

Control microbiológico ambiental en los laboratorios de reproducción humana asistida

Environmental microbiological control in assisted human reproduction laboratories

Ernesto Veiga Álvarez¹, Carla Olmedo Illueca², María Lourdes Sánchez Castro³, María Fernández Díaz⁴, Alba Mauri López⁵, Empar Ferrer i Robles⁶, Miriam Iglesias Núñez⁷, Luís Martínez Granados⁸, Marisa López Regalado⁸, Nereida Ortiz Peñate⁹

¹Laboratorio Central/Unidad de Reproducción Humana Asistida, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), SERGAS, Santiago de Compostela, España.

²Unidad de Medicina Reproductiva Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, España.

³Unidad de Reproducción Humana Asistida/Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, España.

⁴Clínica ERGO, Gijón, España.

⁵Centro Procrear, Reus, España.

⁶CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia, España.

⁷Hospital Universitario Quirón, Madrid, España.

⁸Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Madrid, España.

⁹Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España.

RESUMEN

La calidad del aire en los laboratorios de reproducción humana asistida es uno de los parámetros clave a controlar. Este documento pretende dar a conocer estos aspectos basándose en la recientemente publicada norma UNE 171340:2020("Una Norma Española"). En España se realiza siguiendo el Reglamento de Instalaciones Térmicas de Edificios (RITE.RD 1027/2007), que es de obligado cumplimiento. La bioseguridad es uno de los aspectos a tener en cuenta y por ello se debe conocer el protocolo de muestreo y verificar que se realiza de forma correcta. La normativa, entre la que se encuentra la citada norma UNE 171340:2020, nos dice en qué puntos realizarlo y con qué periodicidad. En ella se definen estándares microbiológicos de calidad ambiental y niveles de contaminación microbiana y fúngica. El

Aceptado:23/2/21

Correspondencia:Ernesto Veiga Álvarez

Laboratorio Central/Unidad de Reproducción Humana Asistida.

15706 Santiago de Compostela, España.

ernesto.veiga.alvarez@sergas.es

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: fertilidad@editorialmedica.com

cumplimiento de los mismos permite detectar si se produce alguna desviación y qué acciones se deben establecer para que las condiciones ambientales sean las adecuadas en los procedimientos realizados con gametos y embriones.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 38; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Medio ambiente, controlado; Cabinas de seguridad biológica, Incubadores, Microbiología del agua, Microbiología ambiental, Aire acondicionado.*

SUMMARY

Air quality is a key factor in human reproduction laboratories and due to this fact is one of the most important parameters to be controlled. This document aims to make these aspects known based on the recently published Spanish norm UNE 171340:2020. In Spain it is mandatory to meet every requirement included on the RITE.RD 1027/2007 (Regulation on Thermal Installations in Buildings). Bio security is one of the most important aspects taken into account. Sampling procedures must be known, and it is also important to check out that these ones are carried out correctly. Legislation, in which we can include the norm UNE 171340:2020 tells us about which the critical points could be, and how often these points should be tested. In this previously mentioned norm, are clearly stated which are the microbiological standards of environmental quality, and the microbial and fungi contamination that can be allowed. Compliance with them, allows us to detect deviations and to implement corrective actions that ensure the environmental conditions required by gametes and embryos.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 38; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Keywords: *Environment, Controlled, Biological safety cabinets, Incubators, Water microbiology, Environmental microbiology, Air conditioning.*

INTRODUCCIÓN

Para validar el correcto funcionamiento de las salas de ambiente controlado de los laboratorios de Reproducción Humana Asistida (LRHA) se deben conocer los principios fundamentales de control, las recomendaciones de las distintas normas aplicables, los criterios de aplicación, la metodología de ensayo y su periodicidad, así como los criterios de valoración e interpretación de los resultados obtenidos. Este documento pretende dar a conocer estos aspectos basándose en la normativa española en vigor de obligado cumplimiento.

