

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

42.

**Control microbiológico
ambiental**

2 0 1 2

Coordinadora: Carmen Ezpeleta Baquedano

Autores: José Luis Barrios Andrés
Alberto Delgado-Iribarren García-Campero
Carmen Ezpeleta Baquedano



ISBN- 978-84-616-0424-1

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO:

1. Introducción

2. Control microbiológico ambiental: consideraciones generales

3. Control microbiológico del aire: quirófanos y unidades de inmunodeprimidos

- 3.1. Consideraciones clínicas
- 3.2. Recogida de la muestra
- 3.3. Frecuencia del muestreo
- 3.4. Transporte y conservación de la muestra
- 3.5. Procesamiento de la muestra
- 3.6. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 3.7. Criterios para la interpretación de los resultados
- 3.8. Información de los resultados

4. Control microbiológico de agua: unidades de diálisis

- 4.1. Consideraciones clínicas
- 4.2. Recogida de la muestra
- 4.3. Transporte y conservación de la muestra
- 4.4. Procesamiento de la muestra
- 4.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 4.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 4.7. Información de los resultados

5. Control microbiológico de procesos de desinfección y esterilización de endoscopios

- 5.1. Consideraciones clínicas
- 5.2. Recogida de la muestra
- 5.3. Transporte y conservación de la muestra
- 5.4. Procesamiento de la muestra
- 5.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 5.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 5.7. Información de los resultados

6. Control microbiológico ambiental en brotes de infección relacionados con la asistencia sanitaria

- 6.1. Consideraciones clínicas
- 6.2. Recogida de la muestra
 - 6.2.1. Superficies inanimadas o sólidas
 - 6.2.2. Muestras del personal sanitario
 - 6.2.3. Soluciones líquidas
- 6.3. Transporte y conservación de la muestra
- 6.4. Procesamiento de la muestra
- 6.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 6.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 6.7. Información de los resultados

7. Bibliografía

- 7.1. Introducción
- 7.2. Control microbiológico del aire
- 7.3. Control microbiológico del agua: unidades de diálisis
- 7.4. Control microbiológico de procesos de desinfección y esterilización de endoscopios
- 7.5. Control microbiológico ambiental en brotes de infección relacionados con la asistencia sanitaria

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- 1. PNT-MA-01. Control microbiológico del aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos**
- 2. PNT- MA-02. Control microbiológico del agua en unidades de diálisis**
- 3. PNT- MA-03. Control microbiológico de endoscopios**
- 4. PNT- MA-04. Control microbiológico de la colonización bacteriana y fúngica de las manos**

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

42. CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL. 2012

Coordinadora: Carmen Ezpeleta Baquedano

Autores: José Luis Barrios Andrés
Alberto Delgado-Iribarren García-Campero
Carmen Ezpeleta Baquedano

1. INTRODUCCIÓN

El medio ambiente hospitalario contiene numerosos microorganismos pero sólo en algunos casos se ha demostrado claramente una relación causa-efecto entre la presencia de microorganismos en este medio y el desarrollo de infección en humanos. Los patógenos para los que existe mayor evidencia de su capacidad de sobrevivir en reservorios ambientales son *Clostridium difficile*, enterococo, incluyendo los resistentes a la vancomicina, y *Staphylococcus aureus*, incluyendo los resistentes a la metilicina.

El control microbiológico ambiental sistemático no está recomendado. Algunos organismos internacionales con autoridad en el campo del control de la infección relacionada con la asistencia sanitaria como los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), no suelen recomendar la realización de este tipo de cultivos y los reservan para situaciones especiales en las que pueda haber indicios de que algún objeto o material ambiental tenga relación con el inicio o posterior mantenimiento de casos de infección nosocomial.

Los cultivos ambientales deben estar orientados a la vigilancia y control de la infección nosocomial. En este sentido, se incluyen en este documento por un lado cultivos de vigilancia de unidades críticas como quirófanos y unidades de inmunodeprimidos, unidades de diálisis o cultivos de dispositivos críticos y semicríticos y por otro los cultivos ambientales de control relacionados con el estudio de brotes de infección nosocomial. Los cultivos de agua para búsqueda y control de *Legionella* spp. no se han incluido en este documento porque ya han sido tratados en el procedimiento microbiológico de la SEIMC nº 20 (2ª edición): "Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis".

2. CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL: CONSIDERACIONES GENERALES

Los CDC en su documento relativo al control ambiental recomiendan la utilización de ocho criterios bien definidos para relacionar una fuente ambiental con la transmisión de microorganismos que causan infección.

La mera presencia de microorganismos en el cultivo de una superficie u objeto inanimado no es suficiente para considerarlo como causa de un brote y recomiendan tener en cuenta los principios básicos de los componentes de la cadena de infección para que se puedan producir casos de infección relacionados con el medio ambiente hospitalario (ver esquema).

La presencia cada vez más frecuente de pacientes inmunodeprimidos, junto con actividades de construcción en los hospitales (obras de renovación o la presencia de obras en áreas próximas) pueden provocar infecciones relacionadas con transmisión aérea por hongos filamentosos que afectan a estos pacientes. También el agua puede ser responsable de la transmisión de estos microorganismos.

Están bien documentados los casos de infecciones del lugar quirúrgico en cirugía cardíaca relacionados con la presencia de hongos filamentosos en el aire del quirófano por un mantenimiento inadecuado de los sistemas de ventilación o de los aparatos del propio quirófano. En las unidades de trasplante de medula ósea también está documentada la presencia de infecciones por hongos filamentosos relacionadas con las infraestructuras sanitarias.

En el caso de las unidades de diálisis tanto la presencia de microorganismos como la de endotoxinas liberadas por las bacterias en el agua de diálisis pueden producir efectos secundarios sobre los pacientes como bacteriemia o reacciones a pirógenos, de ahí la necesidad de realizar controles microbiológicos sistemáticos para asegurar un buen mantenimiento del sistema. Tanto la AAMI (*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*), como la Farmacopea Europea o la Sociedad Española de Nefrología han publicado recomendaciones sobre el método de control microbiológico en los que se incluyen tanto los cultivos como la detección de endotoxinas.

En relación a las endoscopias se han descrito tanto infecciones provocadas por microbiota endógena relacionada con el lugar en el que se ha realizado el procedimiento, como producidas por microorganismos exógenos introducidos a partir de deficiencias en los procesos de limpieza, desinfección, aclarado, secado o reprocesamiento en sistemas automáticos de desinfección por numerosos microorganismos incluyendo bacilos gramnegativos, sobre todo *Pseudomonas* spp., micobacterias, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C.

Por último se han documentado brotes de infección nosocomial relacionados con la contaminación de dispositivos, aparatos, fármacos o fluidos que se han podido constatar utilizando técnicas adecuadas de cultivo y tipado molecular.

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Presencia de un número adecuado de microorganismos patógenos (dosis)2. Microorganismos con suficiente virulencia3. Presencia de un huésped susceptible4. Un modo eficiente de transmisión del microorganismo desde la fuente de infección hasta el huésped susceptible5. Presencia de una puerta de entrada adecuada en el huésped. |
|--|

3. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE: QUIRÓFANOS Y UNIDADES DE INMUNODEPRIMIDOS

3.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Los pacientes inmunodeprimidos, particularmente los pacientes con neutropenia profunda y prolongada tienen riesgo de contraer infecciones invasivas por hongos filamentosos. Estas infecciones se adquieren por vía inhalatoria si en el aire que respiran hay esporas de hongos.

Los hongos filamentosos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sus esporas pueden permanecer suspendidas en el aire durante largos periodos de tiempo. Cuando hay obras en el hospital o en áreas próximas, el riesgo de infección aumenta porque aumenta el número de esporas en suspensión. Estas esporas pueden eliminarse del aire utilizando sistemas de ventilación con filtros de alta eficacia. Por este motivo se diseñan en los hospitales unidades de atención a pacientes neutropénicos con unas condiciones especiales de ventilación, para que se filtre el aire y esté libre de esporas de hongos.

El género *Aspergillus* y particularmente *Aspergillus fumigatus* es el que mayor número de infecciones causa, seguido de *Aspergillus flavus*. Los hongos filamentosos distintos de *Aspergillus* spp. o mucorales como *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp. suponen hasta un 10% de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) en los pacientes trasplantados de médula ósea y hasta un 19% en aquellos con trasplante de órgano sólido.

Para asegurar que las unidades de pacientes neutropénicos estén libres de hongos se recomienda realizar cultivos de aire de manera periódica para garantizar el buen mantenimiento y uso de las instalaciones y especialmente cuando haya obras próximas.

En los quirófanos, se pueden producir infecciones del lugar quirúrgico por hongos filamentosos si el aire del quirófano tiene esporas que pueden acceder al campo quirúrgico durante la intervención. Por este motivo el aire del quirófano debe ser filtrado. En general en los quirófanos hay 3 niveles de filtración: prefiltros, filtros de segundo nivel de alta eficacia y filtros HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) terminales. De acuerdo a la eficiencia de filtración y por tanto a la pureza del aire del quirófano hay varios tipos de quirófanos cada uno de ellos recomendado para un tipo de cirugía como se indica a continuación.

Clasificación de los quirófanos:

De acuerdo a la normativa ISO 14664-1, los quirófanos se clasifican en los siguientes grupos atendiendo a la idoneidad de las instalaciones y al sistema de ventilación para cada tipo de cirugía:

- Clase A ISO 6: cirugía especial que incluye aquellos quirófanos de cirugía ortopédica en los que se implantan prótesis, neurocirugía, cirugía cardíaca, cirugía vascular con prótesis o trasplante de órganos.
- Clase B ISO 7: cirugía convencional
- Clase C ISO 8: cirugía ambulatoria, partos

Los cultivos sistemáticos de aire deben realizarse exclusivamente en unidades con sistemas de ventilación con filtro HEPA terminal en el aire de entrada, en los que no hay entrada de aire exterior, y en los que haya pacientes en riesgo, es decir en las unidades de inmunodeprimidos y en los quirófanos. No se debe utilizar como un sustitutivo de controles físicos de los sistemas de ventilación.

Por otra parte no existe un consenso internacional sobre el número de mediciones y la forma de hacer los cultivos y tampoco se ha demostrado una correlación entre los niveles detectados y la presencia de infecciones.

3.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Para la toma de muestras se recomienda el método volumétrico por impacto y aspiración con un volumen de 1000 litros de aire en cada toma. Los aparatos que se utilizan en el muestreo se basan en el muestreador de Andersen. El sistema aspira e impulsa un caudal de aire de 100 L/minuto a través de un cabezal perforado con numerosos orificios que impactan sobre la superficie de una placa de cultivo. No se recomienda el cultivo por sedimentación.

Cada vez que se vaya a tomar una muestra previamente hay que desinfectar el cabezal del aparato por donde se aspira el aire o bien esterilizarlo si se tienen suficientes cabezales de repuesto. La placa con el medio de cultivo se coloca en la parte superior del aparato por debajo del cabezal de aspiración.

Para el muestreo habitual de quirófano se realizan dos tomas de muestras para recuento de hongos, una con el quirófano vacío y otra durante la actividad quirúrgica. La muestra que se toma con el quirófano vacío sirve para valorar la climatización y estructura. La muestra que se toma durante la actividad quirúrgica sirve para valorar además la circulación del personal en el quirófano, la limpieza de los aparatos del quirófano o contaminaciones provenientes del entorno.

Cuando se está estudiando la fuente de contaminación tras encontrar cultivos positivos en el muestreo convencional también son útiles las tomas de muestras realizadas en las zonas de impulsión del aire y en el centro del quirófano, para discriminar si se trata de una contaminación del sistema de ventilación o de algún problema durante la actividad del propio quirófano. La forma de tomar la muestra será la misma que para el muestreo habitual.

Cuando se quiere descartar que la fuente de contaminación del aire del quirófano sean los aparatos con ventilador que están funcionando dentro del quirófano se puede realizar una toma de muestra del propio ventilador mediante una torunda impregnada en medio de cultivo líquido.

Además de los cultivos de aire para hongos se pueden realizar cultivos de aerobios para comprobación del buen funcionamiento del sistema de ventilación.

3.3. FRECUENCIA DEL MUESTREO

No existe un consenso universalmente aceptado sobre la frecuencia óptima de muestreo para hongos. En nuestro país varias Comunidades Autónomas han elaborado recomendaciones sobre el tema.

En los quirófanos la frecuencia de muestreo para recuento de hongos depende del tipo de quirófano según la clasificación anteriormente descrita.

