noviembre del 2011.
http://www.ofcformacion.com/admin/doc_temas_masters/PARTE%206%207%20Y%208%20CONTAMINACION%20BIOLOGICA%20DEL%20AIRE.pdf
22. GUARDINO SOLÁ, Xavier, “Calidad de Aire Interior”, Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Lyon, 2009. Consultado el 12 de octubre del 2011
<http://www.bvsde.paho.org/bvsast/e/fulltext/enciclopedia/44.pdf>
23. HERAS COBO, Carlos, “NTP: La ventilación general en el laboratorio”, España, 1992, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, Consultado el 18 de diciembre del 2011, p.
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/301a400/ntp_373.pdf
24. HERNANDEZ, Ana, “NTP: Contaminantes biológicos: Criterios de valoración”, España, 1995, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, Consultado el 28 de Diciembre del 2011.
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp_409.pdf
25. INSTITUTO DE NORMALIZACIÓN ECUATORIANA, “Ventilación natural de Edificios”, INEN 1 126, Ecuador, 2004: Autor Consultado el 13 de diciembre del 2011, p.
<http://www.inen.gob.ec/images/pdf/nte/1126.pdf>
26. KAROLDU, “Aislamiento de Agentes Fúngicos de Distintos Ambientes”, 2010. Consultado el 15 de diciembre del 2011.

<http://www.buenastareas.com/ensayos/Hongos/497815.html>

27. KEISLER, Fries, “Alternaria alternata”, Alemania, 2002, Consultado el 4 de noviembre del 2011.

<http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/019.PDF>

28. LOGROÑO, Milton, “Programa de Salud Ambiental”, Ministerio de Salud Pública, Ecuador, 2011. Consultado el 15 de Diciembre del 2011

<http://www.msp.gob.ec/index.php/Salud-Ambiental/datos-generales.html>

29. MANCHA, Francisco, “From de miasmas to the sick buildings: IndoorsMolds”, Barcelona, 2007, Consultado el 5 de noviembre del 2011.

<http://www.ucm.es/BUCM/revistas/vet/19882688/articulos/RCCV0707230277A.PDF>

30. MANZANA Aurora, “De los miasmas a los edificios enfermos: Hongos en el interior”, RCCV, Vol. 1, España, 2007, Consultado el 12 de octubre del 2011

<http://www.ucm.es/BUCM/revistas/vet/19882688/articulos/RCCV0707230277A.PDF>

31. MARTÍ SOLÉ, María del Carmen, “NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire”, España, 1990. Consultado el 12 de octubre del 2011

http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_299.pdf

32. MARTÍ SOLÉ, María del Carmen, ALONSO ESPALADÉ, Rosa M, CONSTANS AUBERT, Angelina, “NTP 335 Calidad de aire interior: Evaluación de la presencia de granos de polen y esporas fúngicas”, España, 1990. Consultado el 12 de octubre del 2011

http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_289.pdf

33. MARTÍ SOLÉ, María del Carmen, CONSTANS Angelina, “Calidad del aire interior: identificación de hongos”, SIAFA, España, 2003, Consultado el 20 de octubre del 2011.
<http://www.siafa.com.ar/notas/nota43/hongos.htm>
34. MARTÍ SOLÉ, María del Carmen, ALONSO ESPALADÉ, Rosa M, CONSTANS AUBERT, Angelina, “NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos”, España, 1997. Consultado el 12 de octubre del 2011
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp_488.pdf
35. MCD LAB, “Especificaciones Agar Dextrosa y Papa”, México, 1995, Consultado el 20 de Marzo
<http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20DEXTROSA%20Y%20PAPA.pdf>
36. MERCK KGaA, Protección eficaz de los microorganismos peligrosos aéreos. Consultado el 22 de Enero del 2011. P.
http://www.merck-chemicals.com/pharmaceutical-ingredients/mas-100-nt-/spanish/c_9GGb.s1OCtcAAAEfAGAHFaNC
37. MINISTERIO DE TRABAJO Y SALUD, “Reglamento de Seguridad y Salud de los Trabajadores y Mejoramiento del Medio Ambiente de Trabajo”, Unidad de Seguridad y Salud, Ecuador, 2000: Autor. Consultado el 13 de diciembre del 2011
38. MONTEJO Miguel, "Infección invasora por Aspergillus y otros hongos filamentosos en enfermos con trasplante de órgano sólido", Revista IberoamMicol, 2002, España, Consultado el 15 de noviembre del 2011. P.
<http://www.reviberoammicol.com/2002-19/009012.pdf>

