

Evaluación de la flora bacteriana desarrollada en mascarillas desechables mediante microscopía electrónica de barrido

J. D. Mago^{a*}, M. Guzmán^{b*}, J. M. Mago^a, E. Velasco^a, W. Velásquez^b, M. Conde^c

^aLaboratorio de Materiales, Servolab Overseas, Inc. Puerto Ordaz, Estado Bolívar, Venezuela.

^bDepartamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

^cGerencia Regional y Especialista de aplicaciones, HLATAM, Lima, Perú.

*Autor de Correspondencia, E-mail: laboratorio@servolab.com.ve y militzaguzman2609@gmail.com

Recibido: 07-02-2022 Aceptado: 18-02-2022

Publicado: 31-03-2022

RESUMEN

Se evaluó cualitativamente la flora bacteriana desarrollada en mascarillas faciales desechables, del tipo quirúrgica, por microscopía electrónica de barrido (MEB), las cuales fueron usadas por sujetos saludables en periodos de tiempo de 6, 12, 24 y 48 horas. El estudio mostró que a medida que se incrementaban los lapsos de tiempo de uso de las mascarillas se observaron incrementos en la flora bacteriana desarrollada sobre la malla en contacto con la cara y boca de los voluntarios, con predominio de estructuras compatibles con bacterias, especialmente de formas cocoides. Se presume que los distintos morfotipos observados en la parte interna de la mascarilla, pertenecen a la microbiota orofaríngea de los individuos.

Palabras claves: Microbiota, bacterias, mascarillas, microscopía.

Evaluation of developed bacterial flora in disposable masks by scanning electron microscopy

ABSTRACT

The bacterial flora developed in surgical-type disposable facial masks was qualitatively evaluated by scanning electron microscopy (SEM), which were used by healthy subjects in time periods of 6, 12, 24 and 48 hours. The study showed that as the time periods of use of the masks increased, increases were observed in the bacterial flora developed on the mesh in contact with the face and mouth of the volunteers, with a predominance of structures compatible with bacteria, especially of coccoid shapes. It is presumed that the different morphotypes observed in the internal part of the mask belong to the oropharyngeal microbiota of the individuals.

Keywords: Microbiote; bacteria; masks; microscopy.

INTRODUCCIÓN

Con la incidencia de la pandemia provocada por el COVID-19 (SARS-CoV-2), la vida del ser humano ha cambiado considerablemente desde finales del 2019, tiempo en el que el virus comenzó a propagarse por el mundo. Ante el creciente aumento de casos de contagios, los gobiernos de los países del mundo han tenido que cerrar sus fronteras y han tomado diversas medidas de bioseguridad para tratar de contener el virus y evitar su propagación en la población [1]. Hasta ahora, la utilización de dispositivos de protección respiratoria ha sido la forma más eficaz de combatir la transmisión de virus [2]. Sin embargo, las principales medidas que se han

adoptado han sido el distanciamiento físico, uso de mascarillas y protección facial [3]. De allí que una de las principales medidas tomadas ha sido el uso de mascarillas, en virtud de que las mismas tienen como función impedir la transmisión de agentes patógenos entre las personas y minimizar los contagios, ya que se ha establecido que, por ejemplo, las mascarillas quirúrgicas tradicionales utilizadas adecuadamente pueden bloquear el ingreso de las gotas de saliva (gotas respiratorias), las cuales pueden ser portadoras del virus del COVID-19, al tracto respiratorio, condición que se garantiza en base a su fabricación, según la norma ASTM F2100-11 [4]. Las mascarillas faciales descartables de tipo quirúrgico se

fabrican a partir de un material polimérico, tales como polipropileno, poliestireno o polietileno. Las mismas están conformadas por tres mallas denominadas tela no tejida (TNT), ya que esta se obtiene por prensado. Las mallas externa e interna se denominan capas *Spunbond*; mientras que la malla que se ubica entre estas dos mallas se denomina capa *Meltblown* y que actúa como barrera viral y bacterial [4].