El control de la calidad del aire dentro de las áreas de trabajo del LRHA está englobado en áreas de diagnóstico y tratamiento, y regulado por diversas normativas europeas y nacionales. Con la transposición de las directivas europeas, en España se aprobó el nuevo Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios (RITE. RD 1027/2007). Esta afecta a las instalaciones fijas de climatización (calefacción, refrigeración y ventilación) y de producción de agua caliente sanitaria, tanto en su uso como en su mantenimiento (4). Este RD es de obligado cumplimiento y se apoya en una serie de instrucciones técnicas (IT) y notas técnicas de prevención (NTP), que a su vez se basan en normas UNE.

En el año 2014, la UNE 171330-1:2008 “Calidad ambiental en interiores”, se actualizó con la norma UNE 171330-2:2014 incluyendo como aspecto más destacado la recomendación de la aplicación de la norma UNE-171340:2012 “Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales” para la evaluación de la calidad ambiental en el interior de “áreas críticas” en hospitales y centros sanitarios. Esta actualización especifica que cuando el edificio es un centro sanitario, o tiene áreas críticas como sería el caso de los LRHA, hay que realizar una validación y cualificación anual de la sala. Finalmente, durante el 2020 se ha actualizado a la norma UNE 171340:2020 de validación y cualificación de las salas de ambiente controlado, que aplica ya para los LRHA (Tabla 1), pasando a ser de obligado cumplimiento en los mismos.

RECOMENDACIONES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE (BIOSEGURIDAD AMBIENTAL) EN ÁREAS DE AMBIENTE CONTROLADO

Según la norma UNE 171340:2020, una “sala limpia o de ambiente controlado en hospitales” se define como “aque-

TABLA 1			
Situación de la normativa de control de calidad ambiental y de sistemas de climatización en España			
NORMA	AÑO	CARÁCTER	ASPECTO QUE CUBRE
UNE 100012:2005 ⁽¹²⁾	2005	Obligatorio	Higienización de sistemas de climatización.
RITE RD 1027/2007 ⁽⁴⁾	2007	Obligatorio	Instalaciones fijas de climatización y producción de agua caliente sanitaria (uso y mantenimiento).
UNE 171330-1:2008 ⁽¹³⁾	2008	Obligatorio (en revisión)	Diagnóstico de calidad ambiental interior.
UNE 171330-2:2009 ⁽¹⁴⁾	2009	Anulada	Procedimientos de inspección de calidad ambiental interior.
UNE 171330-3:2010 ⁽¹⁵⁾	2010	Obligatorio	Sistema de gestión de los ambientes interiores.
UNE 171340:2012 ⁽¹⁶⁾	2012	Anulada	Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales.
RITE RD 238/2013 ⁽¹⁷⁾ (modifica ciertos artículos del RD 1027/2007)	2013	Obligatorio para potencia >70kW y según UNE 171330-1:2008	-Instalaciones fijas de climatización y producción de agua caliente sanitaria (uso y mantenimiento) -Calidad Ambiental en hospitales. -Verificación, limpieza e higiene en conductos de ventilación y climatización según UNE 100012:2005
UNE 179007 ⁽¹⁸⁾	2013	Voluntario	Sistema de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción humana asistida.
UNE 171330-2:2014 ⁽¹⁹⁾	2014	Recomendada (en revisión)	Aplica UNE 171340:2012 y anula UNE 171330-2:2009. Procedimientos de inspección de calidad ambiental interior.
UNE 171340:2020 ⁽¹⁾	2020	Obligatorio	Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales incluyendo en anexo el laboratorio de reproducción asistida.

lla sala con las estructuras e instalaciones específicas para controlar la biocontaminación y los parámetros ambientales adecuados” (1). En un LRHA, una “sala limpia o sala de ambiente controlado” sería aquella dotada de las instalaciones y estructuras necesarias que permiten el control de la contaminación ambiental en general y de la biocontaminación en particular, dentro de niveles que no afecten a los procesos, gametos o embriones manejados en las mismas (2). Dentro de estas salas se debe además controlar la concentración de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y las partículas en el aire.