En los quirófanos de clase A de cirugía especial se recomienda una toma mensual. En los quirófanos de clase B de cirugía convencional se recomienda una menor frecuencia cada 3 o 6 meses y en los de clase C no se recomienda realizar controles sistemáticos.

En las unidades de trasplante de médula ósea se recomienda realizar un muestreo para hongos al menos cada 6 meses.

Además de los cultivos de muestreo convencional está indicado el muestreo ambiental del quirófano/unidad de inmunodeprimidos para hongos antes de poner en marcha la instalación, cuando haya obras en la proximidad, cuando se haya encontrado algún caso de infección con sospecha de tener su origen en el quirófano/unidad de inmunodeprimidos o cuando en los controles rutinarios se haya encontrado la presencia de hongos. En estas situaciones se determinará la frecuencia del muestreo en cada caso teniendo en cuenta los posibles factores que incidan en la contaminación, no hay una norma aplicable a todos los casos.

La realización de cultivos para recuento de aerobios está muy cuestionada. Sólo se debe realizar antes de poner en marcha una nueva instalación de quirófano o unidad de inmunodeprimidos para validar la eficacia del filtrado de aire, o en alguna situación especial de brote. No se recomienda su realización sistemática.

3.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La placa con medio de cultivo que está colocada en el aparato muestreador, debe retirarse del mismo, teniendo cuidado de no contaminarla. Se le colocará la tapa y se sellará con papel film (Parafilm®) para evitar contaminaciones en su traslado.

Las muestras se enviarán al Servicio de Microbiología bien identificadas indicando el quirófano donde se ha realizado la toma de muestras y si es con quirófano vacío o durante la actividad quirúrgica. Es conveniente asignar un número de entrada fijo a cada quirófano del hospital en el sistema informático del laboratorio (SIL) para poder tener un histórico de los cultivos de cada quirófano.

3.5. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

En cuanto se reciban las muestras en el Servicio de Microbiología se incubarán en estufa convencional. Se realizarán lecturas diarias de las placas para detectar crecimiento lo antes posible. Se tendrá cuidado al mover las placas que tengan crecimiento para evitar siembras secundarias y no alterar el recuento de colonias.

Recuento de hongos: en cada lectura se realizará el recuento de colonias y la posterior identificación siguiendo los métodos habituales de identificación de hongos. Conviene realizar una identificación presuntiva rápida mediante la visualización del aspecto de las colonias a la lupa y la observación microscópica con azul de lactofenol.

Recuento de aerobios: en cada lectura se realizará el recuento de colonias sin identificación de los microorganismos.

3.6. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Cultivo de hongos filamentosos: se recomienda un medio selectivo como la placa de Sabouraud con cloranfenicol y gentamicina. Se incubará a 30°C ó 37°C durante 7 días en estufa convencional con lectura diaria. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos ambientales oportunistas es de 30°C. Si existe indicación epidemiológica de investigar una especie fúngica termotolerante como *Aspergillus fumigatus* será conveniente utilizar la incubación a 37°C para inhibir el crecimiento de otros hongos ambientales.

Recuento de aerobios: se utilizará una placa de agar sangre que se incubará a 35°C durante 48 horas en estufa convencional.

3.7. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cultivo de hongos filamentosos: los valores admisibles para hongos filamentosos son 0 ufc/m³. Al no existir una normativa aceptada universalmente hay discrepancias en la literatura en cuanto a si hay que valorar todos los hongos filamentosos o sólo *Aspergillus* spp. A nuestro entender habría que valorar la presencia de cualquier tipo de hongo filamentosos, debido a que su presencia es un indicador indirecto de un mal funcionamiento o mantenimiento del sistema de ventilación, de la limpieza o de la circulación de aparatos y personas en el quirófano. Por otro lado no sólo el género *Aspergillus* es capaz de producir infecciones en pacientes quirúrgicos e inmunodeprimidos, aunque sea el género más frecuente.

Recuento de aerobios: los valores de bioseguridad admisibles dependen también del tipo de quirófano (se indican en unidades formadoras de colonias (ufc) por m³):

- Ambiente muy limpio <10 ufc/m³
- Ambiente limpio <10-100 ufc/m³
- Ambiente aceptable 100-200 ufc/m³

En los quirófanos de clase A se debe garantizar un ambiente muy limpio

3.8. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Recuento de hongos: si el resultado es negativo se realizarán informes provisionales durante la incubación y el informe definitivo a los 7 días.

Si se obtiene un resultado positivo es importante realizar un informe provisional rápido tras realizar las técnicas rápidas de identificación previamente descritas, indicando el recuento de colonias y el

género del hongo independientemente de que se tarde más tiempo en la identificación definitiva del hongo a nivel de especie. Por ejemplo, "Se aíslan 2 ufc de *Aspergillus* spp./m³".

Esta información precoz permitirá tomar decisiones rápidas sobre la actividad quirúrgica y diagnóstico del estado del quirófano en cuanto a sistema de ventilación, limpieza, etc.

Recuento de aerobios: se realizará un único informe a las 48 horas indicando el número de ufc.

En los informes debe figurar la información de qué quirófano se trata y si la muestra se tomó con el quirófano vacío o durante la actividad quirúrgica.

4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AGUA: UNIDADES DE DIÁLISIS

4.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

El agua que se emplea para la hemodiálisis es un elemento fundamental del proceso pues se pone en contacto con la sangre a través de la membrana semipermeable del dializador permitiendo el intercambio de sustancias de forma bidireccional. Realmente se trata de una solución electrolítica isotónica preparada a partir de agua purificada y concentrados electrolíticos o sales no disueltas con una composición electrolítica similar al plasma, denominado líquido de diálisis (LD), cuya calidad y pureza es crítica para una adecuada hemodiálisis. De no ser así el paciente se expone a un riesgo de acumular sustancias tóxicas o infecciones dando lugar a complicaciones tanto agudas como crónicas, incluyendo fenómenos de biocompatibilidad. De hecho la sangre de los pacientes entra en relación con el LD, aunque esté separada por la membrana del dializador, en unas cantidades mínimas entre los 120 a 150 litros por sesión de diálisis, superándose ampliamente dichas cifras con las técnicas utilizadas actualmente. Actualmente se habla de LD ultrapuro cuando se obtiene a partir de agua altamente purificada o ultra pura, a la cual se aplican unos controles microbiológicos más estrictos.

La producción del LD se realiza habitualmente a partir del agua de la red pública, por lo que la mayoría de las complicaciones suelen ser consecuencia de los contaminantes contenidos en la misma y que dependen de los métodos utilizados para su depuración y potabilización así como de las sustancias tales como el cloro que pueden dar lugar a la aparición de complicaciones como la metahemoglobinemia. De manera retrospectiva, algunas de las principales complicaciones dependientes del agua que se han demostrado son las reacciones a pirógenos, el síndrome del agua dura y la intoxicación por aluminio. Todas estas complicaciones han llevado a un progresivo perfeccionamiento en la obtención y producción del agua a emplear en el LD para minimizar la posible iatrogenia.

La pureza y calidad del LD es la consecuencia de una compleja cadena de procesos que incluyen la preparación, la distribución y el almacenamiento que deben diseñarse para minimizar el riesgo de contaminación química y microbiológica. En este

documento se abordarán exclusivamente los aspectos relacionados con la contaminación microbiológica, pues es la función que suele desarrollarse en los laboratorios de microbiología clínica, pero es importante resaltar que el control del proceso incluye otros aspectos de igual importancia que se analizan en otros laboratorios. Así, hay que determinar unos niveles máximos admisibles de endotoxinas, inferiores a 0,25 UE/ml (unidades de endotoxinas por ml). Las endotoxinas se titulan mediante una prueba basada en la activación de un lisado de amebocitos *Limulus* referido al estándar de *Escherichia coli* O:113:H10, según la Real Farmacopea Española (RFE), que son componentes bacterianos de la pared celular de algunas bacterias gramnegativas, con actividad pirógena y suelen ser cuantificadas mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL). Además es fundamental la cuantificación de contaminantes químicos: aluminio, antimonio, arsénico, bario, berilio, cadmio, calcio, cloraminas, cloro libre, cromo, cobre, cianida, fluor, magnesio, mercurio, nitrato, plata, plomo, potasio, selenio, sodio, sulfato, talio y zinc. Todos ellos deben ajustarse a una concentración establecida y a una conductividad máxima según especifica la RFE. Por lo tanto el control de calidad del LD es un procedimiento complejo del cual tan sólo se tratarán aquí los aspectos relacionados con los cultivos microbiológicos.

4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Para el control microbiológico del sistema de agua se deben tomar muestras de diferentes puntos del proceso de producción del LD y su periodicidad varía según las circunstancias. Se distinguen dos periodos:

1. Una primera fase denominada de validación, después de su instalación o de una reparación importante por haberse detectado niveles elevados de contaminación que han obligado a una acción correctora.

2. Una fase de mantenimiento de un sistema en su funcionamiento rutinario.

En la fase de validación los controles microbiológicos del agua purificada o altamente purificada se realizan semanalmente durante los dos primeros meses, y si todo es correcto se pasa a la fase de mantenimiento, en la cual se ha de llevar a cabo al menos una vez al mes. Los controles del nivel de endotoxinas se realizarán mensualmente tanto en el periodo de validación como en el de mantenimiento. Las tomas de los puertos de toma de agua de los monitores se deberán realizar al comienzo de la sesión de diálisis.

Cada centro debe establecer un protocolo consensuado entre los servicios de medicina preventiva, nefrología y microbiología que establezca la periodicidad, metodología, control de calidad y responsabilidades de estos controles.

El muestreo para cultivos microbiológicos en el periodo de validación debe incluir el agua de aporte, el agua descalcificada, el agua tratada a la salida de

la osmosis y en el punto más próximo al final del anillo de distribución. Además, en un mínimo de un 20% de los monitores de la toma de agua, a la entrada al dializador y del drenaje.

En el periodo de mantenimiento no es necesario tomar muestras en la zona de pretratamiento, a menos que se detecte contaminación significativa del agua tratada.

Para el estudio de endotoxinas se requieren muestras del agua tratada a la salida de la osmosis, en el punto más próximo al final del anillo de distribución y al menos en el 10% de los monitores de la toma de agua. Estos son los requisitos mínimos, pero puede haber guías locales más exigentes en cuanto al muestreo y su periodicidad.

El punto de muestreo no debe limpiarse con desinfectantes del tipo hipoclorito u otros ácidos, siendo admisible el empleo de alcohol al 70% permitiendo después su evaporación. También se recomienda el uso de guantes estériles y que la recogida se realice entre dos personas, tratando de minimizar la contaminación cruzada, y en caso de emplear instrumentos para abrir la válvula de seguridad estos deben haber sido esterilizados previamente. En cada punto de muestreo de agua de diálisis se debe dejar correr el chorro durante al menos un minuto hasta que drene una cantidad fija de agua, pues la primera porción suele tener una carga bacteriana mayor. La muestra ha de recogerse en un contenedor estéril (por ejemplo, frasco de urocultivo de 50 ml), con la sistemática habitual de la toma de muestras para microbiología (asepsia, etiquetado,...).

Para determinar la carga bacteriana del agua o LD ultrapura, es necesario que se recoja un volumen de agua superior a un litro en un contenedor adecuado estéril.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Como en cualquier procedimiento microbiológico es fundamental la celeridad en el procesamiento de las muestras para obtener resultados exactos y fiables. En este caso, al ser un procedimiento preestablecido no debe presentar problemas el procesamiento inmediato de la muestra, pero si por circunstancias excepcionales se demora se ha de mantener refrigerada la muestra hasta un máximo de 24 horas.

4.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

La mayor parte de los microorganismos cultivados en el agua de diálisis son bacilos gramnegativos no fermentadores de glucosa de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacter*, *Moraxella*, entre otros. Son bacterias heterótrofas, que para su desarrollo dependen de la utilización de compuestos orgánicos con escasos requerimientos nutricionales. Es un grupo heterogéneo que incluye especies simbiotes, saprofitas y patógenas. En muchas de ellas no es frecuente su aislamiento en el laboratorio clínico salvo en pacientes con factores de riesgo. La

presencia de hongos es inferior a la de las bacterias, siendo los más frecuentemente aislados *Candida parapsilosis* y hongos filamentosos dematiáceos. Pueden existir notables diferencias en la microbiota microbiana entre diferentes centros.

