

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



74.

Control microbiológico ambiental de salas blancas
(células humanas, productos farmacéuticos,
reproducción asistida)

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinadora

María Pía Roiz Mesones

Autores

Pilar Egea Miranda
Virginia Rodríguez Garrido
Patricia Ruiz Garbajosa
María Pía Roiz Mesones



ISBN: 978-84-09-35295-1

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Egea Miranda P, Rodríguez Garrido V, Ruiz Garbajosa P, Roiz Mesones MP. Control microbiológico ambiental de salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida). 2021. 74. Roiz Mesones MP (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2021.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

74. Control microbiológico ambiental de salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida).2021

Coordinador:

María Pía Roiz Mesones¹

Autores:

Pilar Egea Miranda²

Virginia Rodríguez Garrido³

Patricia Ruiz Garbajosa⁴

María Pía Roiz Mesones¹



Servicios de Microbiología. ¹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander; ²Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba; ³Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona; ⁴Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	5
2.	Normativa Vigente.....	6
3.	Términos y definiciones.....	7
4.	Gestión de las salas blancas.....	9
	4.1 Descripción y clasificación de las salas blancas.....	9
	4.2 Actividades que requieren la utilización de las salas de ambiente controlado.....	12
	4.3 Gestión arquitectónica y de infraestructuras. Diseño y construcción de las salas blancas....	13
	4.4 Gestión del personal.....	15
5.	Gestión del sistema de calidad: estrategias para el control de la contaminación.....	17
6.	Control microbiológico de las salas blancas.....	19
	6.1. Consideraciones clínicas.....	19
	6.2. Control microbiológico del aire.....	19
	6.2.1. Recogida de muestras.....	19
	6.2.2. Frecuencia del muestreo y puntos de toma de muestra.....	20
	6.2.3. Transporte y conservación de la muestra.....	21
	6.2.4. Procesamiento de la muestra.....	22
	6.2.5. Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	22
	6.2.6. Criterios de interpretación de resultados.....	23
	6.2.7. Información de resultados.....	23
	6.3 Control microbiológico de superficies.....	24
	6.3.1 Recogida de muestras.....	24
	6.3.2 Frecuencia del muestreo.....	25
	6.3.3 Transporte y conservación de la muestra.....	25
	6.3.4 Procesamiento de la muestra.....	25
	6.3.5 Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	26
	6.3.6 Criterios de interpretación de resultados.....	26
	6.3.7 Información de resultados.....	26
	6.4 Registros.....	27
7.	Bibliografía.....	27
	7.1 Referencias bibliográficas.....	27
	7.2 Documentos de consulta.....	27

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-SB-01. Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)

PNT-SB-02. Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de salas limpias tuvo su origen a finales del siglo XIX cuando microbiólogos y cirujanos descubrieron que las bacterias que contenía el aire de las salas de operaciones causaban numerosas infecciones y que estas se reducían de forma considerable cuando se realizaba la ventilación de la dependencia, se esterilizaba el material y se mantenían las medidas de higiene. La primera sala limpia moderna fue diseñada por Willis Whitfield, un físico norteamericano, en 1960 y consistió en integrar en la sala un flujo de aire constante muy filtrado, que expulsaba las impurezas al exterior (<https://www.invent.org/inductees/willis-whitfield>).

Las salas blancas son actualmente un elemento imprescindible en determinados procesos de producción e investigación. En los últimos años, en los hospitales, se ha incrementado el número de estas salas más allá de las salas destinadas a los quirófanos y habitaciones de pacientes inmunodeprimidos, de alto riesgo infeccioso o pacientes críticos. La expansión de las salas blancas a los Servicios de Farmacia (preparación de citostáticos, formulaciones parenterales), Unidades de Reproducción Asistida (preparación de embriones), Servicios de Medicina Nuclear (radiofármacos y gammatecas) y Bancos de Sangre y Tejidos (preparados celulares) es hoy una realidad en la rutina asistencial de nuestro Sistema de Salud. Este documento hará referencia al control microbiológico de las salas blancas de estas Unidades o Servicios.

Existe variabilidad en la terminología utilizada cuando se habla de las salas blancas. Así, podemos encontrar definiciones tales como *salas de ambiente controlado o entornos controlados limpios, salas blancas y salas limpias*. La sala de ambiente controlado está definida en la norma UNE EN ISO 171340 como “sala con las estructuras e instalaciones específicas para controlar la contaminación y los parámetros ambientales adecuados” y el *entorno controlado limpio* está definido en la norma UNE-EN 17141:2021 como “zona definida en la cual la contaminación microbiológica se controla con medios específicos” abarcando salas limpias, zonas limpias, zonas controladas, áreas limpias y espacios limpios. En realidad, en la mayoría de las ocasiones, los términos salas blancas y salas limpias se utilizan indistintamente en la literatura aunque hay documentación, de determinados fabricantes de la industria, que especifica que la diferencia entre ellas se encuentra en la pureza del aire, lo que determinaría los tipos de sistemas de ventilación y filtrado con los que cuentan (<https://iscleanrooms.com/es/faqs/cual-es-la-principal-diferencia-entre-sala-blanca-y-sala-limpia>). A efectos prácticos y dada la denominación indistinta reflejada en las normativas vigentes y bibliografía, utilizaremos en este documento los tres términos tal y como se refleja en todos los documentos de consulta utilizados.

Una sala blanca o sala limpia, es un área científicamente construida para trabajar en condiciones de asepsia, y está diseñada para garantizar la exclusión microbiana y prevenir la contaminación de materiales estériles, componentes y superficies en operaciones asépticas. Conjuntamente con la exclusión, debe conseguir una limitación microbiana en las zonas ocupadas próximas a operaciones asépticas¹. En la sala blanca se controla la concentración de partículas contenidas en el aire, pero además se deben controlar otros parámetros importantes como la temperatura, humedad y presión. La importancia de medir las partículas ambientales, reside en su capacidad de acumulación sobre las superficies debido a la gravedad y por la adherencia electrostática. En los líquidos, se adhieren a las burbujas de aire y también tienen la capacidad de adherirse a las paredes de conductos.

El objetivo pues de las salas blancas es limitar y controlar la concentración de partículas de diferentes tamaños en suspensión en el aire, los niveles de contaminación microbiana y mantener las condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad, iluminación, ruido), para conseguir en unos casos la protección y seguridad de las personas y, en el caso que nos ocupa, para proteger los productos fabricados de una posible contaminación.

2. NORMATIVA VIGENTE

Las instalaciones hospitalarias son equipamientos cuyo diseño, instalación, puesta en marcha y mantenimiento tienen repercusiones importantísimas en la salud de los usuarios de los centros hospitalarios. Por tanto, todo este proceso debe ser tratado con el máximo rigor.

La Organización Internacional de Normalización, más conocida como ISO, es el organismo que establece y controla las normas internacionales de fabricación para todas las áreas industriales, incluidas las salas blancas, con el objetivo de estandarización de las normas a nivel internacional. La normativa constructiva específica de Salas Blancas **es la serie de normas UNE-EN ISO 14644 Salas limpias y locales anexos controlados** sobre la que se basan un gran número de normativas relacionadas con las salas de ambiente controlado. En nuestro caso, las normativas y guías de obligada consulta a efectos de elaboración de este documento (además de la citada UNE-EN ISO 14644) son las que se especifican a continuación. Se ha de tener en cuenta, que la mayoría de las guías encontradas para consulta se refieren a instalaciones de los Servicios de Farmacia. Dadas sus estrictas condiciones y requisitos de control y procesamiento, se han tomado como base para todas las salas blancas de los diferentes Servicios Hospitalarios objeto de este documento.

- La validación y cualificación de las salas de ambiente controlado en los hospitales viene definida en la **UNE 171340:2020**.
- El control de la biocontaminación de las salas limpias y ambientes controlados viene definido en la recién publicada **UNE- EN 17141:2021** (sustituye a la ISO 14698).
- **Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles.** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (<https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/>)
- **Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria.** Dirección General de Cartera Básica del Servicios del SNS y Farmacia. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)
- **Guide to Good Manufacturing Practice for Medical Products. Part I and Part II.** Pharmaceutical Inspection Convention. Mayo 2021. (<https://picscheme.org>)

A continuación, se detalla la situación de las normativas de obligado cumplimiento para el control de calidad ambiental y de sistemas de climatización en España:

- **Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios (RITE)**, aprobado por Real Decreto 1751/1998, de 31 de julio cuya actualización más reciente ha sido publicada en el Real Decreto 178/2021, de 23 de marzo.
- **Real Decreto-Ley 9/2014, de 4 de julio**, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.
- Higienización de los sistemas de climatización: **UNE 100012:2005**.
- Diagnóstico de calidad ambiental interior: **UNE 171330-1:2008** (en revisión).
- Sistema de gestión de los ambientes interiores: **UNE 171330-3:2010**.
- Validación y cualificación de las salas de ambiente controlado en los hospitales incluyendo el laboratorio de reproducción asistida: **UNE 171340:2020**.

Todas las normas UNE se pueden conseguir en www.une.org

Otras normas y documentos de interés:

- IEC 31010:2019: Proporciona información sobre métodos de evaluación de riesgos para realizar la gestión del riesgo de calidad.
- European Commission EudraLex “The Rules Governing Medicinal Products in The European Union” Volume 4, EU Guidelines for Good Manufacturing Practice, Medicinal Products For Human And Veterinary Use.
- FDA Guidance for Industry-Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice.
- Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report N° 13- Fundamentals of an Environmental Monitoring Program.
- Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report N° 69 – Bioburden and Biofilm Management in Pharmaceutical Manufacturing Operations.
- Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report N° 70- Fundamentals of Cleaning and Disinfection Programs for Aseptic Manufacturing Facilities.
- Pharmaceutical Microbiology Manual. Pharmaceutical Inspection Convention. PI 007-6 “Recommendation on the Validation of Aseptic Processes.
- United States Pharmacopeia <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments.
- United States Pharmacopeia <1072> Disinfectants and Antiseptics. Code of Federal Regulations Title 21. Volume 8. Cite 21 CFR 820.70 – Production and Process Controls

3. TÉRMINOS Y CONDICIONES

Ambiente controlado: zona donde están controladas las fuentes de contaminación con la ayuda de medios específicos.

Área protegida o de trabajo: la que incluye la zona de trabajo y la zona de manejo de las sustancias, así como las placas estériles de cultivo de éstas, los equipos y demás materiales estériles para su manejo, así como la indumentaria del personal.

Contaminantes: toda entidad química, física o biológica susceptible de producir un efecto indeseable sobre el producto o método.

Esclusa: local o zona intermedia que se utiliza para entrar desde o hacia las salas de ambiente controlado y se utiliza para mantener la transferencia de aire contaminado de una zona a otra y que debe disponer de puertas de apertura no simultánea.

Instalación: sala limpia o una o varias zonas limpias juntamente con todos los procesos, sistemas de tratamiento de aire, servicios y medios de funcionamiento.

Instalación en funcionamiento: estado en el cual la instalación está funcionando en la manera especificada, con el número especificado de personas presentes y trabajando de la manera establecida.

Instalación en modo reposo operacional: instalación completa, con equipamiento instalado y en funcionamiento, pero sin personal presente.

Instalación en modo reposo *stand by*: instalación completa, con equipamiento instalado y en funcionamiento, pero sin personal presente y ajustada al mínimo para asegurar un grado aceptable de bioseguridad minimizando el consumo energético.

Macropartícula: partícula con un diámetro mayor de 5 µm.

Microorganismo de interés: contaminación microbiológica que ha sido identificada como dañina para el producto, para el proceso, o el destinatario previsto del producto dentro del entorno controlado limpio (el uso del término microorganismo en las normas de consulta, solo incluye bacterias, levaduras y mohos).

Microorganismo viable: microorganismo vivo, cultivable o no cultivable.