La Organización Mundial de la Salud ha establecido guías para el correcto uso de mascarillas faciales en la población en general ante el brote del SARS-CoV-2 [5]. Estudios han demostrado que la efectiva utilización de mascarillas faciales en la población puede resultar en una significativa reducción de contagios del virus causante del COVID-19 [6]. Sin embargo, algunos estudios sostienen que la eficacia del filtrado bacterial de las mascarillas faciales de tipo comercial decrece después de 4 horas de uso [7]. Esto es debido a que, si las mascarillas se usan prolongadamente, las bacterias, principalmente las aeróbicas, tienden a aumentar en ellas, poniendo en riesgo la salud de la persona que la utilice.

Sumado a esto, está el uso de mascarillas faciales de fabricación artesanal, principalmente fabricadas de algodón, las cuales se han constituido como una alternativa de bajo costo a las mascarillas comerciales desechables. Este tipo de mascarillas no siempre ofrecen la protección adecuada ante un brote epidémico.

Davies et al. [8] condujeron una investigación para probar la eficiencia de mascarillas artesanales ante dos microorganismos de prueba: *Bacillus atrophaeus* (bacteria tipo esporas con forma de varas de 0,95 a 1,25 μm) y Bacteriófago MS2 (23 nm en diámetro), ya que ambos microorganismos son comparables en tamaño al virus de la influenza, el cual es pleomórfico y con un tamaño entre 60 a 100 nm. Este estudio fue realizado comparando resultados con mascarillas quirúrgicas. A pesar de que encontraron resultados medianamente satisfactorios con las mascarillas artesanales, en cuanto a filtrado y retención

de los microorganismos, las de tipo comercial fueron mucho más eficientes en el estudio.

En un estudio comparativo se evaluó el desempeño de mascarillas quirúrgicas frente a las N95 y KF94 como medio para bloquear el SARS-CoV-2 en pacientes infectados con el virus. Se encontró que las mascarillas quirúrgicas fueron un poco menos efectivas en bloquear el virus de los pacientes, mientras que las mascarillas N95 y KF94 resultaron ser mucho más efectivas [9].

Por otro lado, la microbiota orofaríngea puede constituir un riesgo para las personas que utilizan mascarillas faciales de forma prolongada. Es bien sabido que la microbiota orofaríngea en el ser humano está constituida por más de 700 tipos diferentes de microorganismos, entre bacterias, hongos y virus, y muchos de ellos pueden ser indicativos de diversas enfermedades, tales como diabetes, obesidad, caries, cáncer bucal, etc. [10, 11]. El uso de mascarillas faciales no solo impide la entrada de virus y otros microorganismos al organismo humano a través del tracto orofaríngeo, sino igualmente impide la transmisión de estos organismos hacia el exterior. Sin embargo, esta microbiota permanece en la mascarilla, lo que puede aumentar su crecimiento sobre ella si es utilizada por largo números de horas continuas, constituyéndose, de esa manera, en un riesgo sanitario para la propia persona.

El objetivo de este estudio consistió en evaluar, mediante microscopía electrónica de barrido, la flora bacteriana desarrollada en mascarillas faciales que son utilizadas de forma prolongada, provenientes de la microbiota orofaríngea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron mascarillas faciales de tipo quirúrgico de la marca JHC Médica, las cuales se expenden en envoltorios plásticos sellados que garantizan que los mismos no estén expuestos a condiciones ambientales y de manipulación que permiten que las mismas sean completamente higiénicas, limpias y libres de microorganismos (figura 1).

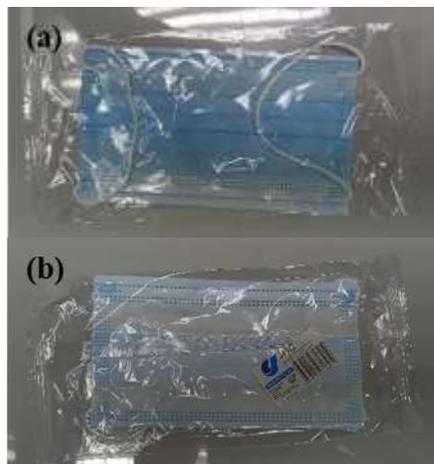


Fig. 1. Mascarilla facial marca JHC Médica: (a) vista de la malla externa (b) vista de la malla interna.