39. MUZI, Giacomo, “Riesgos laborales derivados de agentes biológicos: retos que hay que afrontar “, Bruselas, 2007, consultado el 04 de noviembre 2011.
<http://osha.europa.eu/es/seminars/occupational-risks-from-biological-agents-facing-up-the-challenges-es>
40. NELSON, Amy, “Enfoque de Epidemiología de Campo”, Niveles de Bioseguridad en el Laboratorio, USA, 2008, Consultado el 3 de noviembre del 2011.
http://cphp.sph.unc.edu/focus/vol5/issue1/5-1BiosafetyLevels_espanol.pdf
41. Organización Mundial de la Salud, “Manual de bioseguridad en el laboratorio”, Tercera edición, Ginebra, 2005. Consultado el 21 de diciembre del 2011, p.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9243546503_spa.pdf
42. PEREZ SÁNCHEZ, Refugio, “Técnicas Microbiológicas”, Microcultivo, México, 2006, Consultado el 22 de diciembre del 2011.
<http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/T%C3%A9nicas%20microbiol%C3%B3gicas/T%C3%A9nicas%20Microbiol%C3%B3gicas%20Parte%202.pdf>
43. PERSON, “*Cladosporium herbarum*”, Revista Iberoamericana, Hongos alérgicos, España, 2002. Consultado el 18 de octubre del 2011.
<http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/027.PDF>
44. PINZÓN, Verónica, “Formato único de formulación – Proyecto Ambiental Escolar PRAE”, Bogotá, 2010, Consultado el 20 de octubre del 2011.
45. QUADRI, Ing. Néstor, “Síndrome del Edificio Enfermo”, Acondicionamiento, Argentina, 2009. Consultado el 13 de octubre del 2011.
<http://www.acondicionamiento.com.ar/nueva/wp-content/uploads/2009/01/sindedifenf.pdf>

46. REGODÓN, María Inés, et., al., “Pérdidas de calor y formación de condensaciones en los puentes térmicos de los edificios”, España, 2000, Consultado el 20 de diciembre del 2011, p.
http://digital.csic.es/bitstream/10261/5864/1/Diaz_Regodon_IETCC.pdf
47. SOLIS, Martha, ZAPATA, Sergio, “Cultivo y observación de Zigomicetos”, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2007, México, Consultado el 20 de diciembre del 2011.
48. TOLOSA, Deisy, “Aeromicrobiología del archivo central de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia”, Colombia, 2006, Consultado el 20 de diciembre del 2011, p.
www.revista.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/.../12385/1146
49. VAL Daniel, “Aspergillus spp”, Fungi, 2004. Consultado el 15 de Diciembre del 2011.
http://danival.org/fungi/sp/aspergillus/aspergillus_intro.html
50. VENEGAS MATA, Elizabeth, “Calidad de Aire Interior en Edificios”, Cegesti, Éxito Empresarial, México, 2010. Consultado el 12 de octubre del 2011
http://www.cegesti.org/exitoempresarial/publicaciones/publicacion_128_011110_es.pdf
51. ZURIZADAI, Carranza, “Selección e identificación de especies de hongos ectomicorizógenos del estado de hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido”, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, 2006. Consultado el 12 de enero del 2011.
http://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/icap/licenciatura/documentos/Seleccion%20e%20identificacion%20de%20especies.pdf

NTP 335: Calidad de aire interior: evaluación de la presencia de polen y espora fúngicas

Qualité de l'air intérieur: évaluation de la présence des grains de pollen et des spores fongiques
Indoor air quality: pollen grains and fungi spores evaluation

Vigencia	Actualizada por NTP	Observaciones	
Válida			
ANÁLISIS			
Criterios legales		Criterios técnicos	
Derogados:	Vigentes:	Desfasados:	Operativos: SI

Redactoras:

M. Carmen Martí Solé
Licenciada en Farmacia

Rosa M. Alonso Espadalé
Licenciada en Biología

Angelina Constans Aubert
Ingeniero Técnico Químico

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

Como continuación de las anteriores Notas Técnicas de Prevención referentes a la calidad de aire interior, se expone aquí el procedimiento a seguir para la evaluación en aire de polen y esporas fúngicas, cuya presencia en el mismo puede ser el origen de la aparición o aumento de los casos de alergia detectados en un ambiente interior.

Introducción

En los últimos años los problemas de contaminación biológica en ambientes interiores han recibido una importante atención, admitiéndose en general que los microorganismos presentes en el aire interior pueden causar problemas de naturaleza infecciosa y alérgica. Básicamente los efectos que pueden causar los distintos contaminantes biológicos presentes en el ambiente interior de un edificio sobre la población expuesta son:

- **Virus:** infecciones, aunque necesitan ser huéspedes de un ser vivo (célula) para desarrollarlas.
- **Bacterias:** infecciones.
- **Polen:** alergias.
- **Hongos y sus esporas:** alergias, aunque algunos hongos son capaces de producir unas sustancias tóxicas denominadas micotoxinas. Un ejemplo de estas últimas son las aflatoxinas.

Un procedimiento para la determinación de bacterias y hongos en aire interior se halla descrito en la NTP 299- Método para el recuento de bacterias y hongos en aire, existiendo métodos para el recuento total de bacterias y hongos en ambientes cerrados, así como para determinados tipos de bacterias como estafilococos, estreptococos y legionella. El método que se describe en esta NTP permite, además del recuento e identificación de hongos, la identificación de esporas fúngicas y de granos de polen directamente por observación al microscopio óptico.

