



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Control microbiológico ambiental

Carmen Martín Salas, Igberto J. Tordoya Titichoca y Carmen Ezpeleta Baquedano*

Servicio de Microbiología Clínica, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, España

RESUMEN

Palabras clave:

Líquidos de diálisis
Endotoxinas
Quirófano
Cultivo aire ambiental

El control microbiológico ambiental es necesario para evitar infecciones relacionadas con determinados procedimientos que se llevan a cabo en el hospital. En esta revisión se abordan los procedimientos de control del agua y líquidos en las unidades de diálisis y de aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos. Las guías de gestión de calidad del líquido de diálisis definen los niveles máximos de contaminación química, microbiológica y de endotoxinas tanto del agua purificada como del líquido de diálisis. El control microbiológico del agua y del líquido de diálisis debe incluir la detección de microorganismos y de los niveles de endotoxinas. Respecto al control microbiológico del aire de los quirófanos y unidades de inmunodeprimidos, en esta revisión se definen los tipos de salas limpias en los que hay que realizar controles microbiológicos del aire; los métodos de recogida de muestras; los medios de cultivo y las condiciones de incubación; los microorganismos más frecuentes, y los niveles admisibles según el tipo de quirófano.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Environmental microbiological control

ABSTRACT

Keywords:

Dialysis fluids
Endotoxins
Operating room
Microbiological air sampling

The environmental microbiological control is necessary to prevent infections associated with certain procedures that are performed at the hospital. In this review the procedures for control of water and dialysis fluids, and air in operating rooms and immunocompromised units are addressed. The dialysis quality management guidelines define the highest levels of chemical, microbiological and endotoxin in purified water and dialysis fluids based on the recommendations of scientific societies. The microbiological control of water and dialysis fluids should include detection of microorganisms and endotoxin levels. Regarding the microbiological air sampling of operating rooms and immunocompromised units the types of clean rooms in which is recommended to perform microbiological air monitoring; the sample collection methods; culture media; incubation conditions; the most common microorganisms, and permissible levels depending on the type of surgery are described.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Control microbiológico ambiental

El control microbiológico ambiental es necesario para evitar infecciones relacionadas con determinados procedimientos que se llevan a cabo en el hospital. En esta revisión se abordan los procedimientos de control del agua y líquidos en las unidades de diálisis y de aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos.

Control microbiológico del agua y líquidos de diálisis

El líquido de diálisis (LD) es una solución electrolítica isotónica constituida por agua purificada y solutos. El LD es preparado en el momento por el equipo de hemodiálisis y tiene una composición electrolítica similar al plasma¹⁻³. El agua potable empleada para consumo humano no puede utilizarse para la preparación del LD; es necesario someterla a un proceso de purificación. Este tratamiento va a depender de diferentes factores entre los que cabe destacar la calidad del agua suministrada por la red pública de abastecimiento y el grado de pureza del agua y del LD que se quiera alcanzar.

Durante la hemodiálisis, el LD entra en contacto con la sangre del paciente a través de la membrana semipermeable del dializador, por

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cezpeleb@navarra.es (C. Ezpeleta Baquedano).

lo que su pureza y calidad es esencial. El control de la calidad del agua purificada y del LD es un proceso complejo en el que es necesario evaluar cuidadosamente todos los elementos que intervienen en su producción, distribución y almacenamiento para minimizar el riesgo de contaminación química y microbiológica¹. Las guías de gestión de calidad del LD establecen recomendaciones sobre los estándares necesarios para la preparación del LD incluyendo el agua, los concentrados y los sistemas que intervienen para su elaboración, y definen los niveles máximos de contaminación química, microbiológica y de endotoxinas tanto del agua purificada como del LD. El control microbiológico del agua y del LD debe incluir la detección de microorganismos y endotoxinas.

Esta revisión aborda los diferentes aspectos relacionados con el control microbiológico del agua y del LD, incidiendo fundamentalmente en: a) la selección de los medios de cultivo más adecuados y sus condiciones de incubación; b) los métodos de detección de endotoxinas, y c) los criterios de interpretación de los resultados.