Se evaluaron 4 grupos de individuos que utilizaron mascarillas por periodos de tiempo de 6, 12, 24 y 48 horas. Cada grupo estuvo conformado por dos (2) individuos, quienes gozaron de buena salud para el momento del estudio. El estudio se efectuó en un mismo ambiente, que correspondió al sitio de trabajo de los voluntarios (el mismo para todos). Los lapsos de tiempo de uso de las mascarillas por todos los individuos fue el mismo durante la jornada laboral, hasta completar el tiempo de estudio. Una vez transcurrido el tiempo, las mascarillas se almacenaron en bolsas plásticas estériles de cierres herméticos y guardados bajo refrigeración hasta el momento de su estudio. Se cortaron secciones del centro de las mascarillas de aproximadamente 1 cm^2 y se separaron las dos mallas externas (parte de la mascarilla en contacto con el exterior y con la cara de la persona o capas *Spunbond*) y la malla interna (o capa *Meltblown*) (figura 2a). Adicionalmente, se cortó una sección de una mascarilla sin usar, la cual se utilizó como muestra control, todo esto siguiendo los protocolos de bioseguridad para evitar la contaminación de las secciones estudiadas.

Las secciones de mascarillas se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi TM4000 PlusII, que dispone de un filamento de tungsteno, detectores de electrones secundarios (SE), electrones

retrodispersados (BSE) y funcionalidad que combina los detectores SE y BSE (MIX), esto con la intención de valorar en cada uno de los grupos estudiados: 1) la morfología predominante (hongo o bacterias), 2) en cuanto a las bacterias, predominio de morfología cocoide o bacilar, y 3) el desempeño de las mascarillas en la protección que aportan en cuanto a su diseño y fabricación.

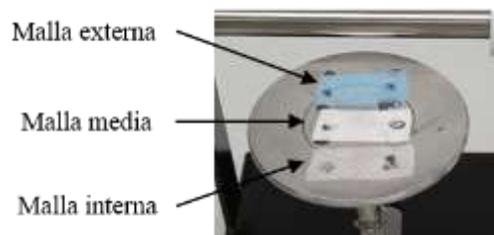


Fig. 2. Preparación de las secciones de mallas de una mascarilla facial en el portamuestra del microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una evaluación cualitativa de la flora bacteriana que creció en las mascarillas usadas por los sujetos de prueba. Para ello, se tomaron imágenes por MEB de las secciones cortadas de las mismas. Las evaluaciones se realizaron a las tres mallas; sin embargo, los resultados presentados a continuación corresponden solo a la sección de la mascarilla en contacto con la cara de los voluntarios. De esta manera, se evaluó la proliferación de microorganismos en dicha malla, por lo que los mismos se asocian a la microbiota oral. No se presentan resultados para la malla externa ni media, ya que los microorganismos que se detecten en estas mallas están relacionados a los provenientes del ambiente externo (malla externa) y a los provenientes tanto de la microbiota oral como del ambiente (malla media). La evaluación de las mallas se comparó con una malla sin usar, la cual se tomó como referencia para cada tiempo de estudio. En la figura 3 se muestran imágenes de MEB obtenidas con la combinación de los detectores de electrones secundarios y electrones retrodispersados del microscopio (función MIX), a una magnificación de 300X en dos zonas

diferentes de la misma malla. Se puede observar el tejido de orientación aleatoria de la malla, representativo de la tela no tejida o TNT (figura 3a), la cual se observa completamente libre de microorganismos u otras partículas. En la figura 3b se visualiza la zona donde se realiza el prensado del material polimérico, también libre de microorganismos u otras partículas.