El recuento del número de colonias puede realizarse de tres formas dependiendo del modo en que se procese la muestra. Lo más frecuente es la siembra en superficie, con asa calibrada o para mayor exactitud con micropipeta, siendo necesario sembrar al menos 0,1 ml. También se puede incorporar a un medio de agar licuado (dilución en masa o dilución en agar) y por último la filtración a través de membrana, que aunque requiere una mayor complejidad en el procesamiento, es necesario emplear este último método para el estudio del agua ultrapura. La RFE recomienda sembrar por duplicado cada muestra y cada dilución de la muestra y emplear medios selectivos.

El número de bacterias viables se define y contabiliza como unidades formadoras de colonias (ufc), que son aquellas capaces de reproducirse y que están presentes en una determinada cantidad conocida de agua o LD tras el cultivo en un medio sólido. Se cuenta el número de colonias visibles en la placa de agar, expresando los resultados en función del volumen de líquido inoculado. Si se detectan altos niveles de contaminación, se debe modificar el volumen del líquido a sembrar y diluir las muestras, para cuantificar con mayor precisión.

Para la filtración a través de membrana se recomienda usar filtros de membrana con un diámetro de poro de 0,45 micras como máximo y forzar el paso del líquido a través de la membrana con dispositivos de vacío conectados al portafiltras. El objetivo es detectar si hay microorganismos a concentraciones superiores a 0,1 ufc/ml (agua ultra pura) para lo que se debe de filtrar una cantidad de 100 a 1000 ml. La RFE recomienda lavar cada filtro tres veces haciendo pasar por él 100 ml de un líquido adecuado, como es una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 cada vez. Si está validado, se pueden utilizar menos de tres lavados. Los filtros de membrana se transfieren a medios adecuados para el recuento de bacterias y de hongos.

4.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Los dos medios recomendados son el TSA (Tryptic Soy Agar, Difco), que es el medio de referencia para los estudios de cuantificación bacteriana en agua de diálisis recomendado por las normas más antiguas, y el medio R2A (de Reasoner, R2A, Oxoid), que es muy superior en cuanto a su capacidad de detectar microorganismos del agua. El agar sangre no está recomendado aunque hay estudios que sugieren un rendimiento similar al del TSA. R2A es un medio pobre en nutrientes, que incubado a temperatura ambiente durante 14 días detecta mayor número de ufc que los medios más ricos incubados en cualquier condición de temperatura o de tiempo. Actualmente se recomienda el empleo de placas de agar de TSA

con una incubación de 48 horas a una temperatura de 37° C y de R2A con una incubación de 5-10 días a una temperatura de 20-25° C (temperatura ambiente) en aerobiosis.

No está recomendado que se realice ningún tipo de identificación de los microorganismos recuperados en el cultivo pues no tiene repercusión clínica. Tan sólo se llevará a cabo en casos de sospecha de infección por esta vía.

Como se expondrá a continuación, la RFE no establece unos límites de contaminación específicos para hongos en el agua de diálisis, pero si establece que se debe utilizar un medio de cultivo para hongos, siendo el más empleado el medio de Sabouraud o similar y la temperatura de incubación debe ser de 20 a 25°C (temperatura ambiente).

4.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los métodos propuestos se basan en las normas de la RFE ajustando el volumen inoculado para obtener la mayor precisión en el rango más cercano a los puntos de corte. Como nivel máximo admisible el agua purificada que se emplea para diluir el concentrado de diálisis debe contener menos de 100 ufc/ml. Se considera que los resultados son aceptables si ninguna de las muestras ofrece un recuento diez veces superior al máximo fijado (>1000 ufc/ml) o cuando tan solo una o dos muestras superan las 100 ufc/ml. El contenido de endotoxinas en el agua purificada para hemodiálisis no debe exceder las 0,25 UE/ml.

Si para aumentar la calidad del agua de diálisis se emplea la denominada "agua altamente purificada o ultra pura" el nivel máximo establecido es de menos 0,1 ufc/ml (10 ufc/100 ml) y menos de 0,03 UE/ml de endotoxinas, determinado por filtración con membrana con al menos 200 ml de agua altamente purificada.

El recuento de algas y hongos en agua de diálisis y su significado clínico es un fenómeno poco estudiado y la RFE no establece unos límites de contaminación. Se acepta de forma arbitraria un recuento máximo tolerable de hongos 10 veces inferior al de las bacterias.

Generalmente el LD presenta recuentos mayores que el agua de diálisis, ya que por ejemplo el concentrado de bicarbonato se coloniza con facilidad, por lo que las unidades que empleen este concentrado deben prestar especial atención a su control. El control bacteriológico de los concentrados para diálisis es complejo y no está estandarizado, pues los microorganismos que se reproducen en este medio son difícilmente cultivables, requiriendo medios pobres en nutrientes con bicarbonato o cloruro sódico.

4.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Como se ha expuesto anteriormente, es imprescindible la información cuantitativa de los resultados expresando el número de bacterias viables en función del volumen de agua o LD procesado.

5. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE ENDOSCOPIOS

5.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Los endoscopios pueden transmitir infecciones si no se someten a procesos de desinfección o esterilización adecuados entre paciente y paciente. Los microorganismos más frecuentes implicados en infecciones exógenas transmitidas a través de endoscopios son los bacilos gramnegativos y las micobacterias. También hay casos de transmisión de virus de la hepatitis B y de la hepatitis C.

La transmisión de infecciones se ha documentado tanto después de la desinfección manual como después de realizarla en lavadoras desinfectadoras automáticas y se han producido tanto casos aislados como brotes relacionados con la contaminación de lavadoras automáticas.

Uno de los factores que influye en el acantonamiento de microorganismos en los endoscopios, es su capacidad de formar biopelículas. Por este motivo es fundamental la limpieza con detergente enzimático y agua y la limpieza mecánica previa a la desinfección de todos los canales para retirar la materia orgánica y conseguir una adecuada desinfección o esterilización. También se han producido infecciones por no esterilizar las pinzas de biopsia o por realizar el último aclarado con agua del grifo en vez de utilizar agua estéril o alcohol de 70°.

Atendiendo a la clasificación de Spaulding, los endoscopios digestivos y respiratorios se consideran dispositivos semicríticos puesto que penetran en cavidades no estériles. Estos dispositivos deben de ser sometidos a desinfección de alto nivel entre paciente y paciente, el último aclarado debe realizarse con agua estéril o alcohol de 70° y posterior secado para evitar que en un ambiente húmedo se produzca el crecimiento de microorganismos como *Pseudomonas* spp.. Sin embargo, los endoscopios que penetran en cavidades estériles como los artroscopios se consideran dispositivos críticos y deben ser sometidos a procesos de esterilización entre paciente y paciente, al igual que las pinzas de biopsia.

Los procesos de esterilización disponen de sus propios controles tanto físicos como químicos y bacteriológicos que hacen innecesario un control microbiológico posterior del proceso. Por tanto, cuando se habla de control microbiológico de procesamiento de endoscopios se hace referencia al control de la desinfección de los dispositivos semicríticos, en general broncoscopios y endoscopios digestivos.

Respecto a los controles microbiológicos, no hay una norma consensuada y aceptada en cuanto a sus indicaciones, frecuencia, forma de obtención de la muestra y medios de cultivo. Los CDC no recomiendan realizar controles de la desinfección de endoscopios salvo cuando los datos clínicos y epidemiológicos sugieran la transmisión de infecciones a través de los endoscopios. En estos casos recomiendan realizar un cultivo cuantitativo de

una solución de suero salino instilado a través de los canales del endoscopio. Otros autores opinan que este método no es muy sensible y recomiendan realizar la toma de muestras mediante un cepillo estéril introducido en los canales del endoscopio, ya que de esta forma se consiguen recuperar más microorganismos. El objetivo de los controles microbiológicos es asegurar la correcta realización de todo el proceso de desinfección.

5.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Hay que definir varios aspectos, el momento de toma de muestra, la frecuencia del muestreo, los puntos de toma de muestra y el método de recogida. Hay distintas opiniones y recomendaciones también en relación con este tema.

La muestra puede tomarse después del proceso de desinfección o tras la desinfección y almacenado para valorar si hay contaminación durante el almacenado, ya que si no se realiza el último aclarado con agua estéril o alcohol de 70° y no se seca bien el endoscopio, microorganismos como *Pseudomonas* spp. pueden multiplicarse durante el almacenamiento. Por este motivo se recomienda la toma de muestras al menos 12 horas después de almacenado el endoscopio tras la desinfección.

Frecuencia de muestreo: inicialmente puede ser mensual y una vez estabilizado el proceso y cuando se compruebe que los controles son correctos se pueden realizar controles trimestrales. La ESGE-ESGENA (*European Society of Gastrointestinal Endoscopy*) recomienda realizar controles al menos cada 3 meses. No hay que realizar cultivos de todos los endoscopios cada vez que se hace un control, sino una muestra de cada uno de los tipos de endoscopios asegurando la rotación del muestreo para que a final de año se hayan tomado muestras de cada uno de los endoscopios al menos una vez. Además se deben realizar cultivos siempre que se sospeche de la existencia de un brote relacionado con el procedimiento.

Puntos de toma de muestra:

- Todos los canales del endoscopio
- Superficies externas del endoscopio
- Botella de agua conectada al endoscopio

La ESGE-ESGENA recomienda realizar también controles del agua que se utiliza para el aclarado final.

Método de toma de muestra:

Canales del endoscopio: para el control habitual hay que instilar 5-50 ml de suero salino al 0,9% estéril a través de cada uno de los canales del endoscopio y recogerlo posteriormente en un recipiente estéril. También se puede realizar mediante un cepillo estéril que se introduce en el canal y que luego se mezcla con suero estéril. Algunos canales como el elevador del duodenoscopio tienen una luz muy pequeña y debe tomarse la muestra con cantidades más pequeñas, por ejemplo 5 ml de salino. Se puede añadir un neutralizante del desinfectante que se ha utilizado en el proceso de desinfección del endoscopio en el frasco de recogida de muestras.

Superficies externas: la toma de muestras se realiza con una torunda estéril humedecida en suero salino estéril. Se recomienda tomar muestras del extremo distal, puntos de apertura de canales y puente elevador de duodenoscopios.

Botella de agua: tomar 2 muestras de 100 ml a través del conector habitual entre la botella y el endoscopio con una jeringa estéril.

Agua de aclarado final: tomar 2 muestras de 100 ml con una jeringa estéril.

Si se utilizan *lavadoras desinfectadoras automáticas* hay que tomar muestras representativas de todo el proceso siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al menos hay que tomar 2 muestras de 100 ml con una jeringa estéril del agua de aclarado final.

5.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se enviarán en recipientes estériles cerrados y etiquetados indicando claramente el punto de toma de muestra y el número de serie del endoscopio. El procesamiento debe ser rápido al para evitar que se altere el recuento en el cultivo cuantitativo. Si se va a retrasar el procesamiento hay que conservar las muestras a 4°C.

5.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras se procesan para realizar recuento e identificación. No es necesario realizar antibiogramas.

Muestra líquida de los canales del endoscopio. Se puede hacer un *pool* con todas las muestras procedentes de los canales de un mismo endoscopio y se puede concentrar la muestra mediante filtración o centrifugación. Se realiza recuento cuantitativo o semicuantitativo e identificación de aerobios y cultivo para micobacterias.

Recuento de aerobios: cultivo cuantitativo de 1 ml en una placa de agar sangre incubando 48 horas a 30°C. Puede concentrarse filtrando otros 10 ml de la muestra e incubando el filtro en una placa de TSA 48 horas a 30°C o centrifugando la muestra y sembrando 1 ml del sedimento.

Para cultivo de micobacterias hay que inocular el resto de la muestra en un medio específico como Middelbrock 7H10 agar e incubarlo a 37°C durante 21 días.

Torunda de superficie externa. Se agita la torunda en 10 ml de doble caldo TSB, se vortea y se incuba 48 horas a 30°C. A las 48h se hacen subcultivos a placas de agar sangre y agar MacConkey.

Muestras de agua de aclarado y de botella conectada. Se realiza recuento e identificación de aerobios y cultivo para micobacterias. El recuento de aerobios mediante filtración a través de un filtro con poro de 0,45 µm de un volumen de 10 ml y 100 ml. Se siembra en agar R2A o en otro medio pobre en nutrientes y se incuba 5 días a 30°C

Para micobacterias se siembra en medio Middelbrock 7H10 agar y se incuba a 37°C durante 21 días.

5.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Se deben de utilizar medios de cultivo y condiciones de incubación dirigidos a buscar microorganismos específicos que indiquen un inadecuado proceso de desinfección o limpieza del endoscopio o una contaminación del agua.