Recogida de muestras y periodicidad del muestreo

No existe un estándar internacional que determine la frecuencia del análisis ni la cantidad de agua y LD que debe recogerse para evaluar su calidad microbiológica. Debido a esto, cada centro debe establecer un protocolo consensuado que establezca la periodicidad, la metodología, el control de calidad y las responsabilidades de estos controles^{2,3}.

Los controles microbiológicos del agua y del LD deberán realizarse semanalmente durante los 2 primeros meses de puesta en marcha de la unidad de hemodiálisis (fase de validación), después de una reparación importante del sistema de tratamiento de agua o tras la detección de niveles elevados de contaminación. Durante el funcionamiento rutinario de la unidad de hemodiálisis o fase de mantenimiento se realizarán como mínimo mensualmente. Los controles del nivel de endotoxinas se realizarán mensualmente tanto en la fase de validación como en la de mantenimiento¹⁻³.

El muestreo para la realización de cultivos microbiológicos en la fase de validación debe incluir: el agua de aporte o bruta; el agua descalcificada; el agua tratada a la salida de la ósmosis en el punto más próximo al final del anillo de distribución, al menos en el 10% de los monitores de la toma de agua, y el LD en la entrada al dializador y del drenaje con un mínimo de 2 monitores. En la fase de mantenimiento no es necesario tomar muestras de la zona de pretratamiento, excepto si se detecta contaminación significativa del agua tratada.

Para la detección de endotoxinas se requieren muestras del agua tratada a la salida de la ósmosis en el punto más próximo al final del anillo de distribución, al menos en el 10% de los monitores de la toma de agua, y del LD a la entrada al dializador con un mínimo de 2 monitores. La recogida de la muestra se debe realizar al comienzo de la sesión de diálisis¹⁻³ y la elección de los monitores debe hacerse de forma rotatoria para garantizar que todos se han sometido a un control microbiológico correcto.

El punto de muestreo no debe limpiarse previamente con desinfectantes del tipo hipoclorito, pero puede utilizarse alcohol al 70%, permitiendo después su evaporación completa. También se recomienda el uso de guantes estériles y, si se emplean instrumentos para abrir la válvula de seguridad, han de haberse esterilizado previamente. En cada punto de muestreo del agua de diálisis, esta se debe dejar correr durante un intervalo de tiempo controlado (1-2 min) o, preferiblemente, hasta que drene una cantidad fija (1 l), ya que la primera parte suele tener una carga bacteriana sensiblemente superior¹⁻³.

La muestra de agua y de LD debe recogerse en un recipiente estéril siguiendo la sistemática habitual de la toma de muestras para microbiología: asepsia, etiquetado, etc.^{2,3}. Además, para la detección de endotoxinas es imprescindible que el recipiente estéril sea libre de pirógenos y sin capacidad adsorptiva para las endotoxinas¹. La canti-

dad de muestra que debe recogerse va a depender de los procedimientos microbiológicos que se van a realizar: cultivo mediante extensión en superficie, dilución en agar o filtración a través de membrana, detección de endotoxinas, pero puede oscilar entre 5 y 1.000 ml.

Una vez recogida, la muestra debe enviarse inmediatamente a microbiología para su procesamiento y así garantizar la obtención de resultados exactos y fiables^{2,3}. Si esto no es posible, la muestra debe refrigerarse a 4 °C (entre 3-6 °C) durante un máximo de 24 h hasta la realización del cultivo. Para la detección de endotoxinas, las muestras deben procesarse lo antes posible o conservarse congeladas a -20 °C^{1,4}.

Procesamiento de la muestra

Cultivo

La mayoría de los microorganismos detectados en el agua de diálisis son bacilos gramnegativos no fermentadores de glucosa de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacter* y *Moraxella*, entre otros. Con menor frecuencia se detectan bacilos grampositivos, principalmente *Corynebacterium* y enterococos. Los hongos no son raros en el agua de diálisis, aunque su cantidad es más baja que en las bacterias. Los hongos más frecuentemente aislados son *Candida parapsilosis* y hongos filamentosos dematiáceos¹⁻³.