Muestreo microbiológico activo: muestreo del aire por medio de un equipo de aspiración que impacta sobre un medio de cultivo (agar) para determinar la carga microbiológica ambiental (ufc/m³).

Partícula: pieza diminuta de materia con límites físicos definidos.

Partícula viable: partícula que contiene uno o más microorganismos vivos.

Sala de ambiente controlado en hospitales: sala con las estructuras e instalaciones específicas para controlar la contaminación y los parámetros ambientales adecuados.

Sala blanca o limpia: local en el que se controla y se clasifica la concentración de partículas contenidas en el aire y que se diseña, construye y utiliza de forma que se controle la entrada, la producción y la retención de las partículas en el interior del local.

Tecnología del aislador³: tecnología de barrera que puede ser cualquier objeto material que separe o sirva de barrera u obstáculo físico de contención. En procesos farmacéuticos se considera barrera cualquier medio de protección incluyendo cortinas en las salas limpias, guantes, anteojos, máscaras faciales, cabinas de seguridad biológica, etc.

Unidad de tratamiento de aire (UTA): equipo ensamblado en fábrica que consiste en diversas secciones que contienen uno o varios ventiladores y los elementos necesarios para cumplir una o más de las siguientes funciones: mover, filtrar, purificar, calentar, enfriar, recuperar energía, humidificar, deshumidificar y/o mezclar el aire.

Unidad formadora de colonia (UFC): número mínimo de células microbianas que tras su multiplicación da lugar al desarrollo de una colonia visible sobre la superficie de un medio de crecimiento microbiológico semisólido.

Validación: proceso mediante el cual se obtienen pruebas documentales que demuestran que un proceso o actividad mantiene un nivel de cumplimiento deseado en todas las etapas y debe incluir como mínimo la documentación de los detalles del diseño, verificación del diseño, verificación de la instalación y cualificación de la misma.

Zona confinada: espacio dedicado exclusivamente a la preparación de medicamentos especiales o productos biológicos, equipado con un sistema de aire y filtración tal que impide la contaminación del medio ambiente externo por agentes procedentes del interior de la zona.

Zona crítica: espacio definido dentro de una sala de ambiente controlado que presenta una vulnerabilidad particular a la contaminación.

Zona limpia: espacio dedicado en el cual se controla y clasifica la concentración de partículas contenidas en el aire y que se diseña, construye y utiliza de forma que se controle la entrada, la producción y la retención de las partículas en el interior de la zona.

Zona periférica o de entorno: área en un ambiente controlado alrededor de una zona crítica.

Todas estas definiciones han sido recogidas de los documentos de consulta y la bibliografía.

4. GESTIÓN DE LAS SALAS BLANCAS

Cada sala blanca es diferente en su aplicación y merece un proyecto con características concretas, pero hay una serie de consideraciones a tener en cuenta en todas ellas. Aunque en una sala blanca la instalación de climatización es fundamental, su gestión comprende además aspectos constructivos y de acabados, el correcto diseño de los sistemas de acceso de personas y materiales, protocolos de funcionamiento del personal, procesos de limpieza y sistemas de control y validación. El proceso de validación debe realizarse por organismos de validación externos e internos, incluyendo cualificaciones previas a la puesta en marcha, postmantenimiento y anuales. Dentro de los parámetros ambientales que deben medirse con una frecuencia específica, se encuentran los parámetros específicos de microbiología.

4.1. DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS SALAS BLANCAS

Antes de proyectar una sala blanca siempre debe indicarse qué categoría se pretende conseguir y en qué sistema de clasificación. Existen numerosos sistemas de clasificación de las salas blancas siendo la clasificación ISO (regulada por la normativa ISO 14644-1) y la descrita en las normas de correcta fabricación NCF (Grados de A a D) de obligado cumplimiento en la industria farmacéutica tal y como ya se ha mencionado anteriormente. La estándar US FED STD 209E (Clases 1 a 1.000.000 ó M1 a M7) que ha sido de las más utilizadas, fue derogada a finales del 2001 por las autoridades americanas quedando sustituida a todos los efectos por la Norma ISO 14644. La norma UNE 171340:2020 hace una clasificación en función del posible riesgo de infección para el paciente.

Clasificación ISO. La medición de la contaminación del entorno es crucial en las salas blancas. La clasificación empleada por las normativas para las salas limpias toma como base la cantidad y tamaño de las partículas presentes en el ambiente tanto en estado de reposo como en operación. Dicha medición se realiza mediante contadores de partículas con tecnología láser. Dependiendo del número de partículas en suspensión por metro cúbico de aire permitidas en cada recinto, éstos se subdividen en nueve tipos diferentes (clasificación ISO). El tamaño límite de partícula a medir se sitúa dentro del rango de $\geq 0,1 \mu\text{m}$ a $5 \mu\text{m}$. La normativa que lo regula es la **ISO 14644-1**, sobre la cual está basada **La Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario (NCF)**.

Existe controversia en relación a la medición de partículas $>5 \mu\text{m}$ (<https://www.qualipharma.es/blog/nueva-clasificacion-particulas-salas-blancas>) ya que las normativas farmacéuticas consideran este tamaño como un elemento fundamental en la clasificación de zonas y procesos estériles por dos motivos: representa una alarma temprana sobre la posibilidad de un problema de contaminación ya que son capaces de transportar microorganismos y porque, aunque éstos en general tienen tamaños inferiores a $1 \mu\text{m}$, tienden a agruparse en *clusters* formando unidades con tamaños superiores a $5 \mu\text{m}$. Este aspecto es de importancia para los Grados A y B tanto en reposo como en operación. Sin embargo, se han suprimido estos tamaños de partículas cuando se detectan bajos límites de contaje ya que algunas pueden ser detenidas en el interior de los tubos de captación si estos son demasiado largos, con lo cual no llegarían a la óptica del contador o lo harían en momentos que no corresponden al muestreo del volumen de aire en el que estaban incluidas. No obstante, aunque en la ISO 14644-1 regula el tamaño límite de partícula a medir dentro del rango de $\geq 0,1 \mu\text{m}$ a $5 \mu\text{m}$, realizar contajes consecutivos o regulares de partículas $>5 \mu\text{m}$ es recomendable ya que la detección de bajos niveles de forma regular pueden indicar un fallo temprano del sistema de ventilación, calefacción y aire acondicionado (HVAC), fallo en el equipo de llenado o puede ser diagnóstico de malas prácticas durante el montaje de la máquina u operaciones de rutina.

En la tabla 1 se describe la clasificación ISO con sus 9 clases de recintos.

Tabla 1. ISO 14644-1. Categorías de limpieza en relación a las partículas de aire para las salas blancas y las zonas limpias.

ISO Clase	Límites máximos de concentración (partículas/m ³) de aire					
	≥ 0,1 μm	≥ 0,2 μm	≥ 0,3 μm	≥ 0,5 μm	≥ 1,0 μm	≥ 5,0 μm
ISO Clase 1	10	2				
ISO Clase 2	100	24	10	4		
ISO Clase 3	1.000	237	102	35	8	
ISO Clase 4	10.000	2.370	1.020	352	83	
ISO Clase 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO Clase 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO Clase 7				352.000	83.200	2.930
ISO Clase 8				3.520.000	832.000	29.300
ISO Clase 9				35.200.000	8.320.000	

Clasificación según la Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario (NCF). Para la fabricación de medicamentos estériles se distinguen cuatro grados teniendo en cuenta la limpieza del aire.

- a) Grado A: zona donde se realizan operaciones de alto riesgo tales como la zona de llenado, de bandejas de tapones, de ampollas y viales abiertos y de realización de conexiones asépticas. Normalmente estas condiciones son provistas por estaciones de trabajo de flujo laminar. Los sistemas de flujo laminar deben proporcionar una velocidad homogénea del aire en un intervalo de 0,36-0,54 m/s (valor orientativo) a nivel del punto de trabajo en entorno abierto. Debe mostrarse y validarse el mantenimiento de la laminaridad. Se puede utilizar un flujo de aire unidireccional y velocidades más bajas en aisladores cerrados y con guantes.
- b) Grado B: entorno para la zona de grado A en el caso de preparación y llenado asépticos.
- c) Grados C y D: zonas limpias para realizar fases menos críticas de la fabricación de productos estériles.

Por lo tanto, de esta clasificación se deduce que existe una categoría para las salas y otra categoría superior para las cabinas protegidas de trabajo (Ver clasificación en la tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de la limpieza del aire según la Guía UE de Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario (NCF) y Grados mínimos recomendados.

Clasificación de la limpieza del aire según la guía UE de NCF	Número máximo permitido de partículas/m ³				
	GRADO	En reposo		En operación	
		≥ 0,5 μm	≥ 5 μm	≥ 0,5 μm	≥ 5 μm
Zona local para operaciones de alto riesgo (por ejemplo, zona de llenado, tapones, ampollas y frascos abiertos, uniones estériles)	A	3.520	20	3.520	20
Para preparación y llenado en condiciones estériles. Este es el ambiente de fondo para la zona de Grado A	B	3.520	29	352.000	2.900
Zonas limpias para realizar las etapas menos críticas en la fabricación de productos estériles	C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
	D	3.520.000	29.000	Sin definir	Sin definir

Grados mínimos recomendados			
Zona de trabajo	Grado Zona de trabajo	Grado entorno zona de trabajo	Grado zona de trabajo
Cabina (CLF o CSB)*	Grado A	Grado B/C	
Aislador	Grado A	Grado D	

Clasificación de la limpieza del aire según la Guía UE de Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario (NCF) y Grados mínimos recomendados.

*CLF: cabina de flujo laminar, CSB: cabina de seguridad biológica

Clasificación de salas de ambiente controlado según riesgo de infección para el paciente (UNE 171340:2020).

Se definen 5 zonas de riesgo:

- a) Riesgo 1: Ligero
- b) Riesgo 2: Moderado
- c) Riesgo 3: Medio
- d) Riesgo 4: Alto
- e) Riesgo 5: Muy alto

Existen tablas de equivalencia entre las diferentes clasificaciones (ver tablas 3 y 4). Los niveles de tipología de las salas de ambiente controlado en lo que se refiere a este documento, están especificados en la tabla 4.

Tabla 3. Equivalencia entre las clasificaciones NCF y ISO 14644-1

EQUIVALENCIA ENTRE CLASIFICACIÓN NCF-ISO	
GMP (Grados)	ISO 14644-1 (Internacional)
A	Clase ISO 4.8 (*)
B	Clase ISO 5
C	Clase ISO 7
D	Clase ISO 8

* Determinado por el límite de tamaño de partícula > 5µm

Tabla 4. Tipología de salas de ambiente controlado y equivalencia entre las diferentes clasificaciones.

ZONA	NIVEL DE RIESGO UNE 171340	EQUIVALENCIA ISO	
		Estado en reposo (modo operacional)	Instalación en funcionamiento
Esterilización: proceso y empaquetado	3	7	8
Almacén de productos estériles	3	7	8
Sala de preparación de citostáticos (presión negativa)	3	7	8
Sala de preparación de alimentación parenteral	2	7	8
Esclusas de alimentación parenteral y citostáticos	2	7	8

4.2. ACTIVIDADES QUE REQUIEREN LA UTILIZACIÓN DE LAS SALAS DE AMBIENTE CONTROLADO

En los hospitales son numerosas las áreas que tienen diferentes niveles de riesgo de producir infección para el paciente, bien sea por la propia intervención que se ejerce sobre éste, o por la gravedad de su estado. Ejemplos de las mismas son las zonas de hospitalización de pacientes infectocontagiosos, pacientes inmunodeprimidos, áreas quirúrgicas, unidades de cuidados intensivos, unidades de quemados, unidades de diagnóstico intervencionista por imagen, áreas de diálisis, etc. En este documento, hacemos referencia a las actividades a realizar en los Servicios de Farmacia (preparación de citostáticos, formulaciones parenterales), Unidades de Reproducción Asistida (preparación de embriones), Servicios de Medicina Nuclear (radiofármacos y gammatecas) y Bancos de Sangre y Tejidos (preparados celulares).