En el caso de endoscopia gastrointestinal hay que buscar microorganismos de la microbiota oral y entérica como enterobacterias, estreptococos, enterococos y bacilos gramnegativos no fermentadores. En el caso de los broncoscopios además hay que buscar micobacterias. En las lavadoras automáticas y en el agua hay que buscar bacilos gramnegativos no fermentadores y micobacterias atípicas.

No se recomienda la búsqueda de virus, anaerobios o *Helicobacter pylori* en los controles convencionales.

5.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta sobre todo el tipo de microorganismo y también el recuento que puede ser cuantitativo o semicuantitativo.

Si se aísla *Staphylococcus epidermidis* o corinebacterias y el recuento es bajo hay que pensar en contaminación al tomar la muestra. Se aconseja revisar el procedimiento de muestreo y repetir la toma de muestras y el cultivo.

Si se aíslan enterobacterias o enterococos en varios endoscopios con recuento medio y son de la misma unidad de endoscopias hay que sospechar un fallo en la limpieza o desinfección de los endoscopios de dicha unidad. Se aconseja revisar el procedimiento de limpieza y desinfección y tomar nuevamente muestras para cultivo.

Si hay enterobacterias o enterococos en un solo endoscopio con un recuento elevado puede haber un problema mecánico en el endoscopio. Se recomienda no utilizarlo con pacientes, volverlo a limpiar y desinfectar y realizar un nuevo control microbiológico y si no se soluciona el problema debe revisarlo el fabricante.

El hallazgo de *Pseudomonas* spp. en el cultivo de una procesadora automática de duodenoscopios debe ser motivo de alerta rápida. Debe retirarse del uso con pacientes hasta que se encuentre la fuente y se desinfecte. Hay que descartar la fuente en la lavadora automática o en el propio duodenoscopio y revisar a los pacientes a los que se ha realizado la prueba diagnóstica (ERCP).

La presencia de micobacterias atípicas es indicadora de contaminación del agua o de la desinfectadora. Hay que tomar medidas en ambos casos.

El recuento siempre hay que valorarlo junto con el tipo de microorganismo. Distintas sociedades recomiendan recuentos cuantitativos o semicuantitativos. A continuación se indican los valores recomendados:

Sociedad Europea de Endoscopia Gastrointestinal (ESGE-ESGENA):

- Líquido canales < 20 ufc/ml canal.
- Torunda superficie externa: tipo de microorganismo. No se realiza recuento
- Agua < 10/100 ufc/ml

Sociedad de Gastroenterología de Australia (recomienda recuento semicuantitativo):

- No crecimiento
- 1-10 ufc
- 10-100 ufc
- 100-10.000 ufc
- >10.000 ufc

5.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

En el informe de resultados debe indicarse claramente la procedencia de la muestra, el número de serie del endoscopio, el recuento de colonias y la identificación del microorganismo.

6. CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL EN BROTES DE INFECCIÓN RELACIONADOS CON LA ASISTENCIA SANITARIA

6.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Los factores de riesgo para que se produzca una infección nosocomial pueden ser debidos a la propia situación clínica del paciente o estar relacionados con procedimientos invasivos, diagnósticos o de tratamientos y cuidados que se le administran al mismo.

Los microorganismos tienen una determinada supervivencia en el ambiente y cuando una superficie se contamina por un microorganismo, este puede sobrevivir allí días, semanas e incluso meses. Prácticamente cualquier superficie o medio hospitalario es susceptible de estar colonizada por microorganismos potencialmente patógenos, ello hace que se puedan transmitir de manera cruzada, generalmente a través de las manos del personal sanitario, a otras superficies tanto animadas como inanimadas. Por ello, se pueden producir brotes infecciosos nosocomiales si no se elimina el origen. En otras ocasiones, estos brotes pueden producirse por medio de soluciones, líquidos o medicamentos contaminados por microorganismos especialmente adaptados a la supervivencia en esos medios.

Un brote se define como un aumento excepcional e inesperado del número de casos de una infección nosocomial conocida durante un periodo definido de tiempo o del surgimiento de casos de una nueva infección. La pronta identificación de un brote es importante para establecer medidas de contención y limitar la transmisión a los pacientes por medio de los profesionales sanitarios o de material contaminado.

Aunque cualquier superficie puede ser el origen de un posible brote, no están justificados los cultivos ambientales de control o en ausencia de situaciones anómalas. Son caros, laboriosos, difíciles de interpretar, no están estandarizados y raramente proporcionan una información útil. Por ello, es muy importante que exista una buena coordinación entre el equipo de Control de la Infección y el laboratorio

de Microbiología. Una recogida sistemática de cultivos que no esté sustentada en unos datos epidemiológicos y sin un plan para interpretar y actuar ante los resultados obtenidos, no debería ser llevada a cabo.

Si que están indicados, en cambio, ante la presencia de un brote o cuando haya una evidencia epidemiológica que sugiera que el personal o el entorno sanitario están relacionados con la transmisión de un patógeno nosocomial.

6.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Los reservorios en los que se encuentran microorganismos potencialmente implicados en brotes nosocomiales son variados, pero de cara a orientar este punto se pueden dividir en:

1. **Superficies inanimadas o sólidas:** este tipo de superficies es muy amplio pero cabe destacar sobre todo, las que más en contacto estén con las manos del personal sanitario como: interruptores de la luz, teclados y ratón de ordenador, teléfonos, fonendoscopios, mandos de grifería, ropas del personal, etc.
2. **Superficies animadas o del personal sanitario:** básicamente nos restringiremos a las fosas nasales y las manos del personal sanitario, ampliamente descritas estas en la literatura como reservorio y vehículo de transmisión.
3. **Soluciones líquidas** que se aplican al paciente como: soluciones intravenosas, jabones, antisépticos, etc.

6.2.1. Superficies inanimadas o sólidas. Se recomiendan sobre todo dos métodos de toma de muestra dependiendo de si la superficie es irregular o plana:

Para las superficies irregulares se utiliza un hisopo estéril humedecido con medio BHI (*Brain Heart Infusion*). Tras humedecerlo se retira el exceso de líquido presionándolo varias veces contra los bordes internos del tubo del medio BHI. Una vez hecho esto, se introduce el hisopo en la superficie a estudiar (por ejemplo, entre las teclas de un ordenador o en el interior de una boca de grifo) y se rota varias veces. A continuación, se corta la cabeza del hisopo con tijeras estériles para que caiga dentro del tubo.

Para las superficies planas como estanterías, ropa, interruptores o encimeras, se pueden emplear varios métodos como las esponjas, los trapos húmedos o las cintas adhesivas, pero el más comúnmente utilizado por su sencillez, es el de las placas de contacto o placas RODAC (*Replicate Organism Direct Agar Contact*). Las placas RODAC están llenas de medio de cultivo hasta obtener una superficie convexa que sobresale del borde de la misma. Este tipo de placas no son aptas para superficies altamente contaminadas y si tuvieran que utilizarse sobre superficies en las que se aprecian residuos o se supone que han sido aplicados productos desinfectantes, se recomienda utilizar placas con neutralizadores en el agar (glicina, tiosulfato de sodio, polisorbato 80, etc.). La recogida de la muestra debe realizarse preferiblemente antes de la limpieza diaria de la superficie a estudiar, ya

que el efecto mecánico de arrastre podría dificultar el estudio. La toma se realiza colocando la superficie convexa de la placa sobre la superficie a estudiar, presionando levemente en línea recta durante un par de segundos por el lado opuesto teniendo mucho cuidado de no romper el agar. Si la superficie a estudiar fuera una tela, sería necesaria la ayuda de una segunda persona que estirase los extremos de dicha tela hasta conseguir una superficie recta sobre la que depositar la placa. Se recomienda la recogida de un mínimo de 15 placas por habitación estudiada y de 5 a 10 sobre telas, ya que como en el caso de batas o pijamas, se puede acotar la zona de estudio al área de los bolsillos que suelen estar especialmente colonizadas.

Una vez tomada la muestra, se cierran las placas, se identifica detalladamente (n° de habitación, zona estudiada, recogida pre o post limpieza, etc.) y se sellan con papel film (Parafilm®). Es conveniente desinfectar la superficie donde se ha colocado la placa ya que suelen quedar restos de agar que pueden favorecer el sobrecrecimiento de microorganismos en esa zona.

6.2.2. Muestras del personal sanitario. Se centrarán sobre todo en las manos y para ello se emplean básicamente 2 métodos:

a) El primero es el de inmersión de las manos en bolsas estériles de polietileno. Estas bolsas deben contener aproximadamente 50 ml de caldo BHI y se introducen las manos en dichas bolsas durante 1 minuto. Pasado este tiempo, se retiran las manos y se cierra la bolsa herméticamente. Nada más terminar, es recomendable lavarse las manos con agua y jabón para evitar el sobrecrecimiento bacteriano impulsado por la presencia del caldo nutritivo. Una variante de este método, es el de inmersión de las manos en guantes que contienen caldo nutritivo, pero la mayor dificultad de la técnica por la consistencia y forma del guante, hacen que la extracción de las manos sea difícil y se prefiera la primera. La técnica de la inmersión en bolsas con caldo es válida a su vez para la recogida de muestras procedentes de piezas o materiales pequeños de uso habitual en la clínica como los fonendoscopios, esfingomanómetros, otoscopios, pulsoxímetros, localizadores o "bipers", termómetros, etc.

b) El segundo consiste en la impresión de los dedos de la persona a estudiar en placas de agar. La elección del medio de cultivo depende del tipo de microorganismo que se quiera investigar y de las preferencias del investigador. El mecanismo es sencillo, se presionarán las placas levemente con cada yema de los dedos realizando posteriormente un movimiento de vaivén hacia delante a medida que se presiona hasta producir un pequeño corte en el agar con las uñas, ya que suelen ser estas, zonas altamente contaminadas. A continuación, se cerrará e identificará cada placa sellándolas finalmente con Parafilm®.

Si se sospecha que el brote pudiera estar originado por microorganismos cuyo reservorio se encuentra habitualmente en las fosas nasales, deben tomarse muestras de esa localización al personal sanitario que esté implicado epidemiológicamente. Para ello, se introducirá un hisopo en la parte anterior de cada orificio nasal y se rotará varias veces.

6.2.3. Soluciones líquidas. Las soluciones líquidas sospechosas de producir brotes infecciosos hospitalarios pueden ser muy variadas. Se debe procurar recoger un mínimo de 100 ml en un recipiente estéril. Si se sospecha que es el envase que contiene la solución el origen del brote, se decantan entre 10 y 50 ml (dependiendo de la capacidad del envase) de medio BHI en el recipiente. Cubrir la boca con una tapa estéril y agitar vigorosamente durante aproximadamente 1 minuto. En el caso de los hemoderivados del banco de sangre se recogerán asépticamente 20 ml de sangre de las bolsas sospechosas con una jeringa, se desinfectará con alcohol la superficie circular de goma de cuatro botellas de hemocultivo y se inocularán aproximadamente 4 ml de sangre en cada botella. Finalmente se preparará una tinción de Gram con la sangre sobrante en la jeringa.

6.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Generalmente, los microorganismos que se investigan en los brotes, son patógenos que sobreviven bajo condiciones de escasa demanda nutricional y acostumbrados a la temperatura hospitalaria o de los líquidos que los contienen.

Por lo tanto y siguiendo las recomendaciones generales de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en su procedimiento microbiológico nº 26, 2ª edición: "*Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial*"

(www.seimc.org/protocolos/microbiología/), no son necesarias condiciones especiales de transporte y conservación a excepción de las muestras de fosas nasales. En estas muestras, se empleará un hisopo con medio de transporte y se podrán conservar a temperatura ambiente durante un tiempo de hasta 24 horas o en nevera entre 2º y 8ºC si se demorase la siembra. Aún así, dada la importancia y premura en el resultado que exigen estas muestras, lo más recomendable es que se lleven cuanto antes al laboratorio para su procesamiento inmediato.