El recuento de bacterias viables es una de las técnicas más utilizadas para verificar la calidad del tratamiento del agua y del LD. El número de bacterias viables, capaces de reproducirse, se determina cultivando una cantidad conocida de agua y de LD en un medio de cultivo sólido y contando el número de colonias visibles. El número de colonias se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC) y depende del volumen de líquido inoculado, de la composición del medio de cultivo utilizado, de la temperatura y del tiempo de incubación.

Los 2 medios de cultivo recomendados son el TSA (Tryptic Soy Agar) y el R2A (Reasoner's 2-Agar)¹⁻³. El medio TSA es el medio de referencia recomendado por las normas más antiguas para los estudios de cuantificación bacteriana en agua y LD². El medio R2A es un agar pobre en nutrientes muy superior en cuanto a su capacidad para detectar microorganismos⁵. El medio R2A incubado a temperatura ambiente durante 14 días detecta mayor número de UFC que los medios más ricos incubados en cualquier temperatura³. El agar sangre no está recomendado, aunque hay estudios que sugieren un rendimiento similar al del TSA^{2,3}.

Actualmente se recomienda la utilización del medio TSA con una incubación de 48 h a 37 °C y del medio R2A con una incubación de 5-10 días a 20-25 °C en aerobiosis^{2,3}. Las guías de gestión de calidad del LD de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) recomiendan emplear el medio TSA incubado durante 5 días a una temperatura de 30-35 °C y el medio R2A incubado a temperatura ambiente durante 7-14 días¹.

El recuento del número de colonias puede realizarse de 3 formas: extensión en superficie, dilución en agar y filtración a través de membrana.

Lo más frecuente es realizar una siembra en superficie utilizando un asa calibrada o una micropipeta para mayor exactitud, siendo necesario sembrar al menos 0,1 ml de agua o LD. Habitualmente se inocula cada placa con un volumen de 1 ml del agua o LD y se extiende con un asa angulada estéril sobre toda la superficie del medio. Una vez que el agar ha absorbido completamente el líquido inoculado, se invierten las placas para su incubación.

En el método de dilución en agar se incorpora un volumen de 1 ml del agua o LD a un agar licuado previamente, asegurándose de que queda homogéneamente mezclado.

Para la filtración a través de membrana se recomienda usar filtros de membrana con un diámetro de poro de 0,45 µ como máximo y

forzar el paso del líquido a través de la membrana con dispositivos de vacío conectados al portafiltras. El objetivo es detectar si hay microorganismos a concentraciones superiores a 0,1 UFC/ml, para lo que se debe filtrar una cantidad de 100 a 1.000 ml. La Real Farmacopea Española (RFE) recomienda lavar cada filtro 3 veces haciendo pasar por él 100 ml de un líquido adecuado, como es una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 cada vez. Si está validado, se pueden utilizar menos de 3 lavados. Los filtros de membrana se transfieren a medios adecuados para el recuento de bacterias y de hongos.

Una vez finalizado el período de incubación, en los 3 métodos se realiza un recuento del número de colonias visibles en la placa de agar, expresando los resultados en función del volumen de líquido inoculado (UFC/ml). Si se detectan altos niveles de contaminación, se debe modificar el volumen del líquido a sembrar y diluir las muestras, para cuantificar con mayor precisión.

No está recomendado identificar los microorganismos recuperados en cultivo, ya que no se ha demostrado que el significado clínico de los recuentos varíe en función de las especies presentes. La identificación solo se realizará en casos de sospecha de infección por esta vía. La RFE no establece límites de contaminación específicos para hongos, pero puede utilizarse un medio de cultivo específico para hongos (Sabouraud, 20-25 °C) y, de forma arbitraria, el recuento máximo tolerable de hongos se ha fijado en una cantidad 10 veces inferior a la de las bacterias^{1,2}.

Detección de endotoxinas

Las endotoxinas son moléculas complejas que se localizan en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y están constituidas principalmente por lipopolisacáridos (LPS). El LPS contiene una parte lipídica (lípidos A) e hidratos de carbono (polisacárido O y oligosacárido nuclear o *core*). La fracción lipídica del LPS (lípidos A) es la parte responsable de los mecanismos de toxicidad que desencadenan las endotoxinas. Las endotoxinas se liberan durante la división, lisis o muerte bacteriana y son termoestables, por lo que pueden acumularse y permanecer en el ambiente durante períodos prolongados.