Por otro lado, definiríamos como “área protegida o de trabajo” (cabinas de flujo laminar) la que incluye la zona de trabajo y la zona de manejo de los gametos y embriones, así como las placas estériles de cultivo de estos, los equipos y demás materiales estériles para su manejo, así como la indumentaria del personal.

La contaminación del aire es un problema potencial originado por el transporte ambiental y posterior depósito de los contaminantes sobre las superficies de trabajo. La mayoría de los gérmenes exógenos al laboratorio provienen del aire impulsado y del propio personal, y en mucha menor medida

de los propios materiales del laboratorio. Para evitar sus consecuencias debemos impedir la entrada de los contaminantes en el laboratorio mediante el acondicionamiento, limpieza del aire, gestión de flujos y presiones. Además, debemos eliminar los generados por la propia actividad desarrollada en el mismo, gestionando el número de renovaciones de aire, la limpieza/desinfección del área, vigilando la disciplina de trabajo del personal, y establecimiento los correctos circuitos de trabajo.

La actividad humana es una fuente potencial de contaminación ambiental. Se estima que un embriólogo durante el desarrollo de su actividad laboral genera en torno a 1.000.000 de partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}$ por minuto, y, en promedio, una de cada 1.000 partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}$ transporta una bacteria, por lo que proyecta y libera a la atmósfera unas 1.000 bacterias por minuto (3). Por este motivo, los sistemas de calefacción, ventilación y aire acondicionado (CVAA) deben funcionar de tal forma que la tasa de biocontaminación presente por metro cúbico (m^3) en el aire, se reduzca hasta unos valores que permitan definir al ambiente como un “ambiente controlado”. El adecuado tratamiento del aire y el control del resto de parámetros físicos del entorno, nos permiten garan-

tizar la calidad interior del aire de las salas y poder corregir sus desviaciones de los niveles de alerta y de acción cuando estos se produzcan. **Por lo tanto, para considerar un LRHA como “de ambiente controlado” debemos disponer de los medios adecuados para poder ejercer ese control.**

VERIFICACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD AMBIENTAL. PROTOCOLO DE MUESTREO MICROBIOLÓGICO DEL AIRE

La norma UNE171340:2020, tiene como objetivo determinar la posible presencia de microorganismos en el ambiente interior, cuantificarlos e identificarlos, para así determinar los niveles de contaminación del aire en ese ambiente controlado. Realizar estas mediciones nos permitirá clasificar la sala según su nivel de riesgo y saber si existe una desviación que sea necesario corregir.

El procedimiento para realizar el muestreo microbiológico del aire en estas salas y de las cabinas de flujo laminar o de bioseguridad localizadas en las mismas, recomendado por la Norma UNE 171340:2020 como de primera elección, es el volumétrico y estático.

El protocolo de muestreo microbiológico del aire en salas de ambiente controlado (adaptado de las distintas normas mencionadas) debería tener en cuenta:

1. Técnica de muestreo.
2. Factores que afectan al muestreo.
3. Empleo de cabezales perforados para el muestreo por impacto.
4. Momento del muestreo.
5. Condiciones del muestreo.
6. Zona y número de puntos de muestreo.
7. Caudal del muestreo.
8. Volumen de aire muestreado.
9. Transporte y conservación de las muestras.
10. Medios de cultivo, incubación y lectura.
11. Manejo del cabezal del muestreador de impacto.

Veamos de forma detallada cada uno de ellos.

1. Técnica de muestreo

La técnica de muestreo será por impactación en placa de cultivo mediante Colector-Muestreador volumétrico de impacto (muestreador calibrado anualmente que cumpla con los requisitos de la Norma UNE-EN-ISO 14698 Partes 1 y 2:2004 (5, 6), y con la UNE-EN 13098:2019 (7)). Para ello, el muestreador hace pasar un volumen de aire determinado

a través de una rejilla, impactándolo contra una placa con medio de cultivo.