En este apartado, se especifican las operaciones que deben realizarse en los diversos grados según la clasificación NCF:

- a) **Las unidades de soplado/llenado/sellado** utilizadas para la **producción aséptica** estará provisto de un chorro eficaz de aire **grado A** con un **entorno al menos grado C**.

Preparación aséptica

1. La manipulación de componentes y materiales de partida estériles (no sometidos a esterilización o filtración a través de un filtro), debe realizarse en una **zona grado A con entorno grado B**.
2. **La preparación de soluciones que son esterilizadas por filtración** durante el proceso debe hacerse en un entorno **grado C**.
3. **La manipulación y llenado** deben hacerse en una **zona grado A con entorno grado B**.
4. **Antes de completar el taponado, la transferencia de los recipientes** parcialmente cerrados, debe hacerse en una **zona grado A con entorno grado B** o bien en bandejas de transporte selladas en un entorno de grado B.

En el siguiente cuadro se detallan los grados para operaciones de preparación aséptica:

GRADO	Ejemplos de operaciones para preparación aséptica
A	Preparación y llenado asépticos
C	Preparación de soluciones para filtrar
D	Manipulación de componentes tras su lavado

- b) **En las unidades de soplado/llenado/sellado** utilizadas para la **fabricación de productos esterilizados** al final del proceso, debe instalarse un entorno al menos **grado D**.

Productos sometidos a esterilización terminal

1. **La preparación de componentes** de la mayoría de productos debe hacerse en un entorno al menos de **grado D**, excepto **cuando el producto tenga un elevado riesgo de contaminación microbiana** (composición que favorezca el crecimiento microbiano, tiempo hasta esterilización, elaboración en recipientes no cerrados) en cuyo caso debe realizarse en un entorno **grado C**.
2. **El llenado de productos** debe tener un entorno al menos **grado C**.

En el siguiente cuadro se detallan los grados para operaciones de productos de esterilización:

GRADO	Ejemplos de operaciones para productos de esterilización terminal
A	Llenado de soluciones
C	Preparación de soluciones para su posterior llenado cuando exista riesgo inusual Llenado de pomadas, cremas, suspensiones y emulsiones cuando no exista riesgo inusual
D	Preparación de soluciones y componentes para su posterior llenado/esterilización

4.3 GESTIÓN ARQUITECTÓNICA Y DE INFRAESTRUCTURAS. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LAS SALAS BLANCAS

En primer lugar, deberá considerarse cuál es la finalidad de la sala blanca que se desea construir, es decir, el uso que se le dará ya que tal y como se ha descrito anteriormente, sus especificaciones serán distintas. Otro aspecto a tener en cuenta serán las condiciones exteriores y la ubicación de la sala que se desea diseñar y construir.

Tal y como se detalla en el punto 4.1, la norma UNE-EN ISO 14644 *Salas blancas y locales anexos controlados*, es un estándar de clasificación de la concentración de partículas ambientales, aplicable a cualquier sala limpia y a todos los procesos y/o productos que precisen de un control del grado de contaminación del aire. En el caso de las salas blancas de los Servicios de Farmacia destinadas a la preparación de medicamentos, Unidades de Reproducción Asistida, Bancos de Sangre y Tejidos y Servicios de Medicina Nuclear deberán considerarse las diferentes áreas que pueden estar implicadas e interrelacionadas en los diferentes usos: área de preparación, almacenamiento, zonas auxiliares y equipos, debiendo tener siempre como objetivos garantizar la protección del producto, la del personal que trabaja en dichas áreas y la protección del medio ambiente.

1. Diseño. En el diseño se deberá decidir la distribución de los espacios, cuántas puertas y ventanas tendrá la instalación, cómo serán los cerramientos, el suelo, los accesos, etc. En resumen, se deberán estudiar y prever la estructura física y las circulaciones, teniendo en cuenta las posibles zonificaciones, circuitos y accesos, sabiendo que el objetivo será crear una caja estanca y hermética. El diseño deberá tener en cuenta la normativa vigente, tanto estatal como comunitaria y local. Otro aspecto fundamental está relacionado con los recursos disponibles: disponibilidad económica y de personal cualificado capaz de trabajar en equipo, siendo fundamental la colaboración entre los equipos técnicos (constructores, ingenieros, mantenimiento) y sanitarios.

2. Divisiones interiores, suelos, paredes y techos. Independientemente de la clase de sala que se proyecte construir, es deseable que presenten propiedades como:

2.1. Modularidad. El uso de paredes de tipo modular simplifica la extracción individual de cada pieza, lo cual significa un fácil acceso que facilita la reparación, modificación o sustitución del panel.

2.2. Prefabricación. Permite una calidad constante, así como la reducción del tiempo de trabajo in situ, siendo este un factor decisivo en las reformas de áreas hospitalarias.

2.3. Calidad de acabados y de ejecución. Deberán ser lisos y no porosos, resistentes a impactos y desgaste, así como impermeables y resistentes a los diferentes productos de limpieza y desinfectantes; no deben presentar hendiduras ni salientes que puedan facilitar la acumulación de partículas. Las juntas deberán ser estancas para poder lograr la presurización deseada e impedir la entrada de aire no controlado. Estos acabados deberán caracterizarse por presentar facilidad de instalación, mantenimiento y reparación. En el caso de los suelos deberán tener propiedades antiestáticas (y la correspondiente toma de tierra).

No debe olvidarse que todos los materiales empleados tienen que presentar baja combustibilidad y baja emisión de humos.

3. Seguridad eléctrica. Es fundamental y hay que considerar todos los equipos y aparatos imprescindibles para el buen funcionamiento de la sala. Debe cumplir las especificaciones de seguridad máxima de la normativa vigente aplicable.

4. Climatización. Es preciso climatizar las salas blancas para que el proceso de fabricación sea correcto, creando unas buenas condiciones de trabajo para el personal y minimizando cualquier riesgo de contaminación cruzada. La instalación de climatización debe eliminar los contaminantes que hay en el aire, aislar el ambiente de las salas adyacentes (que comunican con la sala blanca) y conseguir un confort higrotérmico adecuado.

5. Sistema de filtración. Es el corazón de la sala blanca. Resulta evidente que la Unidad de Tratamiento del Aire es un componente complejo y fundamental que consta de diferentes secciones, las cuales tienen una misión concreta en el tratamiento del aire: impulsión, filtración, calentamiento, enfriamiento, humidificación, etc. Sin olvidar el control de los diferentes niveles de presión según las zonas y necesidades, las renovaciones y movimientos de fluidos. Esta sección es la responsable de la pureza del aire mediante diversos filtros tipo HEPA compuestos por fibras de vidrio capaces de retener partículas y microorganismos.

6. Iluminación. Las luminarias deben ser empotrables y estancas, entre otras características, sin olvidar la eficiencia energética que puede facilitarse mediante controles de iluminación que faciliten el encendido y apagado sin necesidad de acceder a la sala blanca. Las iluminancias medias varían desde los 200 lux en pasillos a los 1000 lux en el caso de las zonas de trabajo.

7. Instalaciones de acceso de personal o material. Es muy recomendable la instalación de un sistema SAS (*Security Airlock System*) para la entrada y salida de material; con este sistema, se evitan cambios bruscos de temperatura y de presión cada vez que se accede a la sala blanca. Se construyen a medida y constan, como mínimo, de dos puertas que nunca están abiertas simultáneamente; entre dichas puertas se pueden incluir mirillas, aire ultra filtrado, sistemas germicidas, etc.

En el caso de las esclusas para entrada y salida del personal pueden incluirse elementos como las duchas de aire impulsado a gran velocidad.

Teniendo en cuenta todas estas premisas, es importante destacar lo siguiente:

- En el diseño de las salas blancas, de cara al futuro mantenimiento de la misma, es importante la ubicación de las salas de preparación donde se colocarán las cabinas de flujo. Es conveniente que estas salas estén físicamente ubicadas en una zona de la sala blanca con acceso directo al exterior mediante una única apertura de paneles. Si fuese necesario un cambio de cabinas, solo sería necesario desmontar un panel del recinto para poder sacar y/o introducir una nueva cabina. Tras esto, la colocación y nuevo sellado del panel retorna la funcionalidad a la totalidad de las salas blancas.
- Un parámetro importante que tiene su influencia en la clase de limpieza del aire y, consecuentemente, en la calidad del producto farmacéutico, es el control de la presión estática en la sala. Se debe definir un gradiente de presiones en escala ascendente o descendente, según se defina el proceso a realizar. En el caso de la fabricación de productos estériles, con el fin de prevenir una posible contaminación, la cadena de presiones de cada uno de los compartimentos será de menor a mayor, en intervalos de 10-15 pascales positivos. Si por el contrario el producto a procesar es vírico, bacteriano, citotóxico o biopeligroso y la prevención es que no salga contaminación al exterior desde la zona de producción, el juego de presiones deberá ser a la inversa, negativas y en forma ascendente.

8. Equipamiento en salas de preparación de medicamentos y otros productos de uso humano estériles.

8.1. Medicamentos y productos estériles no peligrosos.

8.1.1. Cabinas de flujo laminar horizontal para trabajar en condiciones de esterilidad y ausencia de partículas garantizando la total protección del producto.

8.1.2. Dispensador de solución antiséptica estéril para el lavado de manos.

8.1.3. Contenedor de residuos G-II (clasificación del grupo de residuos sanitarios según peligrosidad).

8.2. Medicamentos y productos peligrosos.

8.2.1. Señalización de la instalación (RD 485/1997, 14 de abril).

8.2.2. Cabina de seguridad biológica Clase II tipo B2 o Clase III (aislador). Imprescindibles para el manejo de citostáticos y medicamentos o materiales peligrosos.

9. Equipamiento para manipulación de medicamentos y productos peligrosos no estériles.

9.1. Campanas de humo para manipulación de polvos tóxicos.

9.2. Dispensador de solución antiséptica.

9.3. Contenedor de residuos citostáticos G-IV (clasificación del grupo de residuos sanitarios según peligrosidad).

10. Mobiliario. Constará, entre otros, de diversas bancadas de trabajo y bancadas separadoras de zonas, vitrinas, estantes, percheros, lavaojos, dispensadores de desechables, así como de material propio de laboratorio y ordenadores.

4.4 GESTIÓN DEL PERSONAL

Los procedimientos de trabajo de cada una de las salas blancas deberán establecer, entre otros, los protocolos de entrada y salida de las áreas, así como el uso de los equipos de protección individual.

En una sala blanca debe trabajar el personal necesario mínimo y, siempre que sea posible, debería ser habitualmente el mismo (personal fijo) ya que, generalmente, los problemas suelen ocurrir con personal de sustitución o eventual. Estas situaciones deben minimizarse implementando una adecuada formación para cada sala concreta bajo unos estrictos protocolos de trabajo. Como máxima, hay que recordar que en una sala blanca no puede trabajar nadie que carezca de una formación adecuada.

Las guías PIC/S *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products* publicadas en mayo de 2021 (<https://www.picscheme.org>), detallan todo lo relacionado con el personal en los diferentes escenarios en función de los productos que se estén preparando con diferentes anexos: productos medicinales estériles, fabricación de medicamentos de terapia avanzada para uso humano, radiofármacos y productos veterinarios, entre otros.

Todos estos anexos tienen en común algunos aspectos que se describen a continuación, aunque se recomienda su consulta para aspectos más concretos de cada uno de los productos y situaciones.

Así pues, todo el personal (incluido el que se ocupa de la limpieza y el mantenimiento) debería recibir formación periódica que debe incluir referencias a la higiene y a los elementos básicos de Microbiología.