La detección de endotoxinas debe realizarse en el control microbiológico de la calidad del agua y del LD por su capacidad para desarrollar una reacción a pirógenos en el paciente. La reacción a pirógenos en hemodiálisis se define como la aparición de escalofríos y/o fiebre en un paciente previamente afebril, sin signos ni síntomas de infección antes de la sesión de diálisis. Se puede acompañar de cefalea, malestar general, mialgias, náuseas, vómitos e hipotensión. Los síntomas comienzan generalmente a los 30-60 min del inicio de la sesión y desaparecen al finalizarla⁶.

Las bacterias no atraviesan la membrana de diálisis, por lo que no van a acceder desde el LD a la sangre del paciente; sin embargo, las endotoxinas tienen capacidad para atravesar dicha membrana y no solo son responsables de la aparición de reacciones a pirógenos, sino que además condicionan una situación inflamatoria crónica, con diversidad de manifestaciones clínicas^{1,7}.

Además de las endotoxinas existe una amplia variedad de sustancias con capacidad para actuar como pirógenos, entre los que se encuentran el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano, entre otros. La detección y cuantificación de las endotoxinas en el agua purificada y el LD se realizará mediante el análisis del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL).

El análisis LAL puede realizarse utilizando diferentes métodos:

- El método de gelificación o Gel-Clot (Pyrosate®, Pyrotell®, Limulus ES-II) es un método semicuantitativo basado en la detección del proceso de gelificación que se produce como respuesta de los amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus* a la presencia de endotoxinas. La velocidad de este proceso de gelificación depende de la con-

centración de endotoxina, del pH y de la temperatura. Es el método más utilizado habitualmente.

- El método turbidimétrico está basado en la capacidad que tienen las endotoxinas para reaccionar con sustratos endógenos que se escinden generando turbidez.

- El método cromogénico es una modificación del anterior y se basa en la capacidad de las endotoxinas para reaccionar con sustancias que desarrollen color. Ambos métodos son cuantitativos.

En todos los métodos para determinar endotoxinas se utiliza una endotoxina de referencia internacional (*E. coli* 0113:H10K) que sirve como muestra patrón para las diferentes determinaciones.

Los resultados de la prueba LAL se expresan en unidades de endotoxinas (UE) o en unidades internacionales (UI), siendo ambas equivalentes (1 UE = 1 UI). Esta prueba solo es válida para detectar endotoxinas y no otro tipo de pirógenos¹.

Interpretación de los resultados

Las guías de gestión de calidad del LD de la SEN¹ establecen un nivel máximo admisible de recuento bacteriano y endotoxinas en el agua de diálisis y en el LD según las recomendaciones de distintas sociedades científicas.

En la mayoría de las guías y recomendaciones sobre agua y LD se mencionan 2 niveles de calidad. El primero, denominado estándar, indica las concentraciones máximas de contaminantes en el agua y LD aceptables para las modalidades de hemodiálisis convencional. El segundo nivel es el que corresponde al agua y LD denominados altamente purificados o ultrapuros, mucho más exigente y que actualmente se recomienda para todo tipo de hemodiálisis⁸.

Según establecen las recomendaciones de la RFE, la Farmacopea Europea (FE), la guía de la SEN y la European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA), en el agua de diálisis la contaminación bacteriana máxima admisible debe ser < 100 UFC/ml y la concentración de endotoxinas < 0,25 UE/ml⁹⁻¹¹. El agua altamente purificada o ultrapura debe contener < 10 UFC/100 ml (< 0,1 UFC/ml) determinado por filtración con membrana con un mínimo de 200 ml de agua altamente purificada y el nivel de endotoxinas debe ser < 0,03 UE/ml^{1-3,10}.