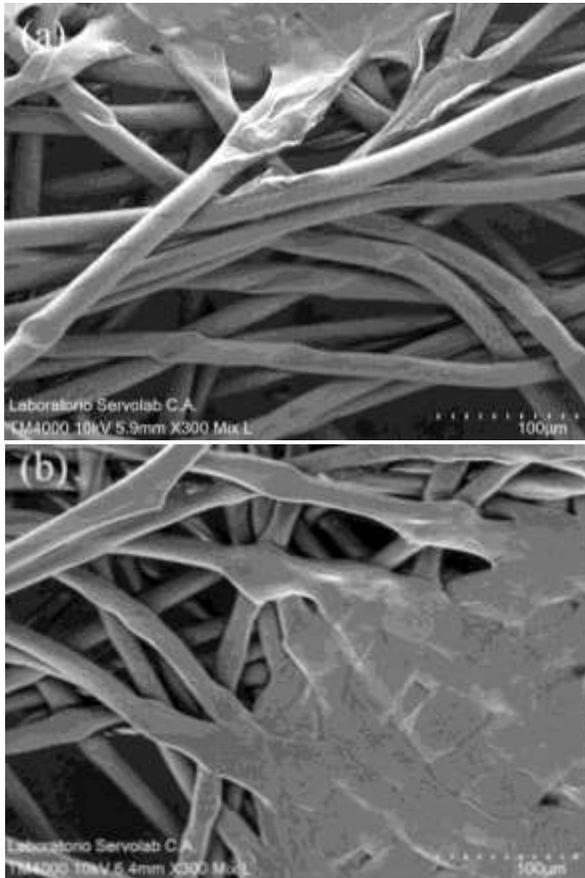


Fig. 3. Imágenes de MEB de una mascarilla facial sin usar, mostrando: (a) las fibras limpias del tejido característico de la mascarilla, (b) zona prensada característica de la malla.

La figura 4 muestra imágenes de MEB para una malla con 6 horas de uso. En la figura 4a se tiene una imagen obtenida con detector de electrones retrodispersados a una magnificación de 600X. En dicha imagen puede visualizarse la presencia de algunos microorganismos en forma de bacilos. Los mismos tienen una longitud aproximada de 5,8 μm . Similares microorganismos

pueden observarse en la figura 4b. Sin embargo, en dicha imagen se observa la presencia de un microorganismo en forma de cocoide con un tamaño aproximado de 10 μm (círculo azul) y otro microorganismo con forma de bacilo con un tamaño aproximado de unos 30 μm (círculo rojo). Adicionalmente, se visualizan en dicha imagen algunas estructuras, principalmente con formas cocoides, sobre las fibras, que presumen una baja incidencia de crecimiento de microorganismos sobre la mascarilla. Mientras que la figura 4c muestra una imagen de electrones retrodispersados, en donde se observan diversos microorganismos depositados sobre las fibras de la malla. Es evidente que a 6 horas de uso de las mascarillas comienzan a formarse microorganismos sobre la misma, por lo que éstos pueden relacionarse con la microbiota orofaríngea del individuo y que expulsa durante la respiración. Este resultado está acorde a los reportados por Barbosa y Graziano [7], quienes concluyeron que a las 4 horas de uso se detecta formación de microorganismos sobre las mascarillas. Se conoce que las bacterias son los principales componentes de la microbiota oral y que las principales bacterias incluyen los *Streptococcus mutans* (principal bacteria presente en la microbiota oral y asociado a la placa dental y las caries), *Porphyromonas gingivalis* (patógeno periodontal y que puede causar la caída de los dientes de la encía) y *Lactobacillus* (responsable de la fermentación del azúcar en ácido láctico y que fácilmente puede causar caries) [11].

En la figura 5 se tienen las imágenes de MEB, obtenidas con combinación de detectores de SE y BSE, para mascarilla facial con 12 horas de uso en diferentes zonas de la malla. En todas las figuras (5a - 5d) pueden observarse una alta proliferación de bacterias, con forma de cocoides y con tamaños cercanos a 1 μm , depositadas sobre las fibras de la malla. Es notorio el incremento de bacterias sobre la mascarilla al pasar de 6 a 12 horas de uso. Este crecimiento de bacterias en las mascarillas con el aumento de horas de uso fue observado por Zhiqing et

al. [12], quienes realizaron un conteo de bacteria en la malla externa de mascarillas quirúrgicas utilizadas por personal médico durante los procesos de operación en

hospitales, comprobando la presencia de bacterias a las 2 horas de uso.