Cuando sea necesaria la contratación de personal externo que no haya recibido dicha capacitación (por ejemplo, contratistas de construcción o personal de mantenimiento), se debe prestar especial atención a su instrucción y supervisión.

Los altos estándares de higiene y limpieza personal son esenciales y deberá resaltarse la importancia para que el personal implicado notifique cualquier condición que pueda causar la liberación de cantidades o tipos anormales de contaminantes.

En relación a la indumentaria y vestimenta, su calidad debe ser adecuada para el proceso y el grado del área de trabajo. Debe usarse de manera que se proteja el producto de la contaminación:

- Los relojes de pulsera, el maquillaje y las joyas no deben usarse en áreas limpias.
- El cambio y el lavado deben seguir un procedimiento escrito diseñado para minimizar la contaminación de la ropa del área limpia o el arrastre de contaminantes a las áreas limpias.

La descripción de la ropa requerida para cada grado se detalla a continuación:

- Grado D: el cabello y la barba deben estar cubiertos. Se debe usar un traje de protección general y zapatos o chanclos adecuados y tomar las medidas adecuadas para evitar cualquier contaminación proveniente del exterior del área limpia.
- Grado C: el cabello y, en su caso, la barba y el bigote deben estar cubiertos; usar un traje pantalón de una o dos piezas, fruncido en las muñecas y con cuello alto y zapatos o chanclos adecuados. Lo deseable sería no desprender fibras ni partículas.
- Grado A / B: el arnés debe cubrir totalmente el cabello y, cuando corresponda, la barba y el bigote; debe estar metido en el cuello del traje. Se debe usar una mascarilla para evitar el derramamiento de gotitas. Se deben usar guantes apropiados de plástico o goma esterilizados, sin polvo, y calzado esterilizado o desinfectado. Las perneras de los pantalones deben meterse dentro del calzado y las mangas de la prenda dentro de los guantes. La ropa protectora no debe desprender fibras o material particulado, así como retener las partículas desprendidas por el cuerpo.

No se debe introducir ropa del exterior en los vestuarios que conducen a las salas de grado B y C. Para cada trabajador en un área de grado A / B, se deben proporcionar prendas protectoras limpias y estériles (o adecuadamente desinfectadas) en cada sesión de trabajo. Los guantes deben desinfectarse periódicamente durante las operaciones. Las mascarillas y los guantes deben cambiarse como mínimo en cada sesión de trabajo.

La ropa del área limpia debe limpiarse y manipularse de modo que no acumule contaminantes adicionales que puedan desprenderse con posterioridad. Son deseables instalaciones de lavandería independientes y especializadas para esta ropa, ya que el tratamiento inadecuado podría dañar las fibras y, por tanto, incrementar el riesgo de desprendimiento de partículas.

En la Tabla 5 se resumen los requerimientos mínimos de vestuario según los grados de la clasificación de la NCF.

Tabla 5. Requerimientos mínimos de vestuario según los grados de las salas (Clasificación NCF)

Clasificación	Vestuario	Descripción
Grado D	Mascarilla	Dependiendo del proceso, al menos barba y bigote cubierto
	Gorro	El pelo debe estar cubierto
	Traje	Traje de protección estándar
	Zapatos	Zapatos desinfectados, esterilizados o calzas
	Guantes	Dependiendo del proceso
Grado C	Mascarilla	Dependiendo del proceso, al menos barba y bigote cubierto
	Gorro	El pelo debe estar cubierto
	Traje	Un traje pantalón de una o dos piezas fruncido en las muñecas y de cuello alto
	Zapatos	Zapatos desinfectados, esterilizados o calzas
	Guantes	Estériles, de goma sin polvo o de plástico
Grado A/B*	Mascarilla	Estéril de un solo uso. Debe cubrir totalmente el vello facial. Protección ocular estéril/ la cobertura dependerá del proceso
	Gorro	Estéril de un solo uso. Debe cubrir el pelo totalmente. Debe de estar introducido dentro del cuello del traje
	Traje	Mono estéril. Las mangas introducidas dentro de los guantes
	Zapatos	Calzado esterilizado. Perneras que deben introducirse dentro del calzado
	Guantes	Estériles, de goma sin polvo o de plástico

* La ropa protectora no debe desprender fibras o material particulado, así como retener las partículas desprendidas por el cuerpo.

5. GESTIÓN DEL SISTEMA DE CALIDAD: ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

Es fundamental establecer un control de la contaminación microbiológica adecuado de la sala blanca. Este sistema de gestión de la calidad debe ser capaz de identificar, controlar y monitorizar todos los factores que puedan influir en la contaminación microbiológica del producto, así como de documentar todos los resultados.

Los atributos deseables para dicho sistema deben considerar los pasos siguientes:

1. Identificar todas posibles fuentes y rutas de contaminación microbiológica de los microorganismos considerados de interés:

- Las personas son una importante fuente principal de contaminación; otras fuentes principales son los materiales de los productos, los equipos, servicios como el aire comprimido y el agua para inyección.
- Fuentes asociadas son las superficies (suelos, paredes, carros, contenedores de desinfectantes, etc) y áreas adyacentes (vestuarios, pasillos).
- Las rutas de transferencia de contaminación microbiológica son el contacto superficial, los líquidos y la sedimentación de las partículas suspendidas en el aire.

2. Evaluar el riesgo originado por las fuentes y rutas con el fin de introducir o mejorar los métodos de control de la contaminación microbiológica:

- Pueden usarse diferentes sistemas para evaluar el riesgo como el sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) o cualquier otro que puede consultarse en la norma IEC 31010: 2019. *Gestión de Riesgos: Técnicas de Evaluación de Riesgos*. La evaluación del riesgo debe identificar las variables que deben monitorizarse y qué contaminación microbiológica debe ser medida con el objetivo de controlar todos aquellos riesgos que puedan tener un efecto perjudicial en la calidad del producto, en el paciente o en el consumidor.

- Los resultados de estas evaluaciones del riesgo deben ser documentados y revisados periódicamente.

3. Establecer un programa de monitorización y métodos de muestreo válidos para monitorizar la fuente de contaminación:

- El sistema de control microbiológico debe especificar los métodos de medición asociados.
- Las ubicaciones de la monitorización y el número de estas deberán tener en cuenta el tipo de producto fabricado, así como la actividad que se lleva a cabo en la sala de entorno controlado.
- Aplicar el proceso de mejora continua Planificar-Implementar-Comprobar-Actuar puede ser de gran ayuda para revisar cuáles son las ubicaciones más óptimas, así como su número y frecuencia.

4. Establecer objetivos, niveles de alerta y de actuación y medidas a tomar en caso de excederse los niveles:

- Debe especificar los niveles de microorganismos de interés tanto en el aire como en las superficies; también debe especificar las condiciones de alerta de acuerdo a las cuales deberán emprenderse acciones.
- En los casos en los que se exceda un nivel de actuación, el plan de monitorización deberá especificar qué actuación debe realizarse para recuperar el control microbiológico.

5. Verificación continuada de la efectividad del sistema de control de la contaminación microbiológica:

- Revisión de tasas de la contaminación del producto, resultados de monitorización ambiental, métodos de control y monitorización de los límites con objeto de, si fuera el caso, modificarlos adecuadamente.

6. Control de las estufas de incubación:

- Las estufas o incubadoras deben de tener una cualificación adecuada antes de su uso y funcionamiento. El rango de temperatura debe ser cartografiado para garantizar que todas las ubicaciones de la estufa alcanzan y mantienen la temperatura de incubación dentro de una desviación de $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Esta calificación debería realizarse al menos una vez cada tres años. Aparte de esta calificación, la temperatura del incubador debe ser monitorizada de forma continua durante su uso rutinario y en caso de detectar una desviación de las temperaturas requeridas emitir una alarma.

7. Control de los medios de cultivo:

- Para verificar el rendimiento de los medios de cultivo utilizados, deben llevarse a cabo periódicamente ensayos de promoción del crecimiento con cepas comerciales (BioBall^R). Brevemente, consiste en rehidratar las cepas suministradas y sembrar los medios de cultivo con una alícuota que contenga un inóculo conocido (generalmente 100 μl de una suspensión de 10^3 ufc/ml) . Los recuentos obtenidos deben estar en el rango esperado en función del inóculo utilizado.

8. Documentación y mantenimiento de la misma:

- Todo el sistema de control microbiológico debe estar documentado y revisarse regularmente, además de actualizarlo con los cambios incorporados.
- Los informes deben mostrar el análisis de la monitorización ambiental y de las desviaciones de los resultados esperados. Serán de especial utilidad la evaluación de los datos, el análisis de tendencias y la investigación de los registros de resultados fuera de especificaciones.

9. Formación y sensibilización de todo el personal que está implicado en la sala a estudio y monitorización:

- Debe capacitarse al personal mediante formación adecuada que deberá ser registrada. El personal debe efectuar únicamente aquellas actividades para las cuales están cualificados y autorizados para desempeñarlas (consultar en ISO 14664-5).

6. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LAS SALAS BLANCAS

6.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Todos los Servicios Hospitalarios que cuentan con salas blancas deben implantar un plan de control ambiental que evalúe y controle los factores que suponen un riesgo para la contaminación microbiológica y que garantice la eficacia de las medidas implantadas. En este plan debe incluirse el procedimiento de monitorización microbiológica en el que, a su vez, deben constar, entre otros:

- Los controles microbiológicos a realizar sobre instalaciones y personal
- Puntos y frecuencia de muestreo
- Límites de aceptación y alerta sobre los resultados obtenidos
- Procedimientos de registro de resultados

Cuando se excedan los límites de alerta o admisibles, deberán ponerse en marcha las acciones preventivas y correctivas adecuadas, así como la investigación de las causas. Todos estos aspectos deben estar recogidos en el plan de control ambiental.

Los procedimientos generales de toma de muestras para llevar a cabo la monitorización microbiológica del aire y superficies son similares en todos los casos, mientras que los límites admisibles de recuento de microorganismos, así como la frecuencia y puntos de muestreo, están directamente relacionados con la clasificación en función del riesgo de la sala o ambiente controlado.

6.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE

6.2.1. Recogida de muestras

El personal técnico que lleva a cabo la toma de muestras debe estar formado específicamente para esta tarea y cumplir la normativa establecida en cuanto a higiene y vestuario apropiado antes de entrar a la zona controlada. Los requisitos de vestuario dependerán de la clasificación de la sala a la que se accede.

La toma de muestras de aire, en general, puede realizarse mediante dos métodos:

- A) Captación activa con muestreadores de aire volumétricos
- B) Sedimentación en placa

Son métodos complementarios y no excluyentes que se seleccionarán en función de las características del procedimiento que se monitoriza. El monitoreo microbiológico puede llevarse a cabo en las salas en reposo (dispuestas para su utilización, pero sin personal trabajando) o en funcionamiento (con personal trabajando en las condiciones habituales).

A) Captación activa con muestreadores de aire volumétricos

Es el método recomendado para la toma de muestras de aire en todas las salas de ambiente controlado, cualquiera que sea su clasificación. El muestreador volumétrico por impacto directo es un

dispositivo que aspira un volumen de aire constante, regulable, durante un tiempo determinado, haciéndolo pasar a través de un cabezal perforado, para impactar finalmente sobre un medio de cultivo. Se utiliza una placa de Petri estándar de 90 mm de diámetro, abierta, colocada dentro del cabezal. El flujo de aire ha de ser suficiente para recoger las partículas sin dañar aquellas que sean viables. Generalmente se recomienda que la muestra se tome durante 10 minutos a un caudal de 100 L de aire por minuto (volumen final de la muestra de 1 m³). El cabezal debe desinfectarse entre cada toma de muestra si no se dispone de varios cabezales para ir cambiándolos. La desinfección puede hacerse con alcohol y gasa estéril. Al final de cada jornada de trabajo, el cabezal debe esterilizarse por autoclavado².