La guía de la SEN propone que en el LD la contaminación bacteriana máxima admisible debe ser < 1.000 UFC/ml y la concentración de endotoxinas < 0,5 UE/ml. En el LD ultrapuro predializador estos valores son < 10 UFC/100 ml (< 0,1 UFC/ml) y < 0,03 UE/ml respectivamente. La RFE y la FE no establecen unos límites de contaminación para el LD, pero la AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) y la norma UNE consideran tolerables recuentos de hasta 2.000 UFC/ml. Para el LD se ha escogido la cifra de 1.000 UFC/ml por ser un nivel de contaminación que se relaciona con la aparición de biofilm, lo que representa un gran problema de contaminación por ser fuente de endotoxinas y de difícil eliminación¹. La tendencia actual es tratar que el LD se mantenga al mismo nivel de pureza que el agua de diálisis (100 UFC/ml)¹.

Generalmente, el LD presenta recuentos mayores que el agua de diálisis, ya que, por ejemplo, el concentrado de bicarbonato es más susceptible a la contaminación microbiológica, pudiendo ser el origen de bacteriemias y reacciones a pirógenos¹⁻³. El control bacteriológico de los concentrados para diálisis es complejo y no está estandarizado, pues los microorganismos que se aíslan son difícilmente cultivables y requieren medios pobres en nutrientes con bicarbonato o cloruro sódico^{2,3}.

Control microbiológico del aire de quirófano y unidades de inmunodeprimidos

El control microbiológico del aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos es indispensable para asegurar la calidad de los

procesos llevados a cabo en su interior y proteger al paciente de posibles infecciones por microorganismos ambientales. También es una herramienta útil para supervisar las prácticas de limpieza y desinfección de rutina al proporcionar datos de referencia.

En esta sección se revisan en primer lugar las condiciones de construcción y ventilación que deben cumplir los locales en los que está indicada la vigilancia microbiológica del aire, los microorganismos más frecuentes y, por último, el papel que desempeña un servicio de microbiología en el control y mantenimiento de las condiciones óptimas de funcionamiento de estos locales.

Clasificación de los locales o salas limpias

En un hospital existen diferentes tipos de exigencias con respecto a la presencia de gérmenes en el aire impulsado y en el ambiente. Para este fin, los locales de un hospital se dividen en 2 clases:

- Clase de local I: con exigencias muy elevadas. Dentro de los locales de clase I se encuentran:
 - Quirófanos y salas anexas.
 - Habitaciones para pacientes inmunodeprimidos.
- Clase de local II: con exigencias habituales. Por ejemplo, habitaciones con camas de los servicios de enfermedades infecciosas, medicina intensiva, recién nacidos, fisioterapia, etc.¹².

La retención de las impurezas contenidas en el aire en forma de partículas sólidas y líquidas requiere la instalación de un sistema de acondicionamiento de aire con varios niveles de filtración según la clase de local a proteger, en concreto:

- Dos niveles de filtración para locales de clase II.
- Tres niveles de filtración para locales de clase I.

El primer nivel de filtración debe encontrarse en la toma de aire exterior; el segundo después de la unidad de tratamiento de aire y al comienzo del conducto de impulsión, y el tercero lo más cerca del local que hay que tratar. En el caso de locales de clase I, en la propia unidad terminal de impulsión de aire. Los niveles de filtración deben estar constituidos como mínimo por filtros de clase F5, F9 y H13 para los 3 niveles de filtración respectivamente¹².

Según el tipo de cirugía que se realiza dentro de los quirófanos, estos se clasifican en 3 clases:

- Quirófanos de clase A: trasplantes de corazón, pulmón e hígado; cirugía cardíaca extracorpórea y aórtica; cirugía ortopédica con prótesis.
- Quirófanos de clase B: cirugía convencional y de urgencias.
- Quirófanos de clase C: intervenciones ambulatorias; partos¹³.

Los quirófanos de tipo A y las unidades de oncohematología se encuentran clasificados dentro de las áreas hospitalarias de muy alto riesgo; los quirófanos de tipo B como áreas de alto riesgo, y los de tipo C como áreas de riesgo intermedio. El nivel de limpieza del ambiente recomendado para cada una de estas áreas se clasifica a su vez como: ambiente muy limpio, ambiente limpio y ambiente aceptable^{14,15}. El control microbiológico del aire estaría indicado especialmente para las áreas de muy alto riesgo y las de alto riesgo¹⁴.