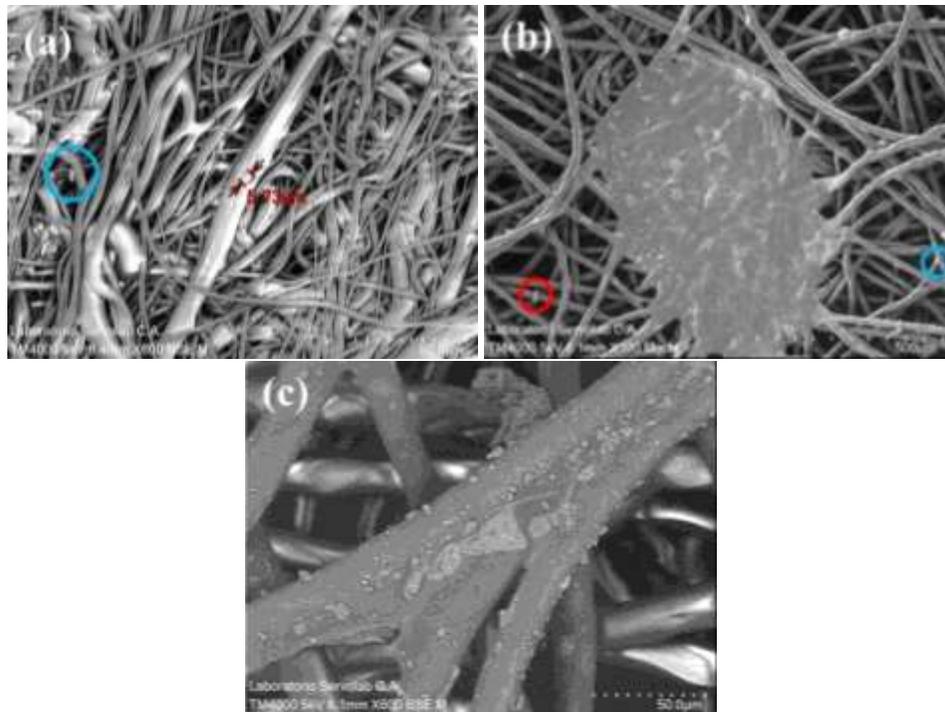


Fig. 4. Imágenes de MEB de una mascarilla con 6 horas de uso a: (a) 600X con detector BSE del tejido, (b) 100X obtenida con combinación de detectores de SE y BSE, y (c) 600X con detector BSE sobre una fibra.

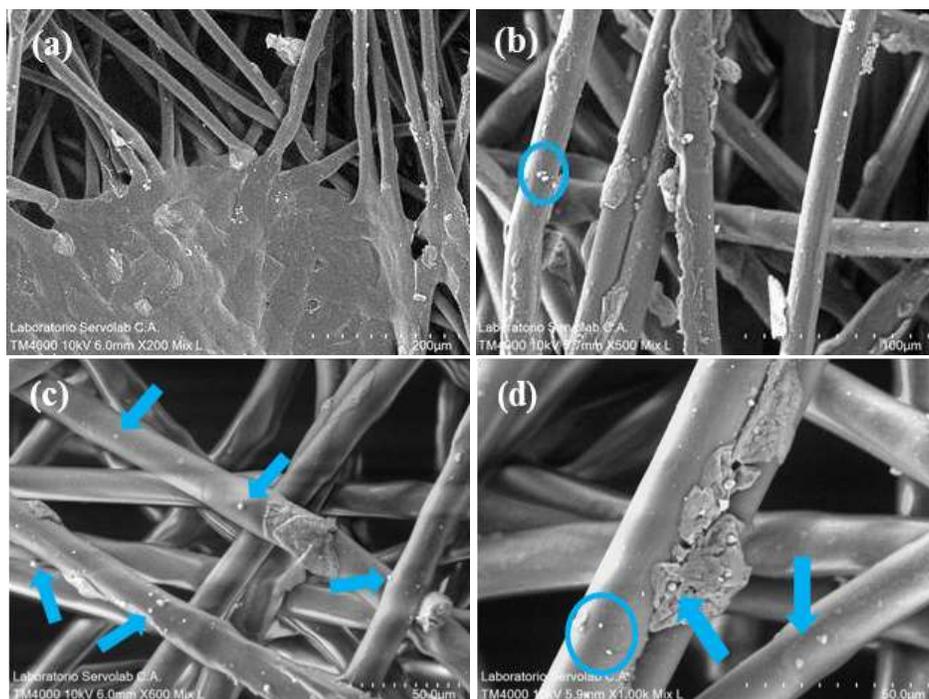


Fig. 5. Imágenes de MEB en diferentes zonas de una mascarilla con 12 horas de uso con magnificaciones de: (a) 200X, (b) 500X, (c) 600X, y (d) 1000X, obtenidas con combinación de detectores de SE y BSE.