Una variada gama de bacterias saprofitas y hongos se desarrollan en el interior de los edificios y pueden crecer en las superficies de recubrimiento de paredes, suelos y lugares donde se acumula polvo y en los sistemas HVAC (calefacción, ventilación, y aire acondicionado), liberando esporas y células en el aire, siendo Cladosporium y Penicillium los mohos más abundantes.

El polen y las esporas son elementos reproductores de las plantas fanerógamas y los hongos, respectivamente que son liberados de las anteras y esporangios por dehiscencia de estos órganos. Esta liberación puede ser de forma explosiva, de una sola vez, o de forma gradual, dependiendo de la planta de que se trate. Por ello, podemos considerar a las plantas como centros emisores de partículas, en este caso de partículas biológicas.

El polen se origina principalmente en las plantas de exterior y su concentración en el interior de edificios es normalmente mucho más baja que en el exterior debido al denominado efecto escudo de los edificios. En consecuencia, problemas respiratorios asociables a la presencia de polen en interiores, aparecerán en situaciones de elevada concentración exterior. En los edificios cerrados, la presencia

de polen en el aire interior pondrá de manifiesto un mal funcionamiento del sistema de filtración del aire de renovación o bien que existen aberturas al exterior no controladas. También pueden llegar a través de las personas y materiales procedentes del exterior por haberse fijado en éstos.

Alergias en ambientes interiores

Las alergias causadas por las esporas fúngicas y el polen son, según algunos autores, la causa más común del Síndrome del Edificio Enfermo (SEE). De ahí el interés de disponer de un procedimiento para su evaluación.

Se define la alergia como una reacción de hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad son consecuencia de la exposición a materiales del ambiente que actúan a modo de antígenos, estimulando la producción de anticuerpos específicos.

La Aerobiología estudia las partículas vivas, o biológicamente activas, constituyendo una parcela más del control del medio ambiente. El polen y las esporas fúngicas presentes en la atmósfera son partículas vivas, dispersas en el aire que entran en contacto con el organismo a través de las mucosas, durante el proceso de respiración. Su estudio en aire comprende la parte de la Aerobiología denominada Aeropalinología, que por otra parte presenta los casos más corrientes de la Aerobiología.

La Aeropalinología es una ciencia que está cobrando un gran interés en la actualidad, aunque ya era conocida desde el siglo pasado, cuando se descubrió que los granos de polen presentan una gran actividad al entrar en contacto con las mucosas humanas. Los fenómenos derivados de tal actividad se conocen con el nombre de Polinosis, que constituye un conjunto de afecciones producidas por el polen y las esporas con una importancia clínica y social de primer orden. La alergia polínica es una de las enfermedades más molestas y persistentes entre las no fatales, estando relacionada, tanto con la presencia en el aire de determinados granos de polen y esporas, como la concentración de los mismos. La etiología de dichas afecciones se debe a determinadas sustancias, existentes en las estructuras de los propios granos de polen y esporas, capaces de desencadenar procesos anafilácticos en los pacientes con una capacidad de reacción específica alterada frente a las mismas.

Los equipos de humidificación y enfriamiento del aire acondicionado pueden ser fuentes de bioaerosoles. Hay estudios que demuestran que humidificadores contaminados con agentes alergógenos como *Cephalosporium* y *Penicillium* se implicaron en episodios de alveolitis alérgica, también se ha descrito que los humidificadores de aire acondicionado pueden ser fuentes de contaminación de importantes antígenos como *Alternaria alternata* y *Aureobasidium pollulans* que son relevantes para la alveolitis alérgica denominada "pulmón del humidificador".

Métodos de captación

Para la captación del polen y esporas presentes en el aire existen diferentes procedimientos, agrupables en procedimientos pasivos (gravimétricos y de impacto pasivo) y activos o volumétricos (de impacto activo, y de filtración activa).

Los procedimientos activos de impacto y filtración, son los únicos que permiten expresar los resultados cuantitativamente, por unidad de volumen, relacionable, con la unidad de volumen respirada por la persona susceptible de padecer reacciones alérgicas. Por ello solamente se hará referencia a ellos.

Captación por impacto activo. "SAS compact"

Un volumen de aire es aspirado y conducido a través de una superficie perforada sobre una placa conteniendo un medio de cultivo adecuado. Este método es útil para la captación de bacterias y hongos y es el que se ha venido empleando en el INSHT para estos microorganismos (ver NTP-299), pero no es válido para la captación de granos de polen y solamente permite captaciones puntuales. Por ello en este estudio se ha empleado el captador MCV que se comenta posteriormente.