6.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

En cuanto las muestras se reciban en el Servicio de Microbiología, se les asignará a cada una un número de entrada fijo y una descripción en el SIL (sistema informático del laboratorio). Esto es de gran importancia dada la gran cantidad de muestras que se pueden recibir en corto espacio de tiempo y la necesidad de identificar correcta y detalladamente la procedencia de cada muestra. Una vez realizada la identificación, cada tipo de muestra se procesará de una manera diferente:

- Las muestras recogidas en placas RODAC o por impresión de los dedos en agar, no necesitan un procesamiento añadido y basta con la incubación de las mismas.
- El caldo de las bolsas de inmersión se sembrará en placas a la llegada al laboratorio. Se inocularán aproximadamente 0,5 ml. del caldo BHI de las mismas en las placas de cultivo. Las placas se deben mover con un movimiento rotatorio para distribuir el líquido y después se secan en una cabina de seguridad biológica. Las placas se incuban de forma invertida y también las bolsas hasta el día siguiente, volviendo nuevamente a sembrar el caldo de estas de la misma manera.
- Las muestras recogidas con hisopo serán procesadas de manera que los caldos con medio BHI se agitarán en vortex durante 30 segundos. A continuación, se procesarán de la misma manera que los caldos de las bolsas de inmersión.
- Para las soluciones líquidas hay varias formas de procesamiento:
 - Los desinfectantes y antisépticos se sembrarán directamente en el agar. Se realizarán varias diluciones del producto, con y sin neutralizadores específicos. En el caso de los jabones y dada su consistencia se sembrará 1 ml de estos directamente sobre las placas.
 - Los productos sanguíneos seguirán el procesamiento normal de cualquier hemocultivo.
 - Los contenedores con el medio BHI ya inoculado se agitarán en vortex durante 30 segundos y se seguirá el mismo procesamiento que con el caldo de las bolsas de inmersión.

6.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

En cuanto a las placas RODAC, las hay comercializadas con medios diversos adaptados al tipo de microorganismo que se quiere detectar pero dada la dificultad de contar habitualmente con estos medios específicos en todos los laboratorios, se recomiendan las placas con agar nutritivo no selectivo tipo TSA.

Los medios en los que hay que sembrar el caldo BHI dependerán del microorganismo que se esté tratando de recuperar, por ejemplo, para recuperar bacilos gramnegativos se sembrará en agar MacConckey, cocos grampositivos en agar sangre, *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimida y hongos en medio Sabouraud. También son muy útiles los medios de cultivo cromogénicos (para detectar *S. aureus* resistente a la meticilina, enterococos resistentes a la vancomicina, bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, etc.), ya que permiten distinguir y aislar el microorganismo que se busca en el seno de un cultivo mixto.

Las placas RODAC se incubarán a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas tras lo cual se hará una primera lectura, si no hay crecimiento se reincubarán otras 24 horas y se realizará la lectura final. El resto de las placas de cultivo y los caldos nutritivos se incubarán durante 24 horas a 35°C en aerobiosis, siguiendo el mismo proceso de lectura que con las placas RODAC, tanto en las siembras directas como en los subcultivos a partir del caldo BHI.

La mayoría de los laboratorios poseen sistemas de hemocultivos automatizados por lo que los frascos se incubarán siguiendo la rutina habitual de estas muestras, procurando que la incubación no sea nunca inferior a 6 días. Si en la tinción de Gram realizada a la sangre perteneciente a las bolsas de sangre se observan microorganismos, sembrar en agar chocolate y agar sangre e incubar a 35°C y en CO_2 durante 72 horas.

6.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Al comienzo del estudio se definirá el microorganismo de causante del brote que debe haber sido tipado tanto fenotípica como molecularmente.

Al no haber evidencia de que un número determinado de microorganismos se correlacione con una infección o brote de infección nosocomial, cualquier cantidad de microorganismos de la misma especie aislados en los cultivos de las superficies, líquidos, objetos y zonas anatómicas anteriormente descritas y estudiadas en este documento por tener un nexo epidemiológico, deberán valorarse.

Hay que tener especial cuidado con los cultivos realizados a partir de las manos o fosas nasales del personal sanitario ya que el hecho de aislar en esas localizaciones el mismo microorganismo implicado en el brote hospitalario no establece la dirección de transmisión del brote, ni implica definitivamente al trabajador sanitario como fuente o reservorio del mismo.

En el caso de las bolsas de sangre, los microorganismos aislados se compararán con los de los hemocultivos obtenidos por venopunción de los pacientes que sufrieron la reacción transfusional. Un cultivo negativo hace muy improbable que la sangre se encontrase muy contaminada en el momento de la transfusión. Un cultivo positivo no da la certeza de que una infección haya sido la causante del cuadro transfusional ya que el microorganismo aislado puede haber jugado un papel de mero contaminante, ni tampoco define el origen de la contaminación.

6.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que en muchas ocasiones será necesario llegar hasta la tipificación molecular de los microorganismos aislados y esto puede dilatar la salida de un informe definitivo, será conveniente la elaboración de informes provisionales que ayuden en la toma de medidas cautelares por parte del equipo encargado del control de la infección nosocomial.

Inicialmente, se informará de la presencia o ausencia en una determinada muestra ambiental del

microorganismo en cuestión. A continuación, tras la realización de las pertinentes pruebas bioquímicas de identificación, del antibiograma y la comparación de estos datos con los del microorganismo implicado en el brote hospitalario, se informará de la presencia o no de un microorganismo con características similares a las del causante del brote pendiente del resultado de las pruebas de tipificación.

Tras la realización de las pruebas de tipificación, se emitirá el informe definitivo. En él, se describirá la cepa como:

1. Idéntica
2. Muy relacionada
3. Moderadamente relacionada
4. No relacionada

Ante cualquier duda tras la emisión del informe definitivo, se analizarán los resultados dependiendo del método utilizado para el tipado. Las diversas técnicas y sus características se encuentran bien descritas en el procedimiento en microbiología clínica de la SEIMC nº 18, 2ª edición: "*Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*" (www.seimc.org/protocolos/microbiologia/).

7. BIBLIOGRAFÍA

7.1. INTRODUCCIÓN

1. Alvarado CJ, Reichelderfer M.. The 1997, 1998, and 1999 APIC Guidelines Committees. APIC guideline for infection prevention and control in flexible endoscopy. *Am J Infect Control* 2000; 28:138-155.
2. Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Pelaz C. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Procedimientos microbiológicos SEIMC; nº 20, 2ª edición, 2005.
3. Sehulster LM, Chinn RYW, Arduino MJ, Carpenter J, Donlan R, Ashford D, Besser R, Fields B, McNeil MM, Whitney C, Wong S, Juranek D, Cleveland J. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations from CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chicago IL; American Society for Healthcare Engineering/American Hospital Association; 2004.
4. Sociedad Española de Nefrología. Marzo 2006. Coordinador Dr. Rafael Perez García. Guías de Gestión de calidad del líquido de diálisis.
5. Weinstein RA, Hota B. Contamination, disinfection and cross colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis* 2004; 39:1182-1189.

7.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE

1. Ahti T, Virpi R, Veli-Jukka A, Petri T, Reijo R, Lauri M, Ilkka I. Fungal endophthalmitis caused by *Paecilomyces variotii* following cataract surgery: a presumed operating room air-conditioning system contamination. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2004; 82:232-235.
2. Carrandi B, De la fuente K, Ezpeleta C, Ibarburu JL, Peiro E, Santos JM. Recomendaciones para la minimización de los riesgos microbiológicos asociados a las infraestructuras hospitalarias de Osakidetza. Segunda edición. Editado por: Coordinación de programas de salud pública. Vitoria-Gasteiz. Osakidetza 2009.
3. Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene y el INSALUD. Recomendaciones para la verificación de la bioseguridad ambiental (BSA) respecto a hongos oportunistas. Madrid, 20 de marzo de 2000.
4. Haran S, Pittet D. Environmental controls in operating theatres. *J Hosp Infect* 2002; 51:79-84.

5. Peláez Ros B, Andrade Lobato R, Rodríguez Caravaca G, Gonzalez Solana I. Prevención y control de las infecciones de origen ambiental. Prevención y control de la infección nosocomial. Guía de buenas prácticas. Editado por Comunidad de Madrid. Consejería de Sanidad 2007.

6. Recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Guidelines for preventing opportunistic infections among Hematopoietic stem cell transplant recipients. *MMWR* 2000; 49(RR10):1-128.

7. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, Wingard JR, Young J-A H, Boeckh MA. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15: 1143-1238.

7.3. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AGUA: UNIDADES DE DIÁLISIS

1. European Pharmacopoea 3rd Edition, Supplement 2001: Monograph 1167 corrected 2000. Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting. www.pheur.org

2. European Pharmacopoea 3rd Edition, Supplement 2001: Monograph 2000: 0128. Solutions for haemodialysis. www.pheur.org

3. Guías de gestión de calidad del líquido de diálisis, marzo 2006; www.senefro.org

4. Real Farmacopea Española. Agua para dilución de disoluciones concentradas para hemodiálisis. Real Farmacopea Española 1167: 375-377, 1997. www.msc.es

5. Real Farmacopea Española. Hemodiálisis, disoluciones para hemodiálisis. Real Farmacopea Española 0128: 1064-1067, 1997 www.msc.es

7.4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE ENDOSCOPIOS

1. Beilenhoff U, Neumann CS, Biering H, Blum R, Schmidt V, Rey JF and the ESGE Guidelines Committee. ESGE-ESGENA guideline for process validation and routine testing for reprocessing endoscopes in washer-disinfectors, according to the European Standard pr EN ISO 15883 parts 1,4 and 5. *Endoscopy* 2007;39:85-94

2. Beilenhoff U, Neumann CS, Rey JF, Biering H, Blue R, Schmidt V, and the ESGE Guidelines Committee. ESGE-ESGENA guideline for quality assurance in reprocessing: Microbiological surveillance testing in Endoscopy. *Endoscopy* 2007;39:175-181.

3. Culver DA, Gordon SM, and Mehta AC. Infection control in the Bronchoscopy suite. A review of outbreaks and guidelines for prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1050-1056.

4. Everts R, Holland D. Should we be doing endoscope surveillance cultures? *NZMJ (Journal of the New Zealand Medical Association)* 2002; 115:1158.

5. GESA. Gastroenterological Society of Australia. Infection control in endoscopy. Microbiological testing of gastrointestinal and respiratory endoscopes and automated flexible endoscope reprocessors. En www.gesa.org.au/pdf/.../Micro_Biology_Guidelines_Feb2008.pdf.

7.5. CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL EN BROTES DE INFECCIÓN RELACIONADOS CON LA ASISTENCIA SANITARIA

1. Centers for Disease Control and Prevention and Healthcare Infection. Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. 2003; 88-140.

2. Diekema DJ, Pfaller MA. Infection Control Epidemiology and Clinical Microbiology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007; pp. 118-128.

3. Eliecer M, Dominguez MA, Ezpeleta C, Padilla B, Ramirez de Arellano E, Martinez-Martinez L. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:220-229.

4. Larson EL, Strom MS, Evans CH. Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. *J Clin Microbiol* 1980; 11:355-360.

5. Lynne SG, Isenberg HD, editors. Microbiological assay of environmental and medical-device surfaces. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press 2004.

6. Lynne SG, Isenberg HD, editors. Culture of blood bank products. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press 2004.

7. Organización Mundial de la Salud. Guía práctica de prevención de las infecciones nosocomiales. 2ª edición. 2003; 26-29.

PNT-MA-01
CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE EN QUIRÓFANO Y UNIDADES DE
INMUNODEPRIMIDOS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....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 de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos	PNT-MA-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para realización de los cultivos ambientales de aire en quirófanos y unidades de pacientes neutropénicos.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen cultivos ambientales de aire en estas unidades.

2. FUNDAMENTO

Los pacientes inmunodeprimidos, particularmente los pacientes con neutropenia profunda y prolongada tienen riesgo de contraer infecciones invasivas por hongos filamentosos. Estas infecciones se adquieren por vía inhalatoria si en el aire que respiran hay esporas de hongos.

En los quirófanos, se pueden producir infecciones del lugar quirúrgico por hongos filamentosos si el aire del quirófano tiene esporas que pueden acceder al campo quirúrgico directamente durante la intervención.

Los cultivos ambientales deben de estar orientados a la vigilancia y control de la infección nosocomial producidas por hongos oportunistas en los pacientes neutropénicos y en los pacientes sometidos a determinadas intervenciones quirúrgicas poniendo de manifiesto la presencia de hongos en suspensión en el aire del quirófano o de las unidades especiales de inmunodeprimidos.

Además de los cultivos de aire para hongos se pueden realizar cultivos de bacterias aerobias como comprobación del buen funcionamiento del sistema de ventilación antes de abrir nuevas instalaciones quirúrgicas.

La técnica de cultivo que se recomienda se realiza tomando la muestra por impacto y aspiración. No se recomienda el muestreo por sedimentación colocando placas abiertas en las zonas a muestrear.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de instrucciones del aparato muestreador de aire proporcionado por el fabricante.
- Procedimiento SEIMC nº 21 (2006). Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Para la toma de muestras se recomienda el método volumétrico por impacto y aspiración con un volumen de 1000 litros de aire en cada toma. El sistema aspira e impulsa un caudal de aire de 100 L/minuto a través de un cabezal perforado con numerosos orificios que impactan sobre la superficie de una placa de cultivo.