En el caso de las mascarillas que fueron utilizadas durante un tiempo de 24 horas (figura 6) se observa la presencia de bacterias en forma de cocoides depositadas sobre las fibras (figura 6a y 6b, flechas azules) con escasa presencia de bacterias con forma de bacilo (figura 6a, flecha roja). Mientras que a las 48 horas de uso de las mascarillas (figura 7) la población de bacterias se ve incrementada aún más, predominando la forma cocoide. Un estudio reciente develó que a las 4 horas de uso de mascarillas desechables presentaban *Streptococcus* y *Staphylococcus*, frente a *Roseomonas*, *Paracoccus*, y *Enhydrobacter* detectados en el mismo estudio en mascarillas fabricadas en algodón [13]. En base a esto, es posible que estas formas de bacterias detectadas por MEB en las mascarillas faciales en el presente estudio puedan corresponder a este tipo de microorganismos (*Streptococcus* y *Staphylococcus*).

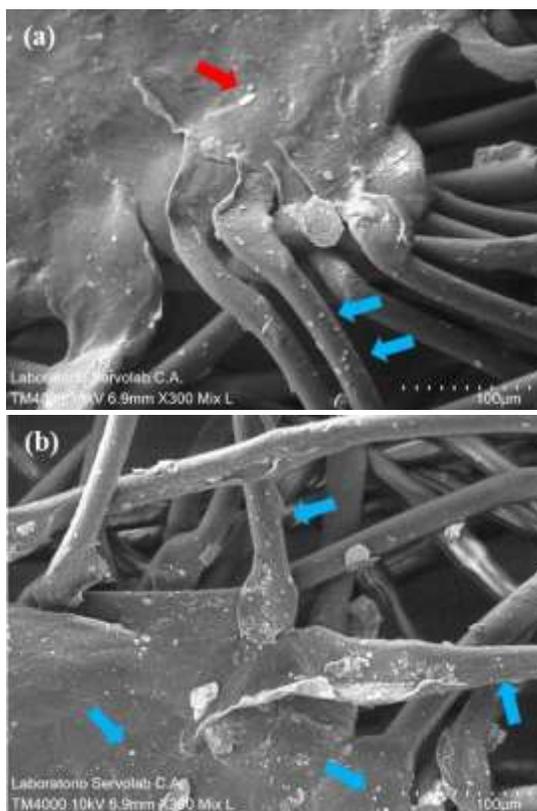


Fig. 6. Imágenes de MEB de una mascarilla con 24 horas de uso a 300X obtenidas con combinación de detectores de SE y BSE: (a) con presencia de bacilos, (b) otra zona de la mascarilla con presencia de cocoides.