Captación por impacto activo. Captador Burkard

Este método se basa en el impacto de una masa de aire sobre una superficie captadora, que se desplaza con lentitud. La corriente de aire, en este caso, es activa gracias a una bomba de aire colocada debajo del colector. El aire entra por un orificio anterior e impacta sobre una superficie dispuesta verticalmente, constituida por una cinta transparente, impregnada por sustancias adhesivas.

Este método es útil porque la cinta puede permanecer durante una semana expuesta al aire. Gracias a los dispositivos mecánicos del aparato, el movimiento lento de la misma permite separar las capturas diarias y, también, hacer una aproximación horaria de las mismas. Por contra, debe tenerse especial cuidado en el montaje de la cinta para la observación microscópica, evitando la formación de burbujas y preparando montajes no demasiado gruesos.

Captación por filtración activa. Captador MCV

El aire a examinar es aspirado, a través de un filtro de acetato de celulosa (Millipore). Este tipo de filtro permite la identificación inmediata de las partículas ya que se transparenta con aceite de inmersión. Consta de una cámara filtradora con dispositivo de veleta, una bomba electromagnética de membrana para la aspiración de aire a bajo volumen, un contador y un temporizador horario. Este método fue diseñado por Suárez-Cervera & Seoane-Camba en 1983, comercializado por MCV (Barcelona) y es el descrito en la presente NTP.

Reactivos y productos

Todos los reactivos y productos deben tener como mínimo la especificación "para análisis" y el agua utilizada ha de ser bidestilada o de

calidad equivalente. Como medio de cultivo se emplea Agar Sabouraud con cloranfenicol (ver NTP-299) y como aceite de inmersión el específico para Microscopía.

Aparatos y material

Captador MCV.

Microscopio óptico (Objetivo de 32x, y objetivos de inmersión de 50x y de 100x).

Estufas de cultivo:

- Estufa de cultivo a 25 °C de temperatura, para los hongos.
- Estufa de cultivo a 37 °C de temperatura, para pruebas de esterilización de placas.

Campana de Seguridad Biológica de tipo II A.

Contador de Colonias.

Autoclave.

Filtros de éster de celulosa (Millipore) de 5 mm de poro y 7 cm de diámetro.

Portaobjetos: 76x26 mm

Portaobjetos: 75x25x1,0 mm cantos pulidos 450.

Cubreobjetos.

Contenedores para residuos biológicos.

Placas de Petri.

Procedimiento

Toma de muestras

El aire aspirado por la bomba entra en la cámara filtradora a través de un orificio de 3 mm de diámetro, e incide perpendicularmente sobre el filtro, que está dispuesto en sentido horizontal. El diseño de la cámara permite que sobre el filtro queden retenidas tanto las partículas directamente aspiradas por la bomba, como aquellas que por efecto de la turbulencia, pudieran quedar en suspensión en la cámara. El aparato se pone en marcha 24 horas, transcurridas las cuales se procede al cambio de filtro.

Preparación y lectura del filtro

Cada filtro correspondiente a una muestra se divide en dos mitades, una de las cuales se dispone sobre dos portaobjetos con aceite de inmersión. Sobre el filtro, que debe quedar completamente transparente, se colocan dos cubreobjetos de 24x60 mm, cortando el filtro por la línea del portaobjetos y quedando así la preparación lista para ser observada al microscopio óptico (MO) y archivada por tiempo indefinido. Esta preparación permite efectuar la identificación y recuento de granos de polen y determinadas esporas a partir del cual se procede al cálculo del número de granos de polen y esporas por m³ de aire. Los granos de polen y las esporas se hallan dispersos en el filtro, aunque son fácilmente identificables. El resultado se basa en un barrido completo de todo el portaobjetos, lo cual es un proceso extremadamente lento. Una estimación aproximada del tiempo necesario para la observación completa de un portaobjetos se fijaría alrededor de 8 horas, aunque, según de donde proceda la muestra tendrá mayor o menor número de elementos para su identificación, lo que puede modificar este tiempo de análisis. En el apartado de observación al microscopio se dan más detalles del procedimiento.

Cultivo

La otra mitad del filtro se subdivide a su vez en dos partes y cada una de ellas se dispone en una placa de Petri conteniendo Agar Sabouraud como medio de cultivo y a continuación se incuba durante cinco días a una temperatura de 25°C.

También se utilizará el mismo medio de cultivo para las resiembras posteriores mediante las cuales se llegará a la identificación morfológica de los hongos crecidos en la placa.

Recuento de colonias

Transcurrido el tiempo de incubación, se observa el crecimiento de las colonias que en este caso ya son los hongos y se procede al recuento de los mismos mediante un contador de colonias que proporciona el n° de hongos por placa.

Posteriormente se procede a la identificación morfológica.