La selección del dispositivo de muestreo se hace en función de numerosos factores los cuales se describen en el anexo A de la norma UNE 171340:2020. En cualquier caso el muestreo deberá llevarse a cabo por personal debidamente formado y siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante del dispositivo de muestreo (8).

2. Factores que afectan al muestreo

- a) **Efecto de desecación:** dado que la concentración de microorganismos esperada en el aire es baja, se deben tomar grandes volúmenes de aire. Ahora bien, el paso de gran cantidad de aire por la superficie del medio de cultivo de los soportes muestreadores, hace que el medio se reseque, no pudiendo suministrar la suficiente humedad a los microorganismos que impactan sobre la superficie del medio para su crecimiento.
- b) **Efecto de rebote y de paso de largo:** si el aire pasa a gran velocidad por la superficie del medio de cultivo, se provocan turbulencias internas en el muestreador y en la propia placa de cultivo, que impiden el impacto del microorganismo en el medio al rebotar sobre el mismo, o al pasar de largo a través de este, provocando una menor captación microbiana.
- c) **Velocidad de impacto:** debe ser lo suficientemente elevada para permitir captar los microorganismos viables de un tamaño superior a $1 \mu\text{m}$ y suficientemente baja como para garantizar su viabilidad y evitar su alteración mecánica o ruptura celular.

3. Cabezal del muestreador de impacto

El muestreo volumétrico por impactación requiere del uso de cabezales perforados en los dispositivos. Esto provoca que algunos microorganismos impacten en los espacios interporos del cabezal no penetrando en el muestreador, o bien que hayan penetrado varios de ellos por el mismo orificio del cabezal del muestreador (a mayor cantidad de microorganismos en cada toma de muestras, mayor será esta probabilidad). Esto puede traducirse en recuentos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) inferiores a los que existen en la muestra, y este error es mayor cuanto mayor es la presencia de gérmenes en la misma. Este sesgo se corrige calculando el número probable total de UFC aplicando la fórmula de Feller basada en la teoría de la probabilidad:

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

Pr: número probable total de UFC

N: número de orificios de la tapa del muestreador

r: número de UFC contadas en placa Petri de 90 mm

o utilizando la tabla del "Número Más Probable (NMP)" o tabla de corrección estadística de Feller (específica para cada cabezal muestreador ya que el dato aportado depende del número de orificios que tenga) donde conociendo el valor de r , la tabla facilita el valor Pr (el mismo que obtendríamos realizando el cálculo mediante la fórmula de Feller) (3).

4. Momento de muestreo

El muestreo ideal se debe realizar con la sala lista para trabajar (equipos de acondicionamiento de aire en funcionamiento, modo operacional) pero "en reposo", sin actividad (antes de iniciar la jornada diaria y con la sala limpia) con las puertas, ventanas y esclusas cerradas, sin presencia humana o si hay presencia sin hablar, sin moverse ni interferir los flujos de aire. Para la validación con actividad ("en funcionamiento"), se realiza tras 2 o 3 horas de actividad normal.

5. Condiciones durante el muestreo

Se deben anotar y realizar las siguientes comprobaciones:

- a) Temperatura y humedad relativa: medir en dos puntos (lectura doble en cada uno: para aceptación aplicar norma UNE 100713) por cada 500 m² de superficie del área a evaluar, a la altura del área de trabajo (en torno a 1 metro), y evitando zonas de calor/frío (presencia de equipos en funcionamiento, salidas de aire).

Para **temperatura** se usará un sensor de temperatura tipo termistor (acrónimo de THERMally sensitive resisISTOR, resistencia sensible a la temperatura cuya resistividad varía en función de esta) o similar, en periodo vigente de calibración (calibrado anualmente), con un tiempo mínimo de estabilización para cada medida, de 120 segundos.