Existen otros tipos de muestreadores volumétricos por impacto indirecto, menos utilizados, que hacen pasar el aire a través de un líquido o un filtro que se transfiere posteriormente a un medio de cultivo sólido.

El fabricante debe garantizar la idoneidad de los muestreadores volumétricos para la eficiencia en la recogida de las partículas que contienen bacterias (partículas viables). El operador del dispositivo debe asegurarse de que el muestreador se somete a revisiones periódicas para llevar a cabo la calibración del caudal de aspiración.

B) Sedimentación en placa

La sedimentación en placa es un método pasivo y semicuantitativo (ya que no se determina el volumen de aire muestreado), utilizado generalmente para toma de muestras de aire en cabinas de flujo laminar u otros puntos de interés donde no se puede acceder fácilmente con un muestreador volumétrico. La recogida de muestra se lleva a cabo mediante la exposición al aire de placas de Petri estándar con medio de cultivo, durante un tiempo que puede oscilar entre 1 y 4 horas. No deben sobrepasarse las 4 horas de exposición por la desecación a la que se vería sometido el medio de cultivo. Si es necesario exceder las 4 horas por la larga duración del proceso a monitorizar, deberán utilizarse otras placas adicionales tras este periodo de tiempo.

El método de sedimentación tiene la ventaja de que puede utilizarse para llevar a cabo el monitoreo continuado durante un procedimiento específico de trabajo. Sin embargo, al ser un método menos sensible que el volumétrico, no se recomienda su utilización salvo en las situaciones especificadas, entre otras razones, porque los resultados pueden verse afectados por las turbulencias del aire. Normalmente, la toma de muestras durante el monitoreo continuado “en proceso” la lleva a cabo el mismo técnico que trabaja en la cabina, con lo que los medios se recibirán ya inoculados en el laboratorio.

6.2.2. Frecuencia del muestreo y puntos de toma de muestra

La ubicación de los puntos de toma de muestras y frecuencia del muestreo se establecen en función de los atributos de la sala a monitorizar. El nivel de riesgo, y, por tanto, el grado de clasificación de la zona controlada, determina la frecuencia de muestreo. Como se ha comentado, la normativa ISO 14644 establece la clasificación de las salas blancas en función de la limpieza de aire mediante medición de partículas (clases ISO). Por su parte, las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos Europeas (NCF), directrices fundamentales que definen los estándares de calidad en la fabricación de medicamentos, establecen una clasificación en 4 grados de la letra A a la D. La relación entre ambas, queda como se muestra en la tabla 3.

Las cabinas de flujo laminar son zonas de ambiente controlado de grado A, mientras que el entorno de la cabina puede estar clasificado como grado B (para preparación o llenado aséptico) o C. El resto de salas de preparación de productos generalmente serán de grado D, excepto aquellas donde se manipulen productos de alto riesgo de contaminación microbiana, que deben ser grado C. Las esclusas de paso de material pueden considerarse grado C o D en función de la clasificación de las salas que comuniquen, debiendo adoptar la clasificación de la sala más limpia. Atendiendo a esta clasificación, la frecuencia de muestreo rutinario de aire se presenta en el siguiente cuadro:

Clase ISO (ISO 14644-1)	Monitorización
5	Por turno
6	Día de trabajo
7	Semanal
8	Mensual

Por tanto, el muestreo de salas generales de fabricación debería tener una frecuencia mensual, mientras que la monitorización microbiológica “en proceso”, dentro de las cabinas, se debe realizar por turno de trabajo, y la del entorno de la cabina será semanal o diaria.

La normativa define igualmente el número mínimo de puntos de muestreo en función de la extensión de la sala, según se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Medición de aire en función de la superficie de la sala

Superficie de sala limpia en m ²	Número mínimo de ubicaciones para mediciones de aire activo
≤8	1
> 8 ≤28	2
> 28 ≤ 52	3
> 52 ≤ 68	4
> 68 ≤ 104	5
> 104 ≤ 148	6
> 148 ≤ 232	7
> 232 ≤ 436	8
> 436 ≤ 1000	9
>1000	A determinar usando la fórmula N_L

Extraído de la norma UNE-EN 17141:2021(toma como base la normativa ISO 14644)

$$N_L = [27X(A/1000)] / 3$$

donde

N_L es el número mínimo de ubicaciones de muestreo a evaluar, redondeando al número entero superior

A es la superficie de la sala limpia en m²

Los puntos de toma de muestras, por lo general, estarán situados en el centro de la sala, a una altura del suelo de 1,5 m aproximadamente (altura de trabajo). En el caso de las cabinas de flujo, se situarán las placas en el centro de la repisa horizontal, estando la cabina en funcionamiento. Pueden añadirse puntos de muestreo adicionales si las características de la sala lo requieren.

En determinadas situaciones será necesario tomar muestras de cultivo adicionales a las de rutina, por ejemplo, al inicio de actividad de un sistema, tras la limpieza realizada cuando se sobrepasan los límites establecidos, tras cambios de filtros o cuando haya obras cercanas. En general, después de cualquier actuación derivada de una acción correctiva y/o preventiva considerada en el plan de control ambiental.

6.2.3. Transporte y conservación de la muestra

Una vez recogida la muestra de aire, debe extraerse la placa del muestreador, poner la tapa y sellar con film para evitar contaminaciones durante el transporte. Es imprescindible asegurar la correcta identificación de las muestras, indicando la sala o zona en la que se ha tomado. El envío al laboratorio se realizará lo antes posible, a temperatura ambiente. Una vez recepcionadas, se procederá al registro en el sistema informático (SIL), siendo conveniente una metodología de registro que permita consultar el histórico de resultados de cada instalación controlada.

6.2.4. Procesamiento de la muestra

Los medios se incuban en estufa convencional, con lectura diaria de las mismas, tanto de bacterias mesófilas como de hongos. En la normativa vigente se establecen los límites admisibles en el recuento de microorganismos, pero no se hace referencia específica a la presencia de hongos. Se debe informar, por tanto, del recuento total de microorganismos, incluyendo hongos y bacterias. No obstante, consideramos que la presencia de hongos debería advertirse a los responsables del control de calidad de las salas blancas, mediante informes específicos.

Recuento bacteriano:

Se anotará el recuento de colonias, por lo general sin identificación de especies. En algunos casos puede ser de interés realizar identificación del microorganismo (por ejemplo, crecimiento en grado A y B) para aportar información sobre el posible origen de la contaminación. En general, no está indicada la realización de antibiograma.

Recuento de hongos:

Se anotará el recuento de micelios (colonias) y se identificarán hasta el nivel de especie siempre que sea posible, mediante la metodología disponible en el laboratorio. La espectrometría de masas MALDI-TOF puede resultar muy útil si el hongo en cuestión está registrado en la base de datos utilizada por el sistema. En caso contrario, las técnicas clásicas como las tinciones para hongos (azul de lactofenol, técnica de impactación con cinta adhesiva) y la observación de características morfológicas al microscopio con bajo aumento o lupa, pueden aportar información suficiente para una identificación preliminar. Es de especial relevancia la identificación rápida y precisa de los hongos patógenos clásicos como *Aspergillus* spp., Mucorales y *Scedosporium* spp. por su potencial patógeno.

6.2.5. Medios de cultivo y condiciones de incubación

El agar triptona de soja (TSA) es un medio no selectivo que permite el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, y es de elección para llevar a cabo el control microbiológico del aire. Adicionalmente, puede utilizarse un medio específico suplementado con dextrosa para favorecer el crecimiento de hongos (agar Sabouraud-dextrosa). Existe una variedad de agar TSA irradiado y de triple embolsado (TSA3), que permite la eliminación sucesiva de las envolturas al acceder a zonas más limpias (de mayor clasificación). Este agar está especialmente fabricado para la monitorización ambiental cumpliendo con la normativa de la Farmacopea Europea. Cuando sea necesario detectar un microorganismo de interés, podrá utilizarse un medio selectivo y/o diferencial apropiado, a criterio del especialista en Microbiología.

Antes de utilizar los medios de cultivo, es necesario realizar una inspección visual de los mismos, verificando la esterilidad, hidratación, ausencia de agua de condensación y fecha de caducidad.

Las condiciones de incubación, recomendadas en la ISO 17340, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Medios de cultivo y condiciones de incubación recomendados para la toma de muestras de aire y superficies (ISO 171340).

Microorganismos	Medios de cultivo	Temperatura	Tiempo de incubación
Bacterias aerobias	TSA*	35-37°C	3 días
Hongos	SDA**	OPCIÓN 1 1º- 37°C ± 1°C 2º- temperatura ambiente OPCIÓN 2 25°C-31°C ±1°C	1-2 días 2-5 días 5-7 días

* Agar triptona de soja; ** agar Sabouraud-dextrosa

6.2.6. Criterios de interpretación de resultados

La normativa Europea de NCF establece los límites de contaminación microbiológica admitidos, en función del grado de clasificación de la sala, que pueden hacerse extensivos para todos los tipos de salas blancas hospitalarias. Es recomendable establecer, adicionalmente, límites de alerta que permitan iniciar la investigación de las causas del aumento de la contaminación microbiana y corregir las situaciones que la estén originando. Aunque no hay una normativa que indique cuales deben ser esos límites, se puede acordar una cifra que equivalga a un porcentaje de los límites de acción. De esta manera, si se acuerda un porcentaje que consideramos adecuado, del 70%, los límites recomendados quedarían establecidos como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Límites de contaminación microbiológica recomendados en función del grado de clasificación ambiental y tipo de muestra.

Límites de contaminación microbiológica recomendados (alerta/acción)^a				
Grado	Muestra de aire impactado (ufc/m³)	Placa de sedimentación diámetro 90 mm (ufc/ placa /4 horas)^b	Placa de contacto diámetro 55 mm (ufc/placa)	Impresión de guantes: 5 dedos (ufc/guante)
A	<1/NA	<1/NA	<1/NA	<1/NA
B	10/7	5/3	5/3	5/3
C	100/170	50/35	25/17	NA/NA
D	200/140	100/70	50/5	NA/NA

^a Valores medios

^b El tiempo de exposición de las placas debe ser igual o inferior a 4 horas

NA: no aplicable

Los resultados de una única muestra pueden no ser representativos de la situación, por lo que se recomienda analizar la evolución de los resultados en el tiempo para detectar las desviaciones, aunque no se sobrepasen los límites establecidos.

6.2.7. Información de resultados

Los cultivos deben revisarse diariamente para facilitar la emisión rápida de resultados preliminares en caso de detectarse contaminación que supere los límites establecidos.

- Recuento total de microorganismos: si el recuento está dentro de los límites admisibles, se emitirá un único informe al final del periodo de incubación. En caso de sobrepasar los límites antes de la finalización del periodo de incubación, se puede emitir un informe provisional con el recuento preliminar.
- Recuento de hongos: si el resultado es negativo, se recomienda emitir al menos un informe provisional a las 48-72 horas y el informe final a los 5- 7 días de incubación. El crecimiento de cualquier hongo debe informarse lo antes posible, junto a la identificación preliminar del mismo, para facilitar la puesta en marcha de las acciones correctivas que correspondan.

En caso de que no sea posible llegar a la identificación, se emitirá un informe indicando el crecimiento de hongos levaduriformes o filamentosos ambientales no identificables mediante los métodos disponibles. Se procederá de igual forma en el caso de bacterias de interés, indicando morfología (cocos, bacilos), tinción de Gram y cualquier otro atributo que se considere de interés a nivel microbiológico.