Observación al microscopio

Para la identificación del polen y las esporas es totalmente imprescindible obtener preparaciones muy limpias y utilizar un objetivo de inmersión para obtener determinaciones exactas. Dado que se trata de un trabajo laborioso y diariamente debe procederse al conteo de muchos granos de polen y esporas es aconsejable utilizar un objetivo de pequeño aumento (por ejemplo de 32x) para hacer los recuentos rutinarios, mientras que para resolver algún problema concreto, es aconsejable uno de inmersión de 50x, y en algunos casos es necesario finalizar la observación con uno de inmersión de 100x.

Polen

Por lo que se refiere a los granos de polen, sólo interesará obtener una idea cuantitativa aproximada. En principio sólo deben encontrarse en casos de edificios muy abiertos cuando la concentración exterior es muy elevada o bien cuando el aire de renovación no es adecuadamente filtrado. También pueden penetrar adheridos a ropa y materiales procedentes del exterior. Un análisis cualitativo exhaustivo sólo tendría sentido en casos de detección de reacciones alérgicas muy específicas.

Esporas

En cuanto al recuento de esporas, algunas tienen forma característica y particular y por lo tanto es fácil diferenciarlas. En otros casos, sin embargo, ocurre que aunque se trate de géneros distintos las esporas presentan la misma forma; en este caso se engloban de forma genérica en los apartados siguientes:

1. espora de color.
2. espora hialina.
3. didimospora de color.
4. didimospora hialina.
5. fragmospora de color.
6. fragmospora hialina.

Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, por ejemplo, se encuentran como esporas hialinas y, en cambio, el *A. niger*, aparece como espora de color.

Cálculos

Se efectúa al M.O un recuento del nº de granos de polen y de esporas en la parte del filtro examinada y, conocido el volumen de muestreo, los resultados se obtienen según la siguiente expresión:

$$\text{n}^\circ \text{ total de GP} = \frac{\text{RGP (o RE)} \times 1.7}{V}$$

nº total de GP: número de granos de polen por m³

RGP (o RE): número de granos de polen (o esporas) hallados en el recuento.

1,7: Factor de corrección.

V: Volumen de aire muestreado expresado en m³

Evaluación

La Comisión de la ACGIH para los Bioaerosoles ha desarrollado unas guías para evaluar estos agentes en los ambientes interiores recogidas en la publicación titulada *Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment*, ACGIH (1989). Estas guías tienen en cuenta la valoración médica de los síntomas, la evaluación del funcionamiento del edificio y el juicio profesional. Por las razones que se indican a continuación, no hay criterios numéricos o valores TLVs que permitan una interpretación sencilla de los datos sobre bioaerosoles, no recomendándose un muestreo rutinario para estos agentes. Si fuera necesario muestrear (p.e. para documentar la contribución de las fuentes identificadas) en las guías se recomiendan protocolos estándar.

Las mezclas de los contaminantes ambientales producidos biológicamente están omnipresentes en la naturaleza y pueden modificarse por la actividad humana. Todas las personas están expuestas repetidamente, día tras día, a una amplia variedad de estos contaminantes. No hay valores TLVs para las concentraciones de organismos totales cultivables o contables y partículas (p.e. *Aspergillus fumigatus*), agentes infecciosos (p.e. *Legionella pneumophila*) o contaminantes de procedencia biológica analizables (p.e. endotoxinas o compuestos orgánicos volátiles).

Un valor TLV general para la concentración de los bioaerosoles cultivables (p.e. hongos y/o bacterias totales) o contables (p.e. pólenes totales, esporas de hongos o bacterias) no tiene justificación científica porque:

- Los organismos cultivables o esporas contables no constituyen una sola entidad; es decir, los bioaerosoles son mezclas complejas de diferentes clases de partículas.
- Las respuestas de los humanos a los bioaerosoles varían desde efectos inocuos hasta enfermedades graves, dependiendo del agente específico y los factores de susceptibilidad de cada persona.
- Las concentraciones medidas de los bioaerosoles cultivables y contables dependen del método de toma de muestra y análisis.

No es posible recoger y evaluar todos los componentes de los bioaerosoles utilizando un único método de muestreo.

En ambientes considerados estériles el nº de UFC/ m³ debe ser 0.

Glosario

Dado que se han empleado términos poco corrientes en calidad de aire interior, se incluye un pequeño glosario de los mismos.

ANTERA: Parte del estambre de las flores que contiene el polen.

ANTICUERPO: Sustancia que se produce en el organismo y que se opone a la acción de elementos patógenos. También se puede definir como sustancia específica de los animales inmunes, producida como reacción a la presencia de un antígeno y que ejerce una acción antagónica específica sobre la sustancia por cuya influencia se ha formado. Es el agente de la inmunidad.

ANTÍGENO: Sustancia que, introducidas en el organismo, estimula la formación de anticuerpos.

BACTERIA: Microorganismo celular que se reproduce por escisión.

DEHISCENCIA: Apertura de forma natural de las anteras de las flores para dar salida al polen. Se emplea también para denominar la apertura del polipodio de un fruto para expulsar la semilla.

DIDIMOSPORA: Espora fragmentada en dos porciones.