Cada vez que se vaya a tomar una muestra previamente hay que desinfectar el cabezal del aparato por donde se aspira el aire o bien esterilizarlo si se tienen suficientes cabezales de repuesto. Se colocará la placa con medio de cultivo en la parte superior del aparato por debajo del cabezal de aspiración.

Para el muestreo habitual de quirófano se realizarán dos tomas de muestras para recuento de hongos, una con el quirófano vacío y otra durante la actividad quirúrgica. La muestra que se toma con el quirófano vacío sirve para valorar la climatización y estructura. La muestra que se toma durante la actividad quirúrgica sirve para valorar además el impacto de la circulación del personal en el quirófano, la limpieza de los aparatos del quirófano o contaminaciones provenientes del entorno.

Cuando se está estudiando la fuente de contaminación tras encontrar cultivos positivos en el muestreo convencional también son útiles las tomas de muestras realizadas en las zonas de impulsión del aire y en el centro del quirófano, para discriminar si se trata de una contaminación del sistema de ventilación o de algún problema durante la actividad del propio quirófano. La forma de tomar la muestra será la misma que para el muestreo habitual.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO:

Para el cultivo de hongos filamentosos se recomienda un medio selectivo como la placa de Sabouraud con cloranfenicol y gentamicina.

Para recuento de aerobios: Se utilizará una placa de agar sangre.

5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS:

- Azul de lactofenol
- Alcotiras
- Papel film
- Cinta de papel celo

6. APARATOS Y MATERIAL

- Aparato muestreador (*Microbiological Air Sampler*, Merck, Mas-100)
- Estufa de aerobiosis a 35-37°C
- Estufa de aerobiosis a 30°C
- Microscopio
- Lupa
- Portaobjetos y cubres
- Pinzas
- Tijeras

7. PROCESAMIENTO

7.1. CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

La placa con medio de cultivo que está colocada en el aparato muestreador, debe retirarse del mismo, teniendo cuidado de no contaminarla. Se le colocará la tapa y se sellará con papel film para evitar contaminaciones en su traslado.

Las muestras se enviarán al Servicio de Microbiología bien identificada indicando el quirófano donde se ha realizado la toma de muestras y si es con quirófano vacío o durante la actividad quirúrgica. Es conveniente asignar un número de entrada en el SIL (sistema informático del laboratorio) fijo a cada quirófano/habitación de inmunodeprimido del hospital

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos	PNT-MA-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

para poder tener un histórico de los cultivos de cada unidad.

7.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En cuanto se reciban las muestras en el Servicio de Microbiología se incubarán en estufa convencional.

Para recuento de hongos:

Se incubará a 30°C ó 37°C durante 7 días en estufa convencional. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos ambientales oportunistas es de 30°C. Si existe indicación epidemiológica de investigar una especie fúngica termotolerante como *Aspergillus fumigatus* será conveniente utilizar la incubación a 37°C para inhibir el crecimiento de otros hongos ambientales.

Para recuento de aerobios:

Se incubará a 35-37°C durante 48 horas en estufa convencional. En cada lectura se realizará el recuento de colonias sin identificación de los microorganismos.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

Recuento de hongos: se realizarán lecturas diarias de las placas para detectar crecimiento lo antes posible. Se tendrá cuidado al mover las placas que tengan crecimiento para evitar siembras secundarias y no alterar el recuento de colonias.

En cada lectura se realizará el recuento de colonias y la posterior identificación siguiendo los métodos habituales de identificación de hongos. Conviene realizar una identificación presuntiva rápida mediante la visualización del aspecto de las colonias a la lupa y la observación microscópica con azul de lactofenol.

Recuento de aerobios: En la lectura se realizará el recuento de colonias sin identificación de los microorganismos.

8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para el cultivo de hongos filamentosos: los valores admisibles son 0 ufc/m³.

Para recuento de aerobios: los valores de bioseguridad admisibles dependen del tipo de quirófano:

- Ambiente muy limpio <10 ufc/m³
- Ambiente limpio <10-100 ufc/m³
- Ambiente aceptable 100-200 ufc/m³

En los quirófanos de clase A se debe garantizar un ambiente muy limpio.

8.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

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

Recuento de hongos: si el resultado es negativo (ausencia de colonias) se realizarán informes provisionales durante la incubación y el informe definitivo a los 7 días.

Si se obtiene un resultado positivo (cualquier número de colonias), es importante realizar un informe provisional rápido tras realizar las técnicas rápidas de identificación, indicando el recuento de colonias y el género del hongo independientemente de que se tarde más tiempo en la identificación definitiva del hongo a nivel de especie. Por ejemplo: Se aíslan 2 ufc de *Aspergillus* spp./m³

Esta información precoz permitirá tomar decisiones rápidas sobre la actividad quirúrgica y diagnóstico del estado del quirófano en cuanto a sistema de ventilación, limpieza, etc.

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

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Cada vez que se vaya a tomar una muestra previamente hay que desinfectar el cabezal del aparato por donde se aspira el aire o bien esterilizarlo si se tienen suficientes cabezales de repuesto.

El aparato deberá calibrarse periódicamente siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los aparatos muestreadores más nuevos tienen un sistema de verificación de autocalibrado.

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Al no existir una normativa aceptada universalmente hay discrepancias en la literatura en cuanto a si hay que valorar todos los hongos filamentosos o sólo *Aspergillus* spp. La recomendación de los autores es valorar la presencia de cualquier tipo de hongo filamentosos, debido a que su presencia es un indicador indirecto de un mal funcionamiento o mantenimiento del sistema de ventilación, de la limpieza o de la circulación de aparatos y personas en el quirófano. Por otro lado no sólo *Aspergillus* spp. es capaz de producir infecciones en pacientes quirúrgicos e inmunodeprimidos, aunque sea el género más frecuente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Carrandi B, De la Fuente K, Ezepeleta C, Ibarburu JL, Peiro E, Santos JM. Recomendaciones para la minimización de los riesgos microbiológicos asociados a las infraestructuras hospitalarias de Osakidetza. Segunda

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del aire en quirófano y unidades de inmunodeprimidos	PNT-MA-01	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

edición. Vitoria-Gasteiz. Editado por Coordinación de Programas de Salud Pública. Osakidetza 2009.

2. Haran S, Pittet D. Environmental controls in operating theatres. J Hosp Infect 2002; 51:79-84.

3. Peláez Ros B, Andrade Lobato R, Rodríguez Caravaca G, González Solana I. Prevención y control de las infecciones de origen ambiental. Prevención y control de la infección nosocomial. Guía de buenas prácticas. Editado por Comunidad de Madrid. Consejería de Sanidad 2007.

**PNT-MA-02
CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AGUA EN UNIDADES DE DIÁLISIS**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....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 de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del agua en unidades de diálisis	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para realización de los cultivos del agua y líquido de diálisis (LD) empleados para hemodiálisis.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen cultivos ambientales de aguas en estas unidades.

2. FUNDAMENTO

El agua que se emplea para la hemodiálisis es un elemento fundamental del proceso, pues se pone en contacto con la sangre a través de la membrana semipermeable del dializador permitiendo el intercambio de sustancias de forma bidireccional. La solución electrolítica isotónica preparada a partir de agua purificada y concentrados electrolíticos o sales no disueltas presenta una composición electrolítica similar al plasma, denominada LD, cuya calidad y pureza es crítica para una adecuada hemodiálisis. De no ser así el paciente se expone a un riesgo de acumular sustancias tóxicas o infecciones dando lugar a complicaciones tanto agudas como crónicas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad y de gestión de residuos
- Guías de gestión de calidad del líquido de diálisis, marzo 2006. Disponible en www.senefro.org
- Procedimiento SEIMC n° 20 (2005). Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis.
- Procedimiento SEIMC n° 1 a (2003). Recogida y procesamiento de muestras.

Estos dos últimos documentos están disponibles en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

En el volante de petición debe figurar con claridad la información del punto de obtención de la muestra, pues la significación de los recuentos puede variar en función de los mismos.

4.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

En la fase de validación, los controles microbiológicos del agua purificada o altamente purificada se realizan semanalmente durante los dos primeros meses, y si todo es correcto se pasa a la fase de mantenimiento, en la cual se ha de llevar a cabo al menos una vez al mes. Los controles del nivel de endotoxinas se realizarán mensualmente tanto en el periodo de validación como en el de mantenimiento. Las tomas de los puertos de toma de agua de los monitores se deberán realizar al comienzo de la sesión de diálisis.

Cada centro debe establecer la periodicidad, metodología, control de calidad y responsabilidades de estos controles. El muestreo para cultivos microbiológicos en el periodo de validación debe incluir el agua de aporte, el agua descalcificada, el agua tratada a la salida de la osmosis y en el punto más próximo al final del anillo de distribución.

Además en un mínimo de un 20% de los monitores de la toma de agua, a la entrada al dializador y del drenaje. En el periodo de mantenimiento no es necesario tomar muestras en la zona de tratamiento, a menos que se detecte contaminación significativa del agua tratada.

Para el estudio de endotoxinas se requieren muestras del agua tratada a la salida de la ósmosis, en el punto más próximo al final del anillo de distribución y al menos en el 10 % de los monitores de la toma de agua. El punto de muestreo no debe limpiarse con desinfectantes del tipo hipoclorito u otros ácidos, siendo admisible el empleo de alcohol al 70% permitiendo después su evaporación. Se recomienda el uso de guantes estériles y que en cada punto de muestreo de agua de diálisis se deje correr el chorro durante al menos un minuto hasta que drene una cantidad fija de agua, recogiendo la muestra en un contenedor estéril siguiendo la sistemática habitual de la toma de muestras para microbiología (asepsia, etiquetado, etc.). Para determinar la carga bacteriana del agua o LD ultrapura/o, es necesario que se recoja un volumen de agua superior a un litro en un contenedor adecuado estéril.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Al ser un procedimiento rutinario programado no debe de haber problemas para el procesamiento inmediato, pero en caso de demora se puede mantener refrigerada la muestra hasta un máximo de 24 horas.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Deben considerarse criterios de rechazo los siguientes:

- Defectos en la identificación de la muestra o del volante de petición por etiquetado erróneo o por no especificarse el lugar de obtención de la misma.
- Conservación inadecuada (por la temperatura a la que haya sido conservada o por haber transcurrido un tiempo superior a 24 horas)
- Muestras derramadas o con un volumen insuficiente.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO

TSA (Agar Trypticasa Soja):

Digerido pancreático de caseína 15 g

Digerido papaico de soja 5 g

Cloruro sódico 5 g

Agar 15 g

Agua destilada 1000 ml

Se deberá ajustar el pH 7,3 ± 0,2

Medio R2A (de Reasoner):

Extracto de levadura 0,5 g

Proteosa-Peptona 0,5 g

Hidrolizado de caseína 0,5 g

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del agua en unidades de diálisis	PNT-MA-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

Glucosa 0,5 g
Almidón 0,5 g
K₂HPO₄ 0,03 g
MgSO₄anhidro 0,024 g
Piruvato sódico 0,3 g
Agar 15 g
Agua 1000 ml
Ajustar el pH después de su esterilización en autoclave a pH 7,2 ± 0,2 (ajustado con K₂HPO₄ o KH₂PO₄).

Agar Sabouraud dextrosa

Dextrosa 40 g
Peptona 10 g
Agar 15 g
Agua destilada 1000 ml
Ajustar pH a 5,6
Se suele emplear la modificación de Emmons añadiendo cloramfenicol como inhibidor bacteriano (10 ml de una solución de 500 mg de cloramfenicol base en 100 ml de etanol)

5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS:

- Asas calibradas
- Pipeta
- Puntas de pipeta
- Filtros de membrana con un diámetro nominal de poro de un máximo de 0,45 micras

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de 30°C y estufa de 35°C
- Pinzas estériles
- Matraz
- Embudo para filtración
- Sistema de vacío para filtración

7. PROCESAMIENTO

Es necesario sembrar un mínimo de 0,1 ml, mediante dilución en masa o dilución en agar. Se recomienda sembrar por duplicado cada muestra, y cada dilución de la muestra y emplear los medios selectivos indicados previamente.

Para el estudio del agua ultrapura es necesario emplear la filtración a través de membrana, debiendo filtrarse entre 100 y 1000 ml. Se recomienda lavar cada filtro dos o tres veces con 100 ml de un líquido adecuado (por ejemplo, disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0) y transferir los filtros a los correspondientes medios de cultivo.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

Se deben seleccionar las placas con el mayor número de colonias pero con menos de 100 colonias y calcular el número de ufc/ml. Como los rangos de valoración de los recuentos en agua de diálisis son bastante amplios no es imprescindible cuantificar con alta precisión el número de bacterias viables.