La instalación de aire acondicionado en salas limpias —con los 3 niveles de filtración recomendados para locales de clase I y el número de renovaciones del aire con un caudal mínimo de aire impulsado al interior de estos— permite reducir la concentración de sustancias contaminantes dentro de estos ambientes (p. ej., polvo, gases narcóticos, sustancias odoríferas) y, sobre todo, los microorganismos contenidos en el aire del medio ambiente exterior, que son objeto de esta revisión.

Microorganismos implicados

Los microorganismos que más frecuentemente están implicados en la contaminación de las salas limpias son los hongos. Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y su concentración en determinados lugares cambia con las condiciones ambientales o las características propias del microorganismo.

Los hongos colonizan un material dado cuando sus esporas germinan y sus hifas y micelios crecen en o sobre el material. Este crecimiento por lo general termina con una producción masiva de esporas. La formación de esporas es importante para la supervivencia, replicación y dispersión de los hongos. Asimismo, son las partículas fúngicas más frecuentes suspendidas en el aire. Debido a su tamaño, las esporas pueden permanecer en la atmósfera durante un largo tiempo y desplazarse a enormes distancias utilizando las corrientes de aire. El tamaño de las esporas oscila entre 2 y 56 µm dependiendo del tipo de especie¹⁶.

La principal vía de entrada de los hongos en el cuerpo humano es la respiratoria. La inhalación de esporas, fragmentos de hifas y alérgenos producidos por los hongos se debe particularmente a su reducido tamaño. Otras vías de contagio menos frecuentes son la ingestión y el contacto directo.

Se han descrito brotes nosocomiales de enfermedad fúngica relacionados con obras de construcción o de renovación, así como con sistemas de ventilación averiados o contaminados. Sin embargo, la mayoría de los casos de enfermedad fúngica nosocomial son esporádicos y el mayor problema es determinar si estas infecciones se adquieren dentro o fuera del ámbito hospitalario¹⁷.

La aspergilosis es la enfermedad oportunista más significativa en pacientes inmunocomprometidos. Esta infección micótica es causada principalmente por *Aspergillus fumigatus* y, en menor grado, por *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* y *A. terreus*. Otros hongos causantes de infecciones respiratorias son *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* y *Fusarium*¹⁸. En estudios realizados en quirófanos también se observa que el género *Aspergillus* es el que se aísla con mayor frecuencia¹⁹.

Dentro de los microorganismos que hay que determinar en los controles de microbiología de las salas limpias, además de los hongos citados, se encuentran también los microorganismos mesófilos aerobios¹⁴.

Toma de muestras

Se utiliza como referencia el denominado muestreador de impacto. En los quirófanos y áreas sin sistema de filtración completo no se debe realizar ningún muestreo de validación, ya que los resultados no pueden dar ninguna seguridad y, por tanto, no se justifican.

Se deben tomar medidas basales de las zonas circundantes del área que se va a controlar con el fin de valorar los resultados y poder establecer posibles orígenes de la contaminación, si se presentara. Se debe tener en cuenta la clasificación de la sala, el tipo de filtración y el flujo de aire. Se obtiene una mayor recuperación a caudales bajos de 0,5 l/s, por lo que es necesario disminuir caudales en zonas limpias, pudiéndose aumentar el volumen seleccionado a muestrear. El volumen a muestrear, seleccionando el caudal de 0,5 l/s, es de 1.000 l en 1 toma o en 2 tomas de 500 l.

Con caudales mayores de 0,5 l/s, los recuentos negativos no implican ausencia de flora, sino que se consideraría que “el número real de UFC/m³ está por debajo del límite de detección del método empleado”. Se tomará una muestra en el área crítica a proteger (p. ej., sobre la mesa quirúrgica en un quirófano). Hay que evitar interferencias directas de ventiladores de equipos informáticos o similares¹⁴.

El muestreador de aire se limpiará cada vez que se tome una muestra. Las placas de agar deben estar a temperatura ambiente antes del muestreo. Utilizando una técnica aseptica, se procederá a colocar las placas de agar en el cabezal del muestreador y se procederá

de la misma forma al retirar las placas de agar finalizada la toma de muestra. Una vez recogida la muestra, debe enviarse inmediatamente a microbiología especificando quirófano, volumen de aire muestreado, fecha y hora²⁰.