ENDOTOXINA: Toxina retenida en el cuerpo vivo de las bacterias, que no se separa de ellas sino por disgregación de las mismas.

ESPORANGIO: Fruto o cápsula que contiene las esporas libres en su interior.

ESTAFILOCOCO: Nombre dado a ciertas bacterias de forma redondeada, que se agrupan como en racimos.

ESTAMBRE: Órgano sexual masculino de las plantas fanerógamas, que se halla hacia el centro de las flores.

ESTREPTOCOCO: Nombre dado a ciertas bacterias de forma redondeada que se agrupan en forma de cadena.

FANERÓGAMA: Plantas cuyos órganos sexuales se distinguen a simple vista.

FRAGMOSPORA: Espora dividida en diferentes porciones

HONGO: Cualquiera de las plantas acotiledóneas o celulares, desprovistas de clorofila, y de consistencia esponjosa, carnosa o gelatinosa.

LEVADURA: Organismo unicelular, de la familia de los blastomicetos, que se reproduce por gemación.

MICOTOXINA: Sustancia tóxica secretada por hongos microscópicos.

MICROORGANISMO: Organismo microscópico.

MOHO: Depósito o capa que se presenta en las sustancias orgánicas por el desarrollo de diferentes hongos de los géneros Mucor, Penicillium, Aspergillus, etc.

VIRUS: Cualquiera de los agentes infecciosos más pequeños que las formas corrientes de bacterias, algunas apenas visibles y otras invisibles con el microscopio ordinario, que pasan a través de los filtros, de un tamaño entre 0,2 y 0,01 m. Se multiplican en el cuerpo animal pero no pueden ser cultivados en medios inertes sino que requieren células vivas.

Bibliografía

(1) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment

ACGIH, Cincinnati, Oh. USA, (1989)

(2) ACGIH

1993-1994.TLVs. Valores límite para sustancias químicas y agentes físicos en el ambiente de trabajo. BEIs. Índices biológicos de exposición

ACGIH, Cincinnati, Oh, USA (1993)

Versión española. Generalitat Valenciana. Conselleria de Treball i Afers Socials. Valencia, (1994)

(3) ANTÓ J. M., SUNYER J., RODRIGUEZ R., SUAREZ-CERVERA M., VAZQUEZ L.

Community Outbreaks of Asthma Associated with Inhalation of Soybean Dust

(4) INEGOLD S., BARON E.

Diagnóstico Microbiológico (Bayley and Scott)

Ed. Médica Panamericana, 7ª Edición. (1989)

(5) BERENGUER M.J., HERNANDEZ A., MARTÍ M.C., NOGAREDA C., SOLÉ M.D., GUARDINO X.

El Síndrome del edificio enfermo. Guía para su evaluación (en impresión)

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Madrid, España. (1994)

(6) DIRECTIVA 901679/CEE

Directiva del Consejo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (Séptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE).

Diario Oficial de Comunidades Europeas L 374, 1-12, (31-12-90)

(7) FERNANDEZ D., SUAREZ-CERVERA M., DIAZ T., VALENCIA R.M.

Airborne pollen spores of León (Spain)

Int. J. Biometerol. 37:89-95 (1993)

(8) FLANNIGAN B.

Indoor Microbiological Pollutants-Sources, Species, Characterisation and Evaluation, in Chemical, Microbiological, Health and Comfort Aspects of Indoor Air Quality-State of the Art in SBS, de Knóppel, H. y Wolkoff, P., editores. Kluwer Academic Publishers (for the CEC). Dordrecht, (1992).

(9) INSTITUT PASTEUR PRODUCTION

Culture Media and Laboratory Reagents Pasteur. 2ª Edición

Institute Pasteur. Paris, (1982)

(10) LENNETTE E., BALOWS A., HAUSLER W., SHADOMY H.

Manual de Microbiología Clínica, 4ª Edición

Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. (1987)

(11) MAC FADDIN J. F.

Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria, 2nd Edition

Ed. Williams & Wilkins. (1980)

(12) MARTÍ M.C.

Determinación de contaminantes biológicos en ambientes cerrados

Proc. I Conferencia Nacional de Higiene Industrial. Valencia, 16-18, Noviembre (1988)

(13) MULLER E., LOEFFLER W.

Micología. 1ª Edición

Ediciones Omega, S.A., Barcelona (1976)

(14) ROSES M., TORRES J.

An aerobiological study of pollen grains and fungal spores of Barcelona (Spain)

Aerobiología 8:255-265 (1992)

(15) SUAREZ-CERVERA M., MARQUEZ J.

Manual de Aerobiología

Departamento de productos Naturales. Biología Vegetal Sanitaria y Edatología: Unidad de Botánica Universidad de Barcelona. Barcelona (1990)

(16) SUAREZ-CERVERA M., SEOANE J.

Sobre el sistema de filtración automática en aerobiología

An Asoc. Palinol. Leng. Esp. 2:307-317(1985)

(17) MIEBERLING F., SCHWANTES H.