La **humedad relativa** se medirá mediante sensor capacitivo de polímero de película delgada (absorbe o libera vapor de agua según aumenta o disminuye la humedad relativa del ambiente cambiando sus propiedades dieléctricas y también la capacitancia del sensor) o similar, en periodo vigente de calibración (calibrado anualmente), con un tiempo mínimo de estabilización para cada medida, de 20 segundos.

- b) **Presión diferencial relativa entre salas:** realizar lectura en el sistema de CVAA. En caso de no disponer de la medición automatizada, se realizará medición por duplicado, con equipo en periodo vigente de calibración (calibrado anualmente), dotado de sonda de presión diferencial, colocada desde la sala de referencia hacia cada sala anexa, a través de la vaina existente de toma de presión o en su defecto pasando el tubo de me-

dicción a través de un resquicio de la puerta, y cuidando que no quede estrangulado al paso del aire. Se realiza muestreo durante varios minutos si el equipo permite integración de la lectura, indicando finalmente la presión diferencial máxima, mínima y la media, aceptando la medida si la media es < 6 Pascales en sobrepresión.

- c) **Fecha de la última calibración** de caudales y volúmenes de muestreo del equipo muestreador.
- d) **Número de serie del equipo de muestreo**, el nombre del técnico que toma la muestra y la fecha en que se realiza.
- e) **Carga de la batería del muestreador.**
- f) **Verificar las placas de cultivo**, que no presentan crecimientos previos.
- g) **Evitar interferencias directas** de ventiladores de equipos informáticos o similar.

6. Zonas y número de puntos de muestreo.

En los niveles de riesgo 3, 4 y 5 (correspondientes a ISO 7, 6 y 5, sala "en reposo") según la norma UNE 171340:2020 el número de puntos de muestreo depende de los m² que tenga la sala. Por lo tanto, se recomienda:

- a) Recoger una muestra en la zona de trabajo (en el centro de la sala) y a la altura de trabajo (en torno a 1 metro) si la sala tiene menos de 40 m², dos muestras si tiene entre 40-50 m², y tres puntos de muestreo en salas de más de 50 m².
- b) Según la norma UNE 171340, en salas de ambiente controlado no es necesario realizar toma en la entrada de aire impulsado excepto cuando se está estudiando la fuente de contaminación tras encontrar cultivos positivos en el muestreo convencional. Este muestreo servirá para discriminar si se trata de una contaminación del sistema de ventilación, o de algún problema durante la actividad de la propia sala. En este último caso la forma de tomar la muestra será la misma que para el muestreo habitual.
- c) En salas con cabina de flujo laminar o de bioseguridad: realizar un punto de muestreo de la sala (sala de menos de 40 m²) y otro en el interior de la cabina (en el centro de esta), cada tres meses, además de la validación anual.
- d) Si en el programa de bioseguridad diseñado, se incluye la monitorización de otras zonas de riesgo con solo dos etapas de filtración, recoger muestras en la zona de trabajo y también en las partes altas de la sala (rejilla de impulsión), lo que permite evaluar la calidad del aire que entra en la sala.

- e) Evaluar, si es conveniente, puntos grises que pueden producirse en función del tipo de flujo de aire y su distribución, en los que el aire se renueva con dificultad, o si queremos evaluar la entrada de biocontaminantes.
- f) Cuando se quiera descartar que la fuente de contaminación del aire sean los aparatos con ventilador que están funcionando dentro de la sala, realizar una toma de muestra del propio ventilador mediante una torunda impregnada en medio de cultivo líquido (9).

7. Caudal de muestreo

El ideal es de 0,5 L/s (30 L/min) al obtenerse una mayor recuperación de microbiota con caudales bajos sobre todo en ambientes muy limpios; aunque sería aceptable de 0,5 L/s a 1,5 L/s para salas ISO 5, 6 y 7. Con caudales mayores de 0,5 L/s se disminuye la sensibilidad del método (efecto rebote y paso de largo) aumentando el error, por lo que los recuentos negativos no pueden informarse como “ausencia de microbiota”, sino que se considera que “el número real de UFC/m³ está por debajo del límite de detección del método empleado”. Por ello se debe hacer constar en el informe el caudal utilizado.