8.2. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considera que los resultados son aceptables si ninguna de las muestras ofrece un recuento diez veces superior al máximo fijado (>1000 ufc/ml) o cuando tan solo una o dos muestras superan las 100 ufc/ml. El contenido de endotoxinas en el agua purificada para hemodiálisis no debe exceder las 0,25 UE/ml. Si para aumentar la calidad del agua de diálisis se emplea la denominada "agua altamente purificada o ultra pura" el nivel máximo establecido es de menos 0,1 ufc/ml (10 ufc/ 100ml) y menos de 0,03 UE/ml de endotoxinas, determinado por filtración con membrana con al menos 200 ml de agua altamente purificada.

El recuento de algas y hongos en agua de diálisis y su significado clínico es un fenómeno poco estudiado sin que existan unos límites de contaminación, aunque se acepta un recuento máximo tolerable de hongos 10 veces inferior al de las bacterias.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar reflejadas en el manual general de organización del Laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento lo realizará el personal técnico cualificado con un entrenamiento específico, bajo la supervisión del Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que emita los resultados. La toma de muestras y su envío al laboratorio dependerán de los Servicios de Nefrología y de Medicina Preventiva.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del Laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el Laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Como ya se ha mencionado previamente el recuento de algas y hongos en agua de diálisis y su significado clínico es un fenómeno poco estudiado y la Real Farmacopea Española (RFE) no establece unos límites de contaminación. Se acepta de forma arbitraria un recuento máximo tolerable de hongos 10 veces inferiores al de las bacterias.

El control bacteriológico de los concentrados para diálisis es complejo y no está estandarizado, pues los microorganismos que se reproducen en este medio son difícilmente cultivables, requiriendo medios pobres en nutrientes con bicarbonato o cloruro sódico.

Para determinar el contenido de endotoxinas del agua o LD se requiere un procedimiento específico diferente.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico del agua en unidades de diálisis	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

12. BIBLIOGRAFÍA

1. European Pharmacopoea 3rd Edition, Supplement 2001: Monograph 1997: 1167 corrected 2000. Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting. www.pheur.org

2. European Pharmacopoea 3rd Edition, Supplement 2001: Monograph 2000: 0128. Solutions for haemodialysis. www.pheur.org

3. Real Farmacopea Española. Agua para dilución de disoluciones concentradas para hemodiálisis. Real Farmacopea Española 1167: 375-377, 1997. www.msc.es

4. Real Farmacopea Española. Hemodiálisis, disoluciones para hemodiálisis. Real Farmacopea Española 0128: 1064-1067, 1997 www.msc.es

PNT-MA-03
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN DE ENDOSCOPIOS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....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 de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de procesos de desinfección de endoscopios	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para realización de los controles microbiológicos de los procesos de limpieza y desinfección de endoscopios.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen control microbiológico del proceso de desinfección de endoscopios.

2. FUNDAMENTO

Los endoscopios pueden transmitir microorganismos que producen infecciones si no son sometidos a procesos de desinfección o esterilización adecuados entre paciente y paciente. Los microorganismos más frecuentemente implicados en infecciones exógenas transmitidas a través de endoscopios son bacilos gramnegativos y micobacterias, aunque también hay casos descritos de transmisión de virus de hepatitis B y virus de la hepatitis C.

La transmisión de infecciones se ha documentado tanto después de la desinfección manual como después de realizarla en lavadoras desinfectadoras automáticas y se han producido tanto casos aislados como brotes relacionados con la contaminación de lavadoras automáticas.

Uno de los factores que influye en el acantonamiento de microorganismos en los endoscopios, es su capacidad de formar biofilm. Por este motivo la limpieza con detergente enzimático y agua y la limpieza mecánica previa a la desinfección de todos los canales para retirar la materia orgánica es fundamental para poder conseguir una adecuada desinfección. También se han producido infecciones por no esterilizar las pinzas de biopsia o por realizar el último aclarado con agua del grifo en vez de utilizar agua estéril o alcohol de 70°C.

Atendiendo a la clasificación de Spaulding, los endoscopios digestivos y respiratorios se consideran dispositivos semicríticos puesto que penetran en cavidades no estériles. No obstante, estos dispositivos deben de ser sometidos a desinfección de alto nivel entre paciente y paciente, el último aclarado debe realizarse con agua estéril o alcohol de 70°C y posterior secado para evitar que en un ambiente húmedo se produzca el crecimiento de microorganismos como *Pseudomonas* spp. Sin embargo, los escopios que penetran en cavidades estériles como los artroscopios se consideran dispositivos críticos y deben ser sometidos a procesos de esterilización entre paciente y paciente, al igual que las pinzas de biopsia.

Los procesos de esterilización disponen de sus propios controles tanto físicos como químicos y bacteriológicos que hacen innecesario un control microbiológico posterior del proceso. Por tanto, el control microbiológico de reprocesamiento de endoscopios se refiere al control de la desinfección de los dispositivos semicríticos, en general broncoscopios y endoscopios digestivos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Alvarado CJ, Reichelderfer M. The 1997, 1998, and 1999 APIC Guidelines Committees. APIC guideline for infection prevention and control in flexible Endoscopy Am J Infect Control 2000; 28:138-155.
- Procedimiento SEIMC n° 37 (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Hay que definir varios aspectos, el momento de toma de muestra, la frecuencia del muestreo, los puntos de toma de muestra y el método de recogida.

Se recomienda la toma de muestras al menos 12 horas después de almacenado el endoscopio tras la desinfección.

Frecuencia de muestreo:

La ESGE-ESGENA (*European Society of Gastrointestinal Endoscopy*) recomienda realizar controles al menos cada 3 meses. No hay que cultivar todos los endoscopios cada vez que se hace un control, sino una muestra de cada uno de los tipos de endoscopios asegurando la rotación del muestreo para que a final de año se hayan tomado muestras de cada uno de los endoscopios al menos una vez. Además se deben realizar cultivos siempre que se sospeche la existencia de un brote relacionado con el procedimiento.

Puntos de toma de muestra:

- Canales internos del endoscopio
- Superficies externas del endoscopio
- Botella de agua conectada al endoscopio
- Agua utilizada para el aclarado final

Método de toma de muestra:

Canales del endoscopio: para el control habitual hay que instilar 5-50 ml de suero salino 0,9% estéril a través de cada uno de los canales del endoscopio y recogerlo posteriormente en un recipiente estéril. También se puede realizar mediante un cepillo estéril que se introduce en el canal y que luego se mezcla con suero estéril. Algunos canales tienen una luz muy pequeña y deben tomarse las muestras con cantidades más pequeñas por ejemplo 5 ml de suero salino. Se puede añadir un neutralizante del desinfectante que se ha utilizado en el proceso de desinfección del endoscopio en el frasco de recogida de muestras.

Superficies externas: la toma de muestras se realiza con una torunda estéril humedecida en solución salina estéril. Se recomienda tomar muestras del extremo distal, puntos de apertura de canales y puente elevador del duodenoscopio.

Botella de agua: tomar 2 muestras de 100 ml a través del conector habitual entre la botella y el endoscopio con una jeringa estéril.

Agua de aclarado final: tomar 2 muestras de 100 ml con una jeringa estéril.

Si se utilizan *lavadoras desinfectadoras automáticas* hay que tomar muestras representativas

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de procesos de desinfección de endoscopios	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

de todo el proceso siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al menos hay que tomar 2 muestras de 100 ml con una jeringa estéril del agua de aclarado final. La toma de muestras debe de realizarla el personal de endoscopias que está familiarizado con la manipulación de estos dispositivos.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar sangre
- Agar McConckey
- Agar R2A
- Agar TSA
- Doble caldo TSB
- Middelbrock 7H10 agar

5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Filtros de 0,45 µm de poro
- Reactivos para tinción de Gram
- Aceite de inmersión
- Reactivos para identificación de bacterias

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa a 30°C
- Estufa a 37°C
- Lupa
- Microscopio
- Centrífuga
- Portaobjetos
- Pinzas estériles
- Asas de cultivo
- Torundas
- Matraz kitasato con manguera
- Embudo para filtración
- Sistema de vacío para filtración

7. PROCESAMIENTO

7.1. CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Se enviarán en recipientes estériles cerrados y etiquetados indicando claramente el punto de toma de muestra y el número de serie del endoscopio. El procesamiento debe ser rápido porque es un cultivo cuantitativo y si no se altera el recuento. Si se va a retrasar el procesamiento hay que conservar las muestras a 4°C.

7.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se procesarán para realizar recuento e identificación. No es necesario realizar antibiogramas.

Muestra líquida de los canales del endoscopio. Se puede hacer un *pool* con todas las muestras procedentes de los canales de un mismo endoscopio y se puede concentrar la muestra mediante filtración o centrifugación. Se realiza recuento cuantitativo o semicuantitativo e identificación de aerobios y cultivo para micobacterias.

Recuento de aerobios. Cultivo cuantitativo de 1 ml en una placa de agar sangre incubando 48 horas a 30°C. Puede concentrarse filtrando otros 10 ml de la muestra e incubando el filtro en una placa de TSA durante 48 horas a 30°C o centrifugando la muestra y sembrando 1 ml del sedimento.

Para cultivo de micobacterias hay que inocular el resto de la muestra en un medio específico como Middelbrock 7H10 agar e incubarlo a 37°C durante 21 días.

Torunda de superficie externa. Se agita la torunda en 10 ml de doble caldo TSB. Se vortea y se incuba 48 horas a 30°C. A las 48h se hacen subcultivos a placas de agar sangre y agar McConckey.

Muestras de agua de aclarado y de botella conectada. Se realiza recuento e identificación de aerobios y cultivo para micobacterias. El recuento de aerobios mediante filtración a través de un filtro con diámetro de poro de 0,45µm de un volumen de 10 ml y 100 ml. Se siembra en agar R2A o en otro medio pobre en nutrientes y se incuba 5 días a 30°C

Para el cultivo de micobacterias se siembra en medio Middelbrock 7H10 agar y se incuba a 37°C durante 21 días.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1 OBTENCION DE LOS RESULTADOS

Tras el periodo de incubación previamente descrito se procederá al recuento de colonias y a su identificación.

Para la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta conjuntamente el tipo de microorganismo y el recuento que puede ser cuantitativo o semicuantitativo.

Distintas sociedades científicas recomiendan recuentos cuantitativos o semicuantitativos.

Sociedad Europea de Endoscopia Gastrointestinal (ESGE-ESGENA):

- Líquido canales: < 20 ufc/ml canal.
- Torunda superficie externa: tipo de microorganismo. No se realiza recuento.
- Agua: <10/100 ufc/ml

Sociedad de Gastroenterología de Australia (recomienda recuento semicuantitativo):

- No crecimiento
- 1-10 ufc
- 10-100 ufc
- 100-10.000 ufc
- >10.000 ufc

8.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si se aísla *S. epidermidis* o corinebacterias y el recuento es bajo es probable que haya habido una contaminación al tomar la muestra. Se aconseja revisar el procedimiento de muestreo y repetir la toma de muestras y el cultivo.

Si se aíslan enterobacterias o enterococos en varios endoscopios con recuento medio y son de la misma unidad de endoscopias hay que sospechar un fallo en la limpieza o desinfección de endoscopios de

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de procesos de desinfección de endoscopios	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

dicha unidad. Se aconseja revisar el procedimiento de limpieza y desinfección y tomar nuevamente muestras para cultivo.

Si hay enterobacterias o enterococos en un solo endoscopio con un recuento elevado puede haber un problema mecánico en el endoscopio. Se recomienda no utilizarlo con pacientes, volverlo a limpiar y desinfectar y realizar un nuevo control microbiológico y si no se soluciona el problema debe revisarlo el fabricante.

El hallazgo de *Pseudomonas* spp. en el cultivo de una procesadora automática de duodenoscopios debe ser motivo de alerta rápida. Debe retirarse del uso con pacientes hasta que se encuentre la fuente y se desinfecte. Hay que descartar la fuente en la lavadora automática o en el propio duodenoscopio y revisar a los pacientes a los que se ha realizado una prueba de ERCP.

La presencia de micobacterias atípicas es indicadora de contaminación del agua o de la desinfectadora. Hay que tomar medidas en ambos casos.