Las condiciones de funcionamiento de las salas limpias al tomar una muestra pueden ser:

- Dispuesta para funcionar.
- Funcionamiento en vacío.
- Funcionando.

Se ha de tener en cuenta que la condición “dispuesta para funcionar” es aplicable a salas limpias o zonas anexas nuevas o renovadas. Cuando la comprobación en la condición “dispuesta para funcionar” se ha terminado se ha de continuar realizando pruebas para comprobar la conformidad en las condiciones de funcionamiento, “funcionamiento en vacío” o “funcionando”²¹.

Medios de cultivo y condiciones de incubación

• Cultivo de hongos filamentosos: se recomienda un medio selectivo como la placa de Sabouraud con cloranfenicol y gentamicina. Se incubará a 30 °C o 37 °C durante 7 días en estufa convencional con lectura diaria.

• Recuento de aerobios: se utilizará una placa de agar sangre que se incubará a 35-37 °C durante 48 h en estufa convencional².

Identificación de microorganismos

• Hongos: los criterios de identificación son fundamentalmente morfológicos, basados en la observación macroscópica y microscópica del crecimiento detectado en las placas de agar:

– Examen macroscópico de la colonia: forma, color, textura, velocidad de crecimiento y reverso.

– Examen microscópico: se recomienda la técnica de Scotch® o papel de celofán, que consiste en tocar la superficie de la colonia con cinta adhesiva y colocarla sobre un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol y observarla al microscopio. Mejora ostensiblemente la visión microscópica si se añade, además, una gota de azul de lactofenol sobre el celofán y se deposita un cubre sobre ella²².

Frecuencia de toma de muestras microbiológicas

Los parámetros utilizados en esta revisión se basan en la norma UNE 17340 de enero de 2012¹⁴. Cabe señalar que no existen normas acordadas internacionalmente para la toma de muestras de aire para control microbiológico²⁰. La frecuencia de los controles microbiológicos del aire recomendado en salas limpias es la siguiente:

- Control quincenal en zonas de aislamiento oncohematológico.
- Validación mensual en quirófanos de muy alto riesgo-tipo A.
- Validación trimestral en quirófanos de alto riesgo-tipo B.
- Validación previa a la puesta en marcha. Validación tras reformas.
- Validación tras corrección de anomalías.
- Validación tras cambio de filtros absolutos.
- Control extraordinario en caso de obras cercanas, o de epidemia de origen en área controlada.

Criterios para la interpretación de resultados¹⁴

- Para el cultivo de hongos filamentosos los valores admisibles son de 0 UFC/m³.
- Para recuento de aerobios los valores de bioseguridad admisibles dependen del tipo de quirófano:

- Ambiente muy limpio: < 10 UFC/m³.
- Ambiente limpio: < 10-100 UFC/m³.
- Ambiente aceptable: 100-200 UFC/m³.

Información de los resultados²

En los informes debe figurar la información del quirófano o unidad de inmunodeprimidos de donde procede la muestra y en el caso del quirófano si se tomó con este vacío o durante la actividad quirúrgica.

Recuento de hongos: si el resultado es negativo por ausencia de colonias se realizarán informes provisionales durante la incubación y el informe definitivo a los 7 días. Si se obtiene un resultado positivo con cualquier número de colonias, es importante realizar un informe provisional rápido tras realizar las técnicas rápidas de identificación, indicando el recuento de colonias y el género del hongo independientemente de que se tarde más tiempo en la identificación definitiva del hongo a nivel de especie. Esta información precoz permitirá tomar decisiones rápidas sobre la actividad quirúrgica y diagnóstico del estado del quirófano en cuanto a sistema de ventilación, limpieza, etc.

Recuento de aerobios: se realizará un único informe a las 48 h indicando el número de UFC/m³.