6.3 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIES

6.3.1 Recogida de muestras

Para el muestreo de superficies la Norma UNE-EN 17141:2021 recomienda el uso de placas de contacto tipo Rodac, laminocultivos e hisopos o esponjas. Las placas de contacto y los laminocultivos se emplean para realizar el muestreo de superficies planas y accesibles, mientras que los hisopos o esponjas se emplean en superficies irregulares y de difícil acceso. Como norma general la toma de muestras de superficies se realizará tras la limpieza de las mismas con agentes antisépticos y desinfectantes.

- **Placas de contacto tipo Rodac y laminocultivos** (*contac slide*). Las placas tipo Rodac son circulares, con un diámetro de 55 mm y contienen agar formando un menisco convexo. Para la toma de muestra, el agar nutritivo se coloca hacia la superficie a muestrear y se presiona de forma uniforme y continua durante 10 segundos, tras los cuales se retira y se cierra la placa (ref. UNE-EN ISO 18593). De esta forma los microorganismos quedan adheridos a la superficie del agar. Por otra parte, las bandas de contacto o laminocultivos consisten en una lámina plástica a la que se adhiere un medio de cultivo. Esta lámina plástica, se introduce dentro de un tubo plástico transparente y se fija al tapón, lo que permite manipularla sin riesgo de contaminación. Los laminocultivos se emplean de igual forma que las placas de contacto y también permiten pasar un hisopo con el que previamente se ha realizado la toma de muestra, sobre la superficie del agar. Finalmente, las superficies sobre las que se ha realizado la toma de muestra deben limpiarse con desinfectantes adecuados para retirar los restos de agar adheridos a la superficie.

- **Hisopos y esponjas**. Los hisopos se emplean para el muestreo de superficies de difícil acceso en las que no es posible utilizar placas de contacto. Para realizar la toma de muestra, el hisopo se humedece en suero fisiológico estéril y se desplaza a lo largo de un área de superficie girándolo lentamente. Una vez finalizado el proceso, el hisopo es reintroducido en el tubo que contiene unos 10 ml de una disolución tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) con agentes neutralizantes (por ejemplo, Tween 80) y se cierra. Alternativamente, existen hisopos comerciales que incorporan tampones con agentes neutralizantes o bien medios líquidos de enriquecimiento como el caldo Dey-Engley neutralizante, especialmente diseñado para neutralizar los antisépticos y desinfectantes y para la detección de microorganismos en superficies de interés sanitario. Las esponjas presentan una superficie de contacto superior a los hisopos por lo que su uso se recomienda para el muestreo de superficies grandes ($\geq 1 \text{ m}^2$.) Se emplean de forma similar a los hisopos y una vez que se ha realizado la toma de muestra se introducen en la bolsa proporcionada por el fabricante que contiene una solución tampón con agentes neutralizantes con objeto de realizar una pre-incubación (ver figura 1).

Figura 1. Esponja para realizar toma de muestras en superficies



- **Impronta de guantes.** Las yemas de los dedos pueden contaminarse por contacto con superficies u objetos contaminados. Para realizar esta técnica la superficie del agar de una placa Petri de 90 mm se presiona ligeramente durante unos 10 segundos con las yemas de los cinco dedos de una de las manos. La toma de muestra se realizará una vez que el operador ha realizado un proceso en la sala limpia o antes del cambio de guantes. Los guantes nunca deben desinfectarse antes de la toma de muestra.

6.3.2 Frecuencia del muestreo

En cada sala de ambiente controlado debe establecerse un plan de monitorización del entorno microbiológico que especifique las mediciones que se van a llevar a cabo, así como la ubicación y la frecuencia. Existen diferentes directrices y normas ISO que abordan el tema de la monitorización del entorno microbiológico en diferentes aplicaciones. Las ubicaciones que se deben monitorizar así como la frecuencia del muestreo deben especificarse en el plan de control microbiológico. Así, por ejemplo, en la Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria se indican las frecuencias de monitorización para el control microbiológico de las salas blancas donde se preparan medicamentos estériles. Se resumen en el siguiente cuadro:

Muestra	Frecuencia (zona de trabajo)	Frecuencia (entorno zona de trabajo)
Dedos de guantes	Al final de cada sesión	Al final de cada sesión
Superficies	Semanalmente	Mensualmente

6.3.3 Transporte y conservación de la muestra

Las placas o los contenedores con medio líquido se sellarán con film de plástico para evitar contaminaciones durante su traslado. Las muestras se enviarán al Servicio o Laboratorio de Microbiología perfectamente identificadas y una vez allí se registrarán en el SIL para garantizar la trazabilidad dentro del laboratorio. En el caso de las muestras tomadas con hisopo o esponja se recomienda conservar estas muestras a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas si se va a retrasar el procesamiento.

6.3.4 Procesamiento de la muestra

Placas de contacto tipo Rodac, laminocultivos e impronta de guantes. Las placas se incuban según las condiciones establecidas (ver tabla 7) y se examinan de forma diaria. Una vez completados los días de incubación se anotará el recuento de colonias (ver figuras 2 y 3).

Figura 2. Placa Rodac con medio de agar Sabouraud-cloranfenicol con crecimiento de hongos filamentosos.



Figura 3. Placa Rodac con agar TSA con crecimiento de bacterias mesófilas.



Hisopos y esponjas. Las soluciones tamponadas o medios de cultivo líquidos en los que se inoculan los hisopos y/o esponjas se incuban a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas. Esta preincubación tiene como objeto favorecer la revivificación de los microorganismos lesionados por el uso de desinfectantes o antisépticos. Transcurrido este tiempo se realiza un subcultivo en medio TSA o bien en medios selectivos en el caso de investigar la presencia de un microorganismo determinado. Posteriormente los medios de cultivo se incuban según las condiciones establecidas (ver tabla 7) y se examinan de forma diaria.

En ambientes controlados de grado A y B se realizará la identificación de los microorganismos aislados a nivel de género y especie. No se recomienda la realización de antibiogramas de forma rutinaria.

6.3.5 Medios de cultivo y condiciones de incubación

Para el cultivo de superficies pueden emplearse medios generales como el agar TSA o selectivos en caso de buscar un microorganismo determinado. Para el aislamiento de hongos se recomienda el medio selectivo Sabouraud-dextrosa (SDA).

La Norma UNE-EN 17141:2021 recomienda el uso de medios con irradiación terminal dentro de embalajes seguros para asegurar su esterilidad. De igual forma, en el muestro de superficies se recomienda que los medios de cultivo incorporen agentes neutralizadores, como lecitina o Tween 80, para garantizar que los residuos de desinfectantes de las superficies no inhiban el crecimiento de los microorganismos. Las condiciones de incubación se resumen en la Tabla 7.

6.3.6 Criterios de interpretación de resultados

Las directrices de la UE sobre las NCF de medicamentos establecen los límites de contaminación microbiológica admitidos en las salas de ambiente controlado donde se va a llevar a cabo su preparación. En la tabla 8 se resumen estos límites de contaminación en referencia al control de superficies e impronta de guantes. Los resultados de la monitorización del entorno microbiológico requieren un análisis para elucidar las tendencias de los datos. Asimismo, es necesario establecer unos niveles de aviso o alerta que permitan identificar cualquier tendencia adversa que pueda requerir una acción correctiva o preventiva. Estos niveles estarán establecidos por el usuario y definidos en el plan de monitorización.

6.3.7 Información de resultados

Los resultados de los cultivos del control microbiológico de superficies se expresarán de forma cuantitativa como ufc/placa en el caso de realizar la toma de muestra con placas Rodac de 55 mm de diámetro o laminocultivos. Por el contrario, los cultivos de las superficies muestreadas con hisopo y/o esponja se informarán sin recuento numérico. Finalmente, en el caso de haber realizado la identificación de las bacterias y/o hongos aislados en los cultivos se debe incluir esta información en los resultados.

6.4 REGISTROS

El plan de monitorización microbiológica, con toda la documentación relativa a los procedimientos de muestreo, equipos que deban utilizarse y guías para la interpretación e información de resultados, debe estar correctamente registrado y almacenado en medios físicos o digitales y fácilmente accesible para su consulta, durante el tiempo acordado. Los certificados de validación y calibrado periódico del muestreador volumétrico y de la calificación de estufas, deberán ser custodiados en el laboratorio. Los documentos en que se detalle el trabajo realizado (cuadernos, hojas de cálculo), informes parciales, finales y la información que se genere a partir de los datos brutos, debe quedar igualmente archivada y accesible.

Todo el personal que participe en alguna fase del proceso de monitorización ambiental, debe quedar debidamente identificado y registrado, respetando en todo caso la ley de protección de datos mediante el sistema de codificación que se acuerde (firmas, iniciales).

7. BIBLIOGRAFÍA

7.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vargas Balverde E. Condiciones de control, fuentes de contaminación y agentes desinfectantes empleados en una sala blanca. Revista Pensamiento Actual. Universidad de Costa Rica-Sede de Occidente. 2017; 17:99-107. ISSN Impreso: 1409-0112/ISSN Electrónico:2215-3586.
2. Veiga Álvarez E., Olmedo Illueca C., Lourdes Sánchez Castro M., Fernández Díaz M., Mauri López A., Ferrer i Robles E., et al. Control microbiológico ambiental en los laboratorios de reproducción humana asistida. Revista Iberoam Fert Rep Hum. 2021;38: 3-14. (<https://revistafertilidad.com/index.php/rif/article/view/14>)
3. Figueroa Rodríguez T, Gómez Carril M. Tecnología de aisladores y su aplicación en la industria farmacéutica. Rev Cubana Farm.2001; 35:136-43.
4. Sánchez-Vaqué A, Sánchez-Tilló MA. Reflexiones sobre las salas blancas en los hospitales. Hospitecnia. Revista de Arquitectura, Ingeniería, Gestión hospitalaria y sanitaria. 2020; Boletín 29 Salas blancas hospitalarias.

7.2. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria. Dirección General de Cartera Básica del Servicios del SNS y Farmacia. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)
2. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (<https://www.aemps.gob.es/industria-farmacautica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/>)
3. Guía para la Adaptación de las Buenas Prácticas en la Preparación y Manipulación de Medicamentos en la Comunidad Valenciana (Instalaciones). En: Guía de Buenas Prácticas en la Preparación y Manipulación de Medicamentos en la Comunidad Valenciana. Consejería de Sanidad Universal y Salud Pública de la Comunidad Valenciana.
4. Guías PIC/S *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products*. (<https://picscheme.org/docview/4205>)
5. *Guide to Good Manufacturing Practice for Medical Products*. Part I and Part II. Pharmaceutical Inspection Convention. Mayo 2021.
6. *Guide to the Quality and Safety of Tissues and Cells for Human Application*. 4th edition. (<https://www.edqm.eu/en/news/new-guide-quality-and-safety-tissues-and-cells-human-application>)
7. *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* (EDQM). ISBN 978-92-871-8945-5. (www.edqm.eu)
8. Real Decreto-Ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

9. Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios (RITE). Real Decreto 178/2021, de 23 de marzo.
10. UNE 171340 Validación y Cualificación de las Salas de Ambiente Controlado en los Hospitales.
11. UNE-EN 17141:2021 Salas Limpias y Ambientes Controlados. Control de la biocontaminación.
12. UNE-EN ISO 14644 Salas Limpias y Locales Anexos Controlados.
13. UNE-EN ISO 18593:2018 Microbiología de la cadena alimentaria. Métodos horizontales para toma de muestras en superficies.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-SB-01

Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la realización de los cultivos ambientales de aire en las salas blancas de ámbito hospitalario.

Este procedimiento es aplicable a todos los servicios y laboratorios de Microbiología Clínica que realicen cultivos ambientales de aire en zonas de ambiente controlado.