8.3. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

En el informe de resultados debe indicarse claramente la procedencia de la muestra, el número de serie del endoscopio, el recuento de colonias y la identificación del microorganismo.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Respecto a los controles microbiológicos del proceso de desinfección de endoscopios, no hay una norma consensuada y aceptada en cuanto a sus indicaciones, frecuencia, forma de obtención de la muestra, medios de cultivo e interpretación de resultados.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Beilenhoff U, Neumann CS, Biering H, Blum R, Schmidt V, Rey JF and the ESGE Guidelines Committee. ESGE-ESGENA guideline for process validation and routine testing for reprocessing endoscopes in washer-disinfectors, according to the European Standard procedure EN ISO 15883, parts 1,4 and 5. *Endoscopy* 2007; 39:85-94.
2. Beilenhoff U, Neumann CS, Rey JF, Biering H, Blue R, Schmidt V, and the ESGE Guidelines Committee. ESGE-ESGENA guideline for quality assurance in reprocessing: Microbiological surveillance testing in endoscopy. *Endoscopy* 2007; 39:175-181.
3. Culver DA, Gordon SM, and Mehta AC. Infection control in the bronchoscopy suite. A review of outbreaks and guidelines for prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1050-1056.
4. Everts R, Holland D. Should we be doing endoscope surveillance cultures? *NZMJ* 2002; 115:1158.
5. GESA. Gastroenterological Society of Australia. Infection control in endoscopy. Microbiological testing of gastrointestinal and respiratory endoscopes and automated flexible endoscope reprocessors. En www.gesa.org.au/pdf/.../Micro_Biology_Guidelines_Feb2008.pdf

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de la colonización bacteriana y fúngica de las manos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la realización de los controles microbiológicos de las manos. Serán fundamentalmente controles de las manos del personal sanitario que atiende de manera cercana al paciente.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen controles microbiológicos para fundamentar el origen de un brote infeccioso hospitalario.

2. FUNDAMENTO

Los microorganismos tienen una determinada supervivencia en el ambiente y cuando una superficie se contamina por un microorganismo este puede sobrevivir allí días, semanas e incluso meses. Prácticamente cualquier superficie o medio hospitalario pueden estar colonizados por microorganismos potencialmente patógenos; ello hace que se puedan transmitir de manera cruzada, generalmente a través de las manos del personal sanitario, a otras superficies tanto animadas como inanimadas. De hecho, las manos están ampliamente descritas en la literatura científica como el principal medio de transmisión de los microorganismos.

Las manos del personal sanitario pueden estar colonizadas por microbiota residente o por microbiota transitoria. La microbiota residente estará constituida por microorganismos comensales de la piel como *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. o *Propionibacterium* spp. La microbiota transitoria por el contrario, se adquirirá por el contacto de las manos con pacientes o superficies contaminadas. Mientras que la primera, rara vez se relaciona con infecciones, la microbiota transitoria es la causante de la mayoría de los brotes infecciosos hospitalarios.

La recogida de muestras de las manos para la investigación de un brote puede realizarse por varios métodos: inmersión en guantes con caldo de cultivo, inmersión en bolsas estériles también con caldo, impresión de las manos o dedos en agar o a través de hisopos. El hisopo es adecuado para investigar pequeñas zonas de la mano como uñas o pulpejos pero como generalmente se desconoce cual es la zona contaminada, no es del todo rentable para un cribado. La impresión en placas de agar es menos sensible que los caldos y el crecimiento extremadamente cercano de colonias que suele obtenerse, hace compleja la identificación y aislamiento de las mismas. Los guantes tienen la ventaja de una anatomía homóloga a la mano por lo que fácilmente se adhiere a todas las zonas y permite una fricción estrecha, pero la tremenda dificultad en la extracción de los mismos hace que se prefiera el método de inmersión en bolsas con caldo. Por ello, se detallará a continuación este método.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento SEIMC n° 37 (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
- Procedimiento SEIMC n° 11 (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.
- Procedimiento SEIMC n° 18 (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología.

Estos documentos están disponibles en:
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Es conveniente que la recogida de muestras según el método de inmersión de las manos en bolsas estériles, se realice por un miembro del equipo de control de la infección bien asesorado en la forma de realizar la toma. Las muestras se recogerán en bolsas estériles de polietileno que deberán tener una capacidad mínima de unos 3 litros para que permitan una introducción cómoda y un movimiento óptimo de la mano en su interior. Se depositarán en ellas aproximadamente unos 50 mL de caldo BHI. La persona encargada de recoger la muestra deberá haber hecho previamente una correcta higiene de manos con una solución alcohólica. Se abrirá la bolsa con mucho cuidado de no tocar la abertura, efectuándose para ello un movimiento de tracción suficiente en la parte inferior adyacente. A continuación, la persona examinada introducirá su mano sin tocar los bordes abiertos de la bolsa y el examinador cerrará la boca de la bolsa sobre la muñeca de la persona examinada haciendo un movimiento estrangulador. Las manos de la persona examinada no sufrirán, preferiblemente, higiene de manos previa a la recogida de la muestra aunque la persona examinada podrá haber seguido a lo largo de su jornada laboral, las mismas pautas de seguridad que emplea normalmente. Durante aproximadamente 1 minuto, se realizará un movimiento de fricción de las palmas y dedos contra la pared de plástico de la bolsa. Pasado este tiempo, se abrirá la boca de la bolsa y se retirará la mano cerrándose herméticamente esta. Nada más terminar, es recomendable lavarse las manos con agua y jabón para evitar el sobrecrecimiento bacteriano impulsado por la presencia del caldo nutritivo.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo cerebro corazón (BHI)
- Agar sangre
- Agar McConckey
- Agar cetrimida
- Agar Saboraud
- Agar Mueller-Hinton
- Medios cromogénicos para MRSA, ERV o BLEE

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de la colonización bacteriana y fúngica de las manos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Bolsas estériles de polietileno
- Solución alcohólica para higiene de manos
- Reactivos para identificación bacteriana
- Discos de antibióticos para antibiograma

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica
- Estufa para cultivos a 35°-37°C
- Microscopio

7. PROCESAMIENTO

7.1. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

No serán necesarias condiciones especiales para el transporte y conservación de estas muestras. Aún así, dada la importancia y premura en el resultado que exigen estas muestras, lo más recomendable es que se lleven cuanto antes al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Ya en el laboratorio, puede ser conveniente transferir el contenido de las bolsas a recipientes estériles por su mayor facilidad de manejo y por ocupar menos espacio.

7.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Nada más que las muestras sean recibidas en el Servicio de Microbiología, se les asignará a cada una un número de entrada fijo y una descripción en el SIL (sistema informático del laboratorio). Esto es de vital importancia dada la gran cantidad de muestras que se pueden recibir en corto espacio de tiempo y la necesidad de identificar correcta y detalladamente la procedencia de cada muestra.

El caldo de las bolsas de inmersión se sembrará en placas con medios de cultivo a la llegada al laboratorio. Se inocularán unos 0,5 mL del caldo BHI de las mismas en las placas de cultivo, estas se moverán rotatoriamente para distribuir el líquido y después se secarán en una cabina de seguridad biológica. Finalmente, se incubarán las placas en posición invertida y las bolsas o recipientes hasta el día siguiente. Entonces, se volverá a sembrar nuevamente el caldo de las bolsas de la misma manera.

Los medios en los que hay que sembrar el caldo BHI dependerán del microorganismo que se esté tratando de recuperar, por ejemplo, para recuperar bacilos gramnegativos se sembrará en agar MacConkey, para cocos grampositivos se utilizará agar sangre, *Pseudomonas aeruginosa* tendrá un crecimiento óptimo en agar cetrimida y los hongos en Sabouraud. También son muy útiles los medios de cultivo cromogénicos (para detección de SARM, de enterococo resistente a la vancomicina (EVR), de microorganismos productores de BLEE, etc.), ya que permiten distinguir y aislar el microorganismo que se busca en el seno de un cultivo mixto. Las placas de cultivo y los caldos nutritivos se incubarán durante 24 horas a 35°-37°C en aerobiosis.

Se efectuará una primera lectura de las placas a las 24 horas y si no hay crecimiento se volverán a

incubar nuevamente hasta las 48 horas cuando se realizará la lectura final. Se realizará una segunda siembra a partir de los caldos en placas de cultivo tras incubación durante 24 horas. Estas placas seguirán el mismo proceso de lectura que las sembradas directamente.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

8.1. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

Al no haber evidencia de que un número determinado de microorganismos se correlacione con una infección o brote de infección nosocomial, cualquier cantidad de microorganismos de la misma especie aislados en los cultivos de superficies, líquidos, objetos y/o zonas anatómicas anteriormente descritas y estudiadas en este documento por tener un nexo epidemiológico, deberán valorarse. Serán por lo tanto, cultivos cualitativos en todos los casos.

Si se observase el crecimiento de una bacteria semejante a la causante del brote, se procederá a su identificación por medios bioquímicos y a la realización del antibiograma. Tras esto, se dará paso a la realización de técnicas de tipificación molecular al microorganismo aislado. Todos los datos de estas pruebas, se compararán con los efectuados al microorganismo causante del brote al inicio del estudio de cara a emitir un informe.

8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Un resultado negativo es improbable si el trabajador sanitario no ha realizado higiene de manos justo antes de la recogida de la muestra, ya que la microbiota residente vuelve a instaurarse en la piel incluso minutos después de una correcta higiene. Lo normal, por tanto, es que se aisle microbiota residente. Si esto es así y la bacteria causante del brote no pertenece a este grupo se interpretará como una colonización de la piel.

En el seguimiento de una bacteria compatible con la del objeto del estudio, habrá que llegar a la tipificación de la misma para poder interpretar los resultados, ya que las pruebas fenotípicas y de sensibilidad únicamente son pruebas iniciales de apoyo. Es necesaria la tipificación molecular para llegar a un mayor nivel de certeza. La probabilidad de que se trate del mismo microorganismo será muy alta si el resultado es de idéntico o muy relacionado, menor si es moderadamente relacionado y muy baja si es no relacionado. Ante cualquier duda tras la emisión del informe definitivo, se analizarán los resultados dependiendo del método utilizado para el tipado.

8.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En el informe de resultados deberán indicarse claramente los datos cifrados de la persona examinada, la mano desde la que se obtiene la muestra y si esta ha sido obtenida tras higiene de manos o no.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Control microbiológico de la colonización bacteriana y fúngica de las manos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

Como se ha indicado previamente en el apartado de procesamiento de la muestra, se puede emitir un resultado negativo a las 72 horas de la siembra de la muestra. Si el crecimiento observado fuera de microbiota residente y el microorganismo implicado en el brote no fuera perteneciente a este grupo, se puede emitir también un resultado definitivo a las 72 horas indicando la presencia de microbiota habitual de la zona.

Si se hubiese aislado un microorganismo similar al causante del brote, se informará primero de la presencia en una determinada muestra de manos de un microorganismo pendiente de ser identificado. A continuación, tras la realización de las pertinentes pruebas bioquímicas de identificación, del antibiograma y la comparación de estos datos con los del microorganismo implicado en el brote hospitalario, se informará de la presencia o no de un microorganismo con características similares a las del causante del brote pendiente del resultado de las pruebas de tipificación. Tras la realización de las pruebas de tipificación, se emitirá el informe definitivo. En él, se describirá la cepa como idéntica, muy relacionada, moderadamente relacionada o no relacionada a la bacteria en estudio.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Una recogida sistemática de cultivos que no esté sustentada en unos datos epidemiológicos y sin un plan para interpretar y actuar ante los resultados obtenidos, no debería ser llevada a cabo. El hecho de aislar desde las manos del personal sanitario el mismo microorganismo que el implicado en el brote hospitalario, no establece la dirección de transmisión del brote ni implica definitivamente al trabajador sanitario como fuente o reservorio del mismo.

Si el trabajador sanitario ha utilizado productos desinfectantes que contengan iodina, hexaclorofeno o clorhexidina, está indicado el uso de neutralizadores en el medio BHI.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Lynne SG, Isenberg HD, editors. Microbiological assay of environmental and medical-device surfaces. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Washington, D.C. ASM Press; 2004.
2. Diekema DJ, Pfaller MA. Infection control epidemiology and clinical microbiology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007; pp. 118-126.
3. Eliecer M, Domínguez MA, Ezpeleta C, Padilla B, Ramirez de Arellano E, Martínez-Martínez L. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2008;26:220-229.
4. Larson EL, Strom MS, Evans CH. Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. *J Clin Microbiol* 1980; 11:355-360.
5. Society for Healthcare Epidemiology of America. SHEA Guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Contr Hosp Epidemiol* 2003; 24:362-386.