Nota de los autores

Posteriormente al envío de este artículo, la Sociedad Española de Nefrología ha publicado una actualización de las Guías de gestión de calidad del líquido de diálisis: Pérez-García R, García Maset R, González Parra E, Solozábal Campos C, Ramírez Chamond R, Martín-Rabadán E, et al; Comisión de Expertos de la Sociedad Española de Nefrología para la creación de la Segunda Edición de la Guía de Gestión de Calidad del Líquido de Diálisis. Guía de gestión de calidad del líquido de diálisis (LD) (segunda edición, 2015). *Nefrología.* 2016;36:e1-52.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Pérez García R, González Parra E, Ceballos F, Escallada Coter R, Gómez-Reino MI, Martín-Rabadán P, et al. Guías de gestión de calidad del líquido de diálisis (LD). *Nefrología.* 2004;24 Supl 2:1-42.
2. Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Control microbiológico ambiental. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2012.
3. Ezpeleta-Baquedano C, Barrios-Andrés JL, Delgado-Iribarren García-Campero A. Control microbiológico ambiental. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:396-401.
4. Pérez García R, Rodríguez Benítez P. Tratamiento del agua para hemodiálisis. En: Lorenzo-Sellarés V, López-Gómez JM, editores. *Nefrología al día.* 2.ª ed [consultado 8-9-2015]. Barcelona: Sociedad Española de Nefrología; 2012. Disponible en: <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-articulo-tratamiento-del-agua-hemodialisis-XX342164212000254>
5. Van der Linde K, Lim BT, Rondeel JM, Antonissen LP, De Jong GM. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic Soy Agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:2433-7.
6. Torregrosa I, Pérez A, Giménez M. Tratamiento del agua para hemodiálisis. *Nefrología.* 1998;18:14-21.
7. Álvarez Aldecoa M. Control de calidad del líquido de diálisis y agua tratada. *Enferm Nefrol.* 2012;15 Supl 1:28.
8. Pérez-García R. Papel del líquido de hemodiálisis en la inflamación de los pacientes. *Dial Trasl.* 2007;28:123-5.
9. European Pharmacopoeia. Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting [consultado 22-9-2011]. 3rd ed. Supplement 2001: Monograph 1997:1167. Corrected 2000. Disponible en: www.pheur.org
10. European Pharmacopoeia. Solutions for haemodialysis [consultado 22-9-2011]. 3rd ed. Supplement 2001: Monograph 2000:0128. Disponible en: www.pheur.org
11. European best practice guidelines for haemodialysis (part 1). Section IV. Dialysis fluid purity. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 7:45-62.
12. Norma UNE 100713. Instalaciones de acondicionamiento de aire en hospitales. AENOR, septiembre de 2005.

13. Pi Sunyer MT, Alonso-Echánove J. Medidas de control y evaluación de la infección de herida quirúrgica. En: Guirao Garriga X, Arias Díaz J, editores. Guías clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. Infecciones quirúrgicas. Madrid: Aran; 2006.
14. Norma UNE 17340. Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales. AENOR, enero de 2012.
15. Fernández Antolí MP. Programa de control de bioseguridad ambiental en áreas de ambiente controlado en hospitales. *Biotecnología Hospitalaria*. 2013;12:45-55.
16. Viegas C, Brandão J. Dispersion forms. En: Viegas C, Pinheiro C, Sabino R, Viegas S, Brandão J, Veríssimo C, editors. *Environmental Mycology in Public Health*. 1st ed. Waltham: Academic Press, Elsevier; 2015. p. 17-23.
17. Clemons KV, Richardson MD. Pathways and routes of natural exposure to fungal infection. En: Viegas C, Pinheiro C, Sabino R, Viegas S, Brandão J, Veríssimo C, editors. *Environmental Mycology in Public Health*. 1st ed. Waltham: Academic Press, Elsevier; 2015. p. 65-76.
18. Méheust D, Le Cann P, Reboux G, Millon L, Gangneux JP. Indoor fungal contamination: Health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit Rev Microbiol*. 2014;40:248-60.
19. Caggiano G, Napoli C, Coretti C, Lovero G, Scarafile G, De Giglio O, et al. Mold contamination in a controlled hospital environment: a 3-year surveillance in southern Italy. *BMC Infect Dis*. 2014;14:595.
20. Microbiological air sampling of operating rooms in Western Australian Healthcare Facilities. Sydney: Government of Western Australia. Department of Health; 2015.
21. Norma UNE-EN ISO 14644-1. Salas limpias y locales anexos. Parte 1: Clasificación de la limpieza del aire. AENOR, febrero de 2000.
22. Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2006.