Botánica Sistemática. 2ª Edición

Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1976

NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire

Méthode pour le comptage des bactéries et des champignons dans l'air
Method for airborne bacteria and fungi counting

Vigencia	Actualizada por NTP	Observaciones	
Válida			
ANÁLISIS			
Criterios legales		Criterios técnicos	
Derogados:	Vigentes:	Desfasados:	Operativos: SI

Redactora:

M^a del Carmen Martí Solé
Licenciada en Farmacia

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

Esta Nota Técnica de Prevención expone la metodología correspondiente a la toma, transporte y conservación de muestras de aire para la determinación de bacterias y hongos, así como el fundamento del método analítico, su campo de aplicación y sus limitaciones.

Fundamento del método

El método se basa en el muestreo del aire problema mediante el aparato SAS (Surface Aire System) compact. De los muestreadores descritos en la NTP-203, se escogió éste por ser de fácil manejo, portátil y que permite elegir el medio de cultivo adecuado a cada requerimiento.

El aire muestreado se hace incidir sobre un medio de cultivo determinado, según se pretendan valorar bacterias u hongos. Posteriormente se procede a la incubación a una temperatura adecuada y finalmente se efectúa el contaje de colonias expresando el resultado en ufc/m³ (unidades formadoras de colonias por metro cúbico).

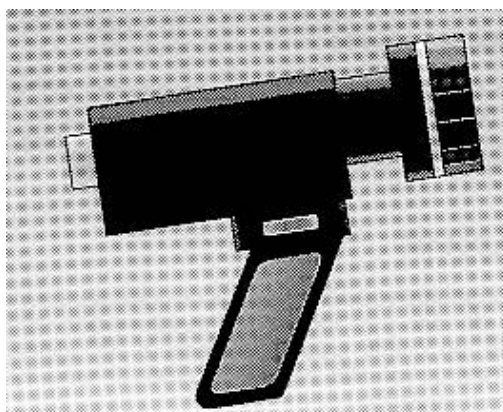


Fig. 1

Reactivos y productos

Todos los reactivos deben tener como mínimo la especificación "para análisis".

El agua utilizada ha de ser bidestilada o de calidad equivalente.

Medios de cultivo

Triptisoy Agar (TSA)

Es un medio de cultivo sólido compuesto por:

- Peptona de caseína..... 15,0 g/l
- Peptona de soja..... 5,0 g/l
- Cloruro sódico..... 5,0 g/l
- Agar-Agar..... 15,0 g/l
- pH del medio a punto de uso: 7,3 aproximadamente

Preparación del medio:

Añadir 40 g de esta mezcla a un litro de agua destilada. Dejar embeber y llevar a ebullición hasta disolver totalmente el agar. Esterilizar al autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Con esta preparación llenar las cápsulas de Petri, haciéndolo en el ambiente estéril de la cámara de bioseguridad, dejar enfriar y una vez solidificado el medio colocar las cápsulas 24 horas en la estufa de cultivo a 37°C. Pasado este tiempo se observan las placas desechando las que presenten contaminación.

Agar de sabouraud con cloranfenicol

Es un medio de cultivo sólido, específico para hongos, compuesto por:

- Peptona de caseína..... 5,0 g/l
- Peptona de carne..... 5,0 g/l
- D (+) Glucosa..... 40,0 g/l
- Cloranfenicol..... 0,5 g/l
- Agar - agar..... 15,0 g/l
- pH del medio a punto de uso: 5,6, aproximadamente

Preparación del medio:

Suspender 65,5 g de la mezcla en un litro de agua destilada y llevar a ebullición. Esterilizar al autoclave durante 10 minutos a 121°C. Evitar el sobrecalentamiento que afectaría a la gelificación. Una vez distribuido en placas de Petri hacer la prueba de esterilidad como se ha explicado en el punto anterior.

Solución de Armil al 1/1000

Se disuelve 1 ml. de Armil en 1 litro de agua.

Aparatos y material

Muestreador de aire . "SAS compact"

Tal como se describe en el punto 5 de la Nota Técnica de Prevención nº 203, existen diferentes tipos de muestreadores de aire para contaminantes biológicos. En la presente NTP se expone el procedimiento a emplear con el equipo "SAS compact" (ver la figura 1, cuyas características son las siguientes:

- El aire a examinar es aspirado a una velocidad fijada durante un tiempo variable, a través de una cubierta de protección perforada con múltiples agujeros pequeños de diseño especial.
- El flujo de aire es dirigido sobre la superficie de una cápsula de Petri del tipo "Rodac", que contiene el medio de cultivo adecuado para el examen microbiológico que se desee hacer.
- El aparato es transportable, funciona con batería recargable y el control del tiempo de funcionamiento es programable.

Placas de cultivo

Se utilizan las placas tipo "Rodac", útiles también para análisis de superficies.