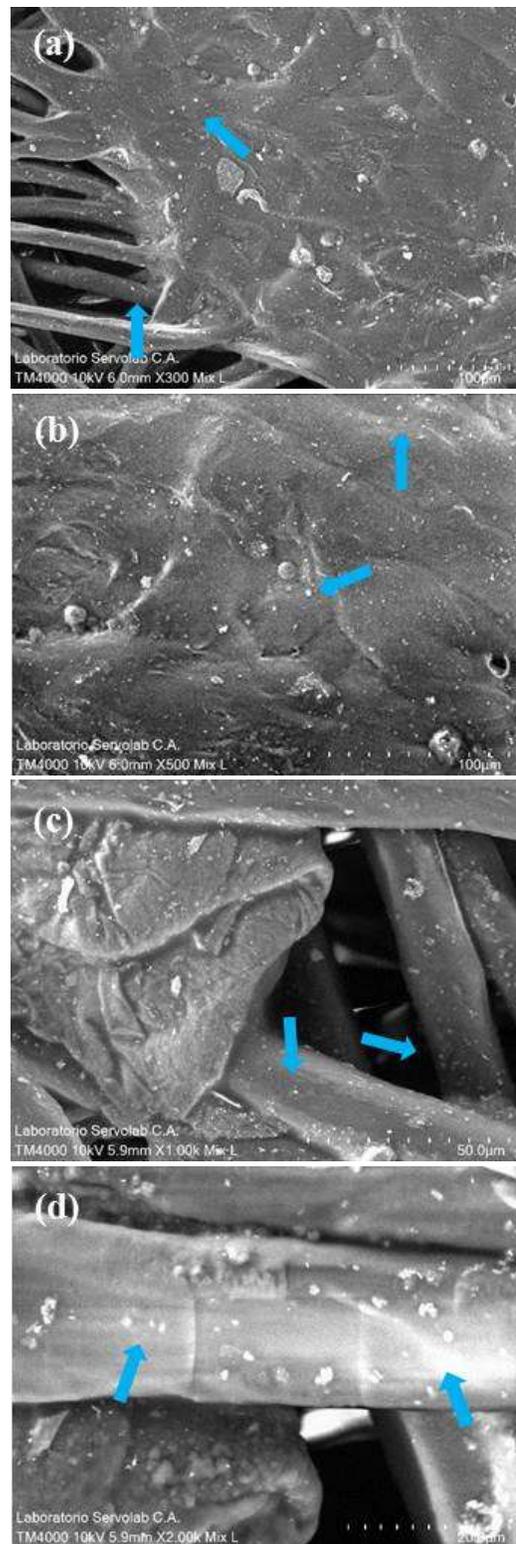


Fig. 7. Imágenes de MEB de una mascarilla con 48 horas de uso, obtenidas con combinación de detectores de SE y BSE a: (a) 300X, (b) 500X, (c) 1000X y (d) 2000X.

La pandemia causada por SARV-Co2 deja evidencia que el uso de mascarillas faciales por periodos prolongados aumenta el crecimiento de la microbiota bucal sobre ellas, la cual, además de contribuir al desarrollo de enfermedades como la caries y abscesos periodontales, pueden desencadenar enfermedades severas como: tumores, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, bacteriemia, entre otros [10,11]. Considerando que las secciones de mascarillas evaluadas en este trabajo correspondieron a las que están en contacto con la cara de los voluntarios, las formas observadas por MEB corresponden a las provenientes de la microbiota bucal y no provenientes del ambiente. Se debe recordar que las mascarillas faciales del tipo quirúrgico poseen una malla interna que actúa como barrera viral y bacterial.

En este trabajo se pudo evidenciar que las bacterias de la orofaríngea pueden acumularse en la capa interna del tapaboca, a medida que aumentaban las horas de uso del mismo. Este hallazgo es relevante, en el sentido que los microorganismos que causan enfermedades, principalmente, lo hacen de forma sinérgica o mediante cooperación [14].

Con respecto al morfotipo la forma cocoide fue la más prevalente, aspecto que permite sospechar de los géneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veionella*, *Parvula* y *Neisseria* que se encuentra en una alta proporción en la saliva [15].

La mayoría de las comunidades bacterianas tienen la propiedad de desarrollarse como una capa de bacterias adheridas a una superficie, conocida como biopelícula [14], tales interacciones entre especies dentro de la comunidad orofaríngea, juegan un papel importante en el establecimiento de enfermedades. Como proyección de este trabajo se pueden seguir estudios microscópicos, que además de la visualización de las biopelículas, permitan conocer su composición química y obtener información sobre los cambios generados por los distintos microorganismos presentes en ella.

CONCLUSIONES

En el análisis de los distintos tiempos, a medida que aumenta el tiempo de uso de la mascarilla, se observa un aumento en la presencia de estructuras compatibles con bacterias, especialmente de formas cocoides. No se puede señalar la especie en ningún caso, para eso se deberían hacer cultivos bacterianos o aplicar una técnica como MALDI -TOF para determinar los microorganismos en masa. Se presume que los distintos morfotipos observados en la parte interna de la mascarilla, pertenecen a la microbiotaorofaríngea del individuo. Si bien es cierto que las mascarillas faciales descartables ofrecen protección contra el contagio de infecciones como las del COVID-19, su uso prolongado puede conllevar a riesgos de salud de la persona que las usa, ante el crecimiento de la flora bacteriana en la malla inmediatamente en contacto con la boca del individuo, ya que sobre estas mascarillas pueden proliferar especies, tales como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus*, bacterias predominantes en la microbiota orofaríngea y que su aumento en la cavidad bucal son conocidas como causantes de diversas afecciones en los seres humanos. Incluso con hongos, como la *Candida*, que tiene una acción neutral cuando la microbiota orofaríngea es normal, pero que puede atacar el tejido bucal si este equilibrio de la microbiota es roto. De tal manera que un uso prolongado de las mascarillas puede acarrear que microorganismos (entre bacterias y hongos) presentes en la microbiota orofaríngea, se depositen y crezcan sobre las mascarillas y hagan que desequilibren esta misma microbiota, afectando, por lo tanto, la salud de los individuos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los organizadores del XIX Congreso Venezolano de Microscopía y Microanálisis (CONVEMI 2021) por la aceptación y difusión de este trabajo en dicho congreso.