2. FUNDAMENTO

En la actualidad se ha hecho habitual el trabajo en salas blancas o de ambiente controlado en los hospitales, diseñadas para mantener bajos niveles de contaminación. En salas de preparación de productos parenterales, citostáticos, radiofármacos, laboratorios de fecundación asistida o bancos de sangre y tejidos, es necesario un control exhaustivo de las condiciones ambientales, para minimizar los riesgos de contaminación del producto final, garantizando la seguridad del paciente. El buen funcionamiento de una sala de ambiente controlado puede medirse por el número de partículas viables presentes en el aire, que tendrá unos límites admisibles en función del riesgo del procedimiento que se realiza en las mismas.

Todos las Unidades que cuentan con salas blancas deben tener un plan de control ambiental, que evalúe y controle los factores que suponen un riesgo para la contaminación microbiológica y que garantice la eficacia de las medidas implantadas.

La técnica recomendada de muestreo del aire en salas blancas es la captación con muestreador de aire volumétrico. En las cabinas de flujo laminar, la monitorización microbiológica se lleva a cabo mediante el método de sedimentación en placa.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Salas Limpias y Locales Anexos Controlados. Parte 1: Clasificación de la Limpieza del Aire Mediante la Concentración de Partículas. (ISO 14644-1:2015).
2. UNE-EN 17141:2021. Salas Limpias y Ambientes Controlados Asociados. Control de la Biocontaminación.
3. UNE 171340. Validación y Cualificación de las Salas de Ambiente Controlado en los Hospitales.
4. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles (<https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/>)
5. Recomendaciones para la Monitorización de la Calidad microbiológica del Aire (Bioseguridad Ambiental) en Zonas Hospitalarias de Riesgo. Sociedad Andaluza de Medicina Preventiva y Salud Pública. Marzo 2016. (<https://www.sociedadandaluzapreventiva.com/wp-content/uploads/Recomendaciones-Bioseguridad.pdf>)

4. MUESTRAS

Para la toma de muestras de aire de las salas, se utilizará el muestreador volumétrico por impacto. El aire pasará a través del cabezal e impactará en el medio de cultivo colocado dentro. Se recomienda configurar el muestreo para un caudal de aspiración de 100 L/minuto, durante 10 minutos; el objetivo es muestrear 1 m³ de aire. Si cuenta con inicio retardado, se seleccionará un tiempo adecuado para salir de la sala antes de que inicie

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

el funcionamiento (15 segundos puede ser suficiente). Como norma general, la toma se hará en el centro de la sala, a la altura de trabajo (1,5 metros aproximadamente). En función de la extensión de la sala, puede ser necesario tomar más de una muestra (ver tabla 1). El cabezal será desinfectado con alcohol y gasa estéril en cada cambio de placa y esterilizado por autoclave al final de cada jornada de trabajo.

Tabla 1. Medición de aire en función de la superficie de la sala

*Superficie de sala limpia en m ²	Número mínimo de ubicaciones para mediciones de aire activo
≤ 8	1
> 8 ≤ 28	2
> 28 ≤ 52	3
> 52 ≤ 68	4
> 68 ≤ 104	5
> 104 ≤ 148	6
> 148 ≤ 232	7
> 232 ≤ 436	8
> 436 ≤ 1000	9
> 1000	A determinar usando la fórmula N_L

*Tomado de la norma UNE-EN 17141:2021

$$N_L = [27X(A/1000)] / 3$$

donde

NL es el número mínimo de ubicaciones de muestreo a evaluar, redondeando al número entero superior

A es la superficie de la sala limpia en m²

Dentro de las cabinas de flujo laminar, se realizará la toma de muestras mediante el método de sedimentación en placa. Consiste en dejar una placa con medio de cultivo abierta, sobre la zona central de la repisa horizontal de la cabina, estando esta en funcionamiento, durante un periodo que puede oscilar entre 1 y 4 horas. Si el procedimiento a monitorear conlleva más de 4 horas, se sustituirá por una nueva placa. Si se considera necesario, puede emplearse simultáneamente más de una placa identificando la zona de muestreo (ejemplo, izquierda/derecha).

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

El medio de cultivo recomendado para el control ambiental es el agar triptona de soja (TSA), en el que crecen tanto bacterias como hongos y levaduras. Existe una variedad de agar TSA irradiado y de triple embolsado (TSA3), que permite la eliminación sucesiva de las envolturas al acceder a zonas de mayor clasificación. Este agar está especialmente fabricado para la monitorización ambiental y es deseable su uso, si bien su coste es superior al del agar TSA estándar. Es altamente recomendable añadir una segunda placa con medio Sabouraud suplementado con antibióticos (cloramfenicol y gentamicina) para mejorar la recuperación de hongos, ya que permitirá un cultivo específico de los mismos a temperatura adecuada;

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

Reactivos y productos:

- Papel de film tipo Parafilm ®
- Azul de lactofenol
- Cinta adhesiva tipo celo
- Gasas estériles
- Alcohol 70°

6. APARATOS Y MATERIAL

- Muestreador volumétrico de aire
- Estufas en rango 35-37°C
- Estufas en rango 25-31°C
- Autoclave
- Microscopios
- Lupa
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pinzas
- Tijeras

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las placas una vez finalice la impactación de aire, se sacarán del muestreador con cuidado de no contaminarlas y se procederá al sellado inmediato con papel film. Se trasladarán al laboratorio tan pronto como sea posible. La identificación de cada muestra debe ser precisa, indicando la sala o zona donde se ha tomado, y el sistema de registro en el SIL debe facilitar consultar el histórico de los resultados de cada sala o cabina, con objeto de poder realizar seguimiento de tendencias en cada punto de muestreo.

Es recomendable incluir una placa sin inocular como control negativo de cada uno de los lotes empleados que deberá ser procesada simultáneamente y del mismo modo que las que han sido inoculadas/impactadas.

7.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Recuento de bacterias mesófilas: se incubará durante 72 horas en estufa convencional en un rango de temperatura de 35-37°C.

Recuento de hongos: se incubará durante 5-7 días en estufa convencional, en un rango de temperatura de 25 – 31°C ± 1°C. Opcionalmente, se puede hacer una primera incubación a 37°C ± 1°C durante 24 – 48 horas, para favorecer el crecimiento de hongos termotolerantes, y una segunda a temperatura ambiente durante 2-5 días, procurando que el tiempo de incubación total sea de un mínimo de 5 días. Ver tabla en el Anexo 1 de este PNT.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

Se realizará lectura diaria de las placas, anotando los recuentos de hongos y bacterias. En el caso de los hongos es recomendable identificar las especies que puedan detectarse. Se identificarán también las especies bacterianas que crezcan en ambientes controlados de grado A y B, puesto que esta información es relevante para identificar el origen de la contaminación. Se evitará en lo posible retirar el papel de film para evitar la contaminación de las placas. Si es necesario abrirlas, debe hacerse en cabina de flujo laminar.

La espectrometría de masas MALDI-TOF, si bien es el método de identificación rápido de elección en los cultivos de bacterias y hongos patógenos humanos, puede presentar carencias en la identificación de especies ambientales. En esos casos, puede complementarse con pruebas bioquímicas y la observación de características morfológicas al microscopio o lupa (tinciones de Gram o con azul de lactofenol).

8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los valores límite de contaminación microbiológica son los que se muestran en la tabla del Anexo 2 de este PNT. Se debe tener en cuenta que son valores medios, y que una única muestra no es representativa de la situación real del ambiente estudiado, por ello es importante realizar un seguimiento de las tendencias en los diferentes puntos de muestreo.

8.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Recuento de bacterias aerobias mesófilas: si el recuento está dentro de los límites admisibles, se emitirá un único informe al final del periodo de incubación. En caso de sobrepasar los límites antes de la finalización del periodo de incubación, se emitirá un informe provisional con el recuento parcial.

Recuento de hongos: si el resultado es negativo (expresado como <1 ufc/m³ aire), se recomienda emitir al menos un informe preliminar las 48-72 horas y el informe final a los 7 días de incubación. El crecimiento de cualquier hongo debe informarse inmediatamente, junto a la identificación preliminar del mismo, para facilitar la puesta en marcha de las acciones correctivas que estén establecidas en el plan de control. En el caso de que no sea posible llegar a la identificación a nivel de especie, debe emitirse un informe indicando el crecimiento de hongos filamentosos o levaduriformes de origen ambiental no identificables mediante los métodos disponibles. Se procederá de igual manera en el caso de no poder identificar las bacterias que crezcan en grado A o B, indicando morfología (cocos, bacilos), tinción de Gram y cualquier otro atributo que se considere de interés.

En caso de cualquier crecimiento, deberá consultarse la tabla de conversión de Feller para informar del resultado cuantitativo. Es un método de corrección estadística basado en el principio de que, a mayor cantidad de microorganismos en cada toma de muestras, aumenta la probabilidad de que hayan penetrado varios de ellos por el mismo orificio del cabezal del muestreador de impacto. La cifra de recuento de microorganismos (r) se corrige aplicando la siguiente fórmula en la que está basada la tabla de conversión:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

$$Pr = N * \ln[(N+0,5)/(N-r+0,5)]$$

Donde:

N es el número de orificios de la tapa del muestreador

r es el número de unidades formadoras de colonia (ufc)

Pr es el número probable total de ufc

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento de toma de muestras y traslado al laboratorio deberá llevarse a cabo por personal técnico o de enfermería cualificado con entrenamiento específico. El control y procesamiento de las muestras será realizado por técnicos superiores de laboratorio clínico y biomédico. La supervisión de la técnica debe realizarla el facultativo responsable, que será el responsable de mantener actualizados los procedimientos, la elaboración e interpretación de resultados y su validación final.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Es fundamental que los equipos que se utilicen durante el proceso de monitoreo ambiental dispongan de un plan de mantenimiento, verificación y calibración. El muestreador volumétrico debe calibrarse periódicamente, según las recomendaciones del fabricante. Generalmente el equipo estará configurado para emitir una alarma cuando requiere calibración, en función del volumen total de aire aspirado o bien una vez pasado un tiempo determinado. Las estufas deben contar con un registro de control diario de la temperatura máxima y mínima, y recalificarse periódicamente.

La calidad de los medios de cultivo debe estar sujeta a un programa de control de calidad que garantice su esterilidad y capacidad para recuperar microorganismos presentes en muestras ambientales. De igual forma se deberán garantizar unas adecuadas condiciones de almacenamiento y control de caducidad. Las estufas deben contar con un registro de control diario de la temperatura máxima y mínima, y recalificarse periódicamente.

El plan de monitorización microbiológica y la documentación relativa a las comprobaciones periódicas de métodos e instrumentos, así como los informes emitidos y cualquier información generada a partir de estos datos, debe estar correctamente archivada y custodiada durante un periodo de tiempo acordado no inferior a dos años. Los registros deben incluir la identidad del personal que participa en todos los pasos del proceso de monitorización, que deberá estar específicamente formado para llevar a cabo estos procedimientos.

Estos registros podrán ser tanto en formato digital como en formato físico (papel).

11. BIBLIOGRAFÍA

1.Veiga Álvarez E, Olmedo Illueca C, Lourdes Sánchez Castro M, Fernández Díaz M, Mauri López A, Ferrer i Robles E, et al. Control microbiológico ambiental en los laboratorios de reproducción humana asistida. Revista Iberoam Fert Rep Hum. 2021; 38:3-14.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

ANEXO 1.**Medios de cultivo y condiciones de incubación recomendados para la toma de muestras de aire y superficies (ISO 171340)**

Microorganismos	Medios de cultivo	Temperatura	Tiempo de incubación
Bacterias aerobias	TSA*	35-37°C	3 días
Hongos	SDA**	OPCIÓN 1 1°- 37°C ± 1°C 2°- temperatura ambiente OPCIÓN 2 25°C-31°C ±1°C	1-2 días 2-5 días 5-7 días

(*) Agar triptona de soja

(**) Agar Sabouraud-dextrosa suplementado con antibióticos (cloranfenicol y/o gentamicina)

ANEXO 2.**Límites de contaminación microbiológica recomendados en función del grado de clasificación ambiental y tipo de muestra**

Límites de contaminación microbiológica recomendados (alerta/acción) ^a		
Grado	Muestra de aire impactado (ufc/m ³)	Placa de sedimentación diámetro 90 mm (ufc/ placa /4 horas) ^b
A	<1/NA	<1/NA
B	10/7	5/3
C	100/170	50/35
D	200/140	100/70

^a Valores medios^b El tiempo de exposición de las placas debe ser igual o inferior a 4 horas

NA: No aplicable

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

PNT-SB-02

Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la realización de los cultivos ambientales de superficies en las salas blancas de ámbito hospitalario.