Estufas de cultivo

Estufa de cultivo a 37°C de temperatura, para el cultivo de bacterias.

Estufa de cultivo a 28°C de temperatura, para el cultivo de los hongos.

Contador de colonias

Autoclave

Campana de seguridad biológica Bio - II - A

Contenedores para residuos biológicos

Procedimiento de análisis

Toma de muestra

Antes de empezar a tomar la muestra con el "SAS compact" ha de esterilizarse la cubierta del aparato. Ésta puede llevarse a cabo por medio del autoclave durante 20 minutos a 21 atmósferas. También se puede efectuar limpiando la cubierta del aparato con una solución desinfectante.

A continuación se coloca la cápsula de Petri en el lugar indicado del aparato de muestreo. Para manejar las cápsulas de Petri (conteniendo ya el medio de cultivo) y el muestreador se recomienda hacerlo con guantes estériles desechables. Después de cada bloque de toma de muestras, limpiar la cubierta del muestreador con una solución desinfectante, teniendo la precaución de que se haya secado totalmente antes de tomar una nueva muestra.

El aparato dispone de un conector de control de tiempo, dividido en unidades que van de 1 a 15, representando cada una de ellas un tiempo de 20 segundos. El volumen de aire muestreado en cada unidad es equivalente a 30 litros, lo que implica que se pueden realizar muestreos de una duración de 20 segundos hasta 5 minutos y con unos volúmenes de 30 a 450 litros de aire.

El tiempo y el volumen de muestreo dependen de la contaminación ambiental que se sospeche. Cuanto mayor sea ésta, menor es el tiempo de muestreo que se debe aplicar y viceversa.

Medios de cultivo

Triptisoy-agar

Se utiliza este medio de cultivo para efectuar el contaje de bacterias. Una vez tomada la muestra, se trasladan las cápsulas de Petri al laboratorio, dejándolas en la estufa de cultivo a 37°C durante 48 horas.

Agar-Sabouraud con cloranfenicol

Se utiliza este medio de cultivo para efectuar el contaje de hongos. Una vez tomada la muestra, se trasladan las cápsulas de Petri al laboratorio dejándolas en la estufa de cultivo a 28°C durante 5 días.

Recuento de colonias

Pasado el tiempo de incubación, se observa el crecimiento de las colonias y se procede al recuento de las mismas mediante un contador de colonias que proporciona el número de colonias formadas por placa.

Cálculos

Una vez determinado el número de colonias, y sabiendo el flujo de aire y el tiempo de muestreo que se ha aplicado, se puede calcular el número de unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire, aplicando la fórmula siguiente:

$$n^{\circ}\text{ufc}/\text{m}^3 = \frac{\text{NC} \times 1000}{30 \times \text{NU}}$$

siendo:

NC: número de colonias por placa

NU: número de unidades de tiempo empleadas en el muestreo

Las cápsulas de Petri una vez llevado a cabo el recuento se retiran del laboratorio empleando un contenedor de residuos biológicos.

Campo de aplicación

En lugares que, por el tipo de trabajo que se realiza en ellos, no precisan ser estériles, se recomienda llevar a cabo el recuento de hongos y bacterias en aire cuando exista una sintomatología en la población expuesta que sugiera una posible contaminación biológica causada por estos microorganismos.

Cuando el n° de ufc/m³ hallado sea superior a 500 se recomienda efectuar la identificación de los gérmenes existentes en el aire muestreado.

En ambientes considerados estériles el n° de ufc/m³ debe ser 0.

Bibliografía

(1) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Airborne viable microorganisms in office environments: sampling protocol and analytical procedures
Applied Industrial Hygiene 1(4) R19-R23 (1986)

(2) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Guidelines for assessment and sampling of saprophytic bioaerosol in the indoor environment

Applied Industrial Hygiene 2(5) R10-R16 (1987)

(3) ACGIH, COMMITTEE ACTIVITIES AND REPORTS

Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment

ACGIH, Cincinnati, Oh. USA, 1989.

(4) ADSA-MICRO

Manual de medios de cultivo para microbiología

ADSA, Barcelona, 1989

(5) HERNÁNDEZ A., MARTÍ MA G

Contaminantes biológicos: evaluación en ambientes laborales. NTP 203

INSHT, Barcelona, 1988

(6) MARTÍ MA. C.

Evaluación de contaminantes biológicos en aire en una oficina pública. ITB /153.89

INSHT, Barcelona, 1989

(7) MARTÍ MA. C.

Evaluación de contaminantes biológicos en aire en un laboratorio dental. ITB /27.90

INSHT. Barcelona, 1990

(8) MARTÍ MA. C.

Determinación de contaminantes biológicos en ambientes cerrados

II Conferencia Nacional de Higiene Industrial. Valencia, 16-18, Noviembre 1988

(9) PBI INTERNATIONAL

Microbiological Control of the Air and Surface Environment. SAS (Surface Air System)

pbi international, Milán, Italia 1978