REFERENCIAS

- [1] Anderson R.M., Heesterbeek H., Klinkenberg D., Hollingsworth T.D. (2020) "How will country-based mitigation measures influence the course of the COVID-19 epidemic?" *The Lancet* 395(10228):931-934.
- [2] Li R., Zhang M., Wu Y., Tang P., Sun G., Wang L., Mandal S., Wang L., Lang J., Passalacqua A., Subramaniam S., Song G. (2021) "What We Are Learning from COVID-19 for Respiratory Protection: Contemporary and Emerging Issues" *Polymers* 13(23):4165.
- [3] Chu D.K., Akl E.A., Duda S., Solo K., Yaacoub S., Schünemann H.J. (2020) "Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis" *The Lancet* 395(10242):1973-1987.
- [4] González C., E., Díaz C.A., Gómez A., D.H., Rivera R., F.E., Nicolás, M.A. (s.f.) "Bioseguridad en el uso de mascarillas y respiradores" Recuperado de: https://www.ifcc.org/media/479029/div_2021-06_07_mascarillas.pdf
- [5] World Health Organization (WHO) "Advice on the Use of Masks in the Context of COVID-19" (Geneva, Switzerland, 2020). Recuperado de: [https://www.who.int/publications/i/item/advice-on-the-use-of-masks-the-community-during-home-care-and-in-health-care-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-outbreak](https://www.who.int/publications/i/item/advice-on-the-use-of-masks-the-community-during-home-care-and-in-health-care-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-(2019-ncov)-outbreak)
- [6] Worby C.J., Chang, H.H. (2020) "Face mask use in the general population and optimal resource allocation during the COVID-19 pandemic" *Nature communications* 11(1):4049.
- [7] Barbosa M.H., Graziano K.U. (2006) "Influence of wearing time of disposable surgical masks as microbial barrier" *Braz. J. Microbiol.* 37(3):216-217.
- [8] Davies A., Thompson K.A., Giri K., Kafatos G., Walker J., Bennett A. (2013) "Testing the efficacy of homemade masks: would they protect in an influenza pandemic?" *Disaster Med Public Health Prep* 7(4):413-418.
- [9] Kim M.C., Bae S., Kim J.Y., Park S.Y., Lim J.S., Sung M., Kim S.H. (2020) "Effectiveness of surgical, KF94, and N95 respirator masks in blocking SARS-CoV-2: a controlled comparison in 7 patients" *Infect Dis* 52(12):908-912.
- [10] Lamont R.J., Koo H., Hajishengallis G. (2018) "The oral microbiota: dynamic communities and host interactions" *Nat Rev Microbiol* 16(12):745-759.
- [11] Lu M., Xuan S., Wang Z. (2019) "Oral microbiota: A new view of body health" *Food Sci Hum Wellness* 8(1): 8-15.
- [12] Zhiqing L., Yongyun C., Wenxiang C., Mengning Y., Yuanqing M., Zhenan Z., Haishan W., Jie Z., Kerong D., Huiwu L., Fengxiang L., Zanjing Z. (2018) "Surgical masks as source of bacterial contamination during operative procedures" *J Orthop Translat* 14:57-62.
- [13] Delanghe L., Cauwenberghs E., Spacova I., De Boeck I., Van Beeck W., Pepermans K., Claes I., Vandenneuvel D., Verhoeven V., Lebeer S. (2021) "Cotton and Surgical Face Masks in Community Settings: Bacterial Contamination and Face Mask Hygiene" *Front Med* 8:732047.
- [14] Bermúdez L., Gonzalez M. (2016) "La biopelícula una nueva concepción de la placa dentobacteriana" *Medicentro Electronica* 20(3):167-175.
- [15] Quintana S., Sjoström P., Socarras D., Mazón G. (2017) "Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal" *Rev Cubana de Estomatol* 54(1):84-99.