Este procedimiento es aplicable a todos los servicios y laboratorios de Microbiología Clínica que realicen cultivos ambientales de superficies en zonas de ambiente controlado.

2. FUNDAMENTO

En la actualidad se ha hecho habitual el trabajo en salas blancas o de ambiente controlado en los hospitales, diseñadas para mantener bajos niveles de contaminación. En salas de preparación de productos parenterales, citostáticos, radiofármacos, laboratorios de fecundación asistida o bancos de sangre y tejidos, es necesario un control exhaustivo de las condiciones ambientales, para minimizar los riesgos de contaminación del producto final, garantizando la seguridad del paciente. En estos entornos controlados, las superficies como por ejemplo paredes, superficies de puestos de trabajo, cabinas de flujo laminar u otras superficies que puedan entrar en contacto con el producto, constituyen una potencial fuente de contaminación microbiológica. Por esta razón, el plan de monitorización microbiológica debe evaluar este riesgo y establecer las ubicaciones y frecuencias de muestreo de superficies, así como los niveles de alerta y actuación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. UNE-EN 17141:2021. Salas Limpias y Ambientes Controlados Asociados. Control de la Biocontaminación.
2. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles (<https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/>)
3. Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria. Dirección General de Cartera Básica del Servicios del SNS y Farmacia. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)
4. Guide to the Quality and Safety of Tissues and Cells for Human Application. 4th edition. (<https://www.edqm.eu/en/news/new-guide-quality-and-safety-tissues-and-cells-human-application>)

4. MUESTRAS

La toma de muestras se realizará mediante placas de contacto tipo Rodac para superficies planas y accesibles, y con hisopos o esponjas para superficies irregulares y de difícil acceso.

Las placas tipo Rodac son circulares, con un diámetro de 55 mm y contienen agar formando un menisco convexo. Para la toma de muestra, el agar nutritivo se coloca hacia la superficie a muestrear y se presiona de forma uniforme y continua durante 10 segundos, tras los cuales se retira y se cierra la placa. Alternativamente, se pueden emplear hisopos para el muestreo de superficies de difícil acceso en las que no es posible utilizar placas de contacto. Para realizar la toma de muestra, el hisopo se humedece en suero fisiológico estéril y se desplaza a lo largo de un área de superficie girándolo lentamente. Una vez finalizado el proceso, el hisopo es reintroducido en el tubo que contiene unos 10 ml de una disolución tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) con agentes neutralizantes (por ejemplo, Tween 80) y se cierra. Otra opción a contemplar para

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

llevar a cabo el muestreo, sobre todo en el caso de superficies de gran tamaño, es la utilización de esponjas pre-humedecidas con soluciones que contengan bloqueadores de los agentes antisépticos y/o desinfectantes.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Para el cultivo de superficies el medio recomendado es el agar TSA y para el aislamiento de hongos puede emplearse el medio selectivo Sabouraud-dextrosa (SDA). Los medios de cultivo deben incorporar agentes neutralizadores, como lecitina o Tween 80, para garantizar que los residuos de desinfectantes empleados en la limpieza de las superficies no inhiban el crecimiento de los microorganismos. La norma UNE-EN 17141:2021 también recomienda el uso de medios con irradiación terminal y con triple embolsado (TSA3) que permite la eliminación sucesiva de envueltas conforme se accede a zonas de mayor clasificación ambiental, con el fin de asegurar su esterilidad y la no introducción de microorganismos desde el exterior en las salas a muestrear.

- Papel de film tipo Parafilm ®
- Azul de lactofenol
- Colorantes para Tinción de Gram
- Cinta adhesiva tipo celo
- Gasas estériles

6. APARATOS Y MATERIAL

- Muestreador volumétrico de aire
- Estufas en rango 35-37°C
- Estufas en rango 25-31°C
- Autoclave
- Microscopios
- Lupa
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pinzas
- Tijeras

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las placas o los contenedores con medio líquido donde se ha resuspendido el contenido del hisopo o la esponja se sellarán con film de plástico para evitar contaminaciones durante su traslado. Las muestras se enviarán al Servicio o Laboratorio de Microbiología perfectamente identificadas y una vez allí se registrarán en el SIL para garantizar la trazabilidad dentro del laboratorio. En el caso de las muestras tomadas con hisopo o esponja se recomienda conservar estas muestras a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas si se va a retrasar el procesamiento.

7.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para el aislamiento de bacterias mesófilas, las placas de contacto tipo Rodac se incuban durante 72 horas en estufa convencional en un rango de temperatura de 35-37°C, revisándose los cultivos de forma diaria. Para el aislamiento de hongos, las placas se incubarán durante 5-7 días en estufa convencional, a

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

a 37°C ± 1°C durante 24 – 48 horas, para favorecer el crecimiento de hongos termotolerantes, y una segunda a temperatura ambiente durante 2-5 días, procurando que el tiempo de incubación total sea de un mínimo de 5 días. Ver tabla en el Anexo 1 de este PNT.

Para las muestras recogidas mediante hisopos o esponjas, las soluciones tamponadas se incuban a 35°C ± 2°C durante 18-24 horas. Transcurrido este tiempo se realiza un subcultivo en medio TSA o bien en medios selectivos en el caso de investigar la presencia de un microorganismo determinado. Posteriormente los medios de cultivo se incuban según las condiciones establecidas descritas anteriormente (ver Anexo 1 de este PNT) y se examinan diariamente.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

Se realizará lectura diaria de las placas, anotando los recuentos de hongos y bacterias en el caso de haber realizado la toma de muestra directamente con la placa Rodac. En el subcultivo realizado del medio con hisopo o esponja no se realiza recuento. Se evitará en lo posible retirar el papel de film para evitar la contaminación de las placas tipo Rodac. Si es necesario abrirlas, debe hacerse en cabina de flujo laminar. En ambientes controlados de grado A y B se realizará la identificación de los microorganismos aislados a nivel de género y especie. No se recomienda la realización de antibiogramas de forma rutinaria.

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS, si bien es el método de identificación rápido de elección en los cultivos de bacterias y hongos patógenos humanos, puede presentar carencias en la identificación de especies ambientales. En esos casos, si se considera necesario, puede complementarse con pruebas bioquímicas y la observación de características morfológicas de los hongos filamentosos al microscopio o lupa (tinciones de Gram o con azul de lactofenol). En el caso que no sea posible llegar a una identificación de las especies ambientales, los aislamientos se pueden informar como bacterias grampositivas, gramnegativas, hongos levaduriformes u hongos filamentosos.

8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los valores límite de contaminación microbiológica para los cultivos de superficies realizados mediante placas Rodac son los que se muestran en la tabla del Anexo 2 de este PNT. Se debe tener en cuenta que son valores medios, y que una única muestra no es representativa de la situación real del ambiente estudiado.

La interpretación de los cultivos de superficies, realizados a partir de muestras tomadas con hisopos o esponjas, se realizarán de forma cualitativa por tratarse de cultivos con pre-incubación para favorecer la revivificación de los microorganismos lesionados en los procesos de limpieza y/o desinfección. En este caso no hay descritos valores límites de contaminación microbiológica para las salas de ambiente controlado. En general, y debido a que no hay descritos límites en la literatura, será importante estudiar las tendencias en cada uno de los puntos muestreados, razón por la cual la identificación microbiana será importante, al igual que las recomendaciones que puede proporcionar el especialista en Microbiología en función de los aislamientos identificados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

8.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- **Control microbiológico de superficies realizados mediante placas Rodac de 55 mm de diámetro:** los resultados de los cultivos se expresarán de forma cuantitativa como ufc/placa. En el caso de emplear únicamente agar TSA se informará un único recuento de colonias que incluya bacterias mesófilas y hongos; no obstante, siempre que sea posible, deberían emplearse medios diferenciados ya que no todos los hongos son capaces de crecer en agar TSA. Si al finalizar el periodo de incubación no se observa crecimiento en el medio de cultivo el resultado se informará como <1 ufc/placa. Finalmente, en el caso de haber realizado la identificación de las bacterias y/o hongos aisladas en los cultivos (ambientes controlados de grado A y B) se debe incluir esta información en los resultados.

- **Control microbiológico de superficies realizados con hisopos o esponjas:** los cultivos se informarán sin recuento de colonias. Finalmente, en el caso de haber realizado la identificación de las bacterias y/o hongos aislados en los cultivos (ambientes controlados de grado A y B) se debe incluir esta información en los resultados.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento de toma de muestras y traslado al laboratorio deberá llevarse a cabo por personal técnico o de enfermería cualificado con entrenamiento específico. El control y procesamiento de las muestras será realizado por técnicos superiores de laboratorio clínico y biomédico. La supervisión de la técnica debe realizarla el facultativo responsable, que será el responsable de mantener actualizados los procedimientos, la elaboración e interpretación de resultados y su validación final.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La calidad de los medios de cultivo debe estar sujeta a un programa de control de calidad que garantice su esterilidad y capacidad para recuperar microorganismos presentes en muestras ambientales. De igual forma se deberán garantizar unas adecuadas condiciones de almacenamiento y control de caducidad. Las estufas deben contar con un registro de control diario de la temperatura máxima y mínima, y recalificarse periódicamente.

El plan de monitorización microbiológica y la documentación relativa a las comprobaciones periódicas de métodos e instrumentos, así como los informes emitidos y cualquier información generada a partir de estos datos, debe estar correctamente archivada y custodiada durante un periodo de tiempo acordado, generalmente no inferior a dos años. Los registros deben incluir la identidad del personal que participa en todos los pasos del proceso de monitorización, que deberá estar específicamente formado para llevar a cabo estos procedimientos. Estos registros podrán ser tanto en formato digital como en formato físico (papel).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. UNE-EN ISO 18593:2018. Microbiología de la Cadena Alimentaria. Métodos Horizontales para Toma de Muestras en Superficie

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de superficies en salas blancas (células humanas, productos farmacéuticos, reproducción asistida)	PNT-SB-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

ANEXO 1. Medios de cultivo y condiciones de incubación recomendados para la toma de muestras de aire y superficies (ISO 171340)

Microorganismos	Medios de cultivo	Temperatura	Tiempo de incubación
Bacterias aerobias	TSA*	35-37°C	3 días
Hongos	SDA**	OPCIÓN 1 1° -37 °C ± 1 °C 2° – temperatura ambiente	1-2 días 2-5 días
		OPCIÓN 2 25-31°C ±1°C	5-7 días

(*) Agar triptona de soja

(**) Agar Sabouraud-dextrosa suplementado con antibióticos (cloranfenicol y/o gentamicina)

ANEXO 2. Límites de contaminación microbiológica recomendados en función del grado de clasificación ambiental y tipo de muestra

Límites de contaminación microbiológica recomendados (alerta/acción) ^a		
Grado	Placa de contacto diámetro 55 mm (ufc/placa) ^b	Impresión de guantes: 5 dedos (ufc/guante)
A	<1 NA	<1/NA
B	5/3	5/3
C	25/17	NA/NA
D	50/35	NA/NA

^a Valores medios

^b El tiempo de exposición de las placas debe ser igual o inferior a 4 horas

NA: no aplicable