8. Volumen de aire muestreado

Muestrear 500 litros de aire (0,5 m³) de una vez para salas ISO 5, 6 y 7. Esto supone unos 17 minutos funcionando el muestreador a 0,5 L/s.

9. 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 film plástico para evitar contaminaciones durante su traslado. Las muestras se enviarán al Laboratorio o Servicio de Microbiología perfectamente identificadas indicando la sala donde se ha realizado la toma de muestras y la condición de esta (sala vacía o con actividad).

10. Los medios de cultivo, incubación y lectura.

Se describen en la Tabla 2. La norma UNE 171340:2020 también da la posibilidad de que en bacterias contemos microbiota aerobia total mesófila y también discriminemos bacterias que pueden ser patógenas para los gametos o embriones.

TABLA 2

Medios de cultivo, incubación y lectura

Microbiota	Medios de cultivo sólidos en placa Petri o Rodac de 90 mm*	T ^a de incubación	Tiempo de incubación	Lectura de los resultados
Microbiota aerobia total mesófila	Agar Tripticasa Soja (TSA): estándar o Agar base TSA + lecitina+ tween (A-LTP): más sensible, pudiendo recuperar más UFC	35-37°C ± 1°C	3 días	Lectura cada 24h (Informe final al 3º día)
Hongos filamentosos y levaduras	- Agar de Saboreaud + Dextrosa +cloranfenicol (+/- gentamicina): estándar o - Agar Rosa de Bengala CAF: más sensible a la hora de discriminar el umbral “1 UFC/m ³ ”	OPCIÓN 1 : (según la UNE-171340) 1º Estufa a 37°C ± 1°C** + 2º T ^a ambiente (21-25°C) OPCIÓN 2 (cuando la T ^a ambiente no sea controlable) Incubación en estufa a 25°C + 1 °C	2 días + 3 días 5 días*	Lectura cada 24 horas (Informe intermedio al 3º día y final al 5º día**)

* Depende del automuestreador. Algunos autores demuestran mayores recuentos (mayor sensibilidad de la prueba) con las placas Rodac. Las muestras se conservan y transportan hasta el laboratorio de Microbiología a T^a ambiente.

** Para investigar especies fúngicas termotolerantes como *Aspergillus fumigatus* inhibiendo el crecimiento de otros hongos ambientales.

***Algunos autores recomiendan realizar la incubación para hongos hasta los 7 días.

Adaptado de Cuadra et al. 2014.

11. Manejo del cabezal del muestreador de impacto

Se recomienda realizar desinfección del cabezal en los siguientes momentos:

Entre tomas: la primera toma se inicia con cabezal estéril (autoclavado) y entre tomas se realizará desinfección con alcohol de 70°, esperando su evaporación antes del uso y se mantendrá cubierto con su tapa.

Entre sesiones: tras cada sesión de muestreo se esterilizará en autoclave.

INFORME DE LOS RESULTADOS

Los microorganismos deben contarse e identificarse para poder establecer la patogenicidad de los mismos y decidir qué actuación realizar. Por lo tanto, el informe debería cubrir los siguientes aspectos:

Estudio cuantitativo (número de colonias):

- El recuento de colonias que hayan crecido (r) se expresa en UFC/m³ de aire.
- Utilizar la tabla o fórmula de Feller para dar el NMP (cada muestreador suele venir acompañado con su tabla de conversión).
- En caso de no calcularse el NMP indicar en el informe que se trata de “lectura directa” de UFC.
- Cuando se utilicen caudales de muestreo altos (1,5 L o mayores) informar la ausencia de crecimiento de UFC como “Por debajo del límite de detección de la técnica”.
- Incluir en el informe los parámetros de la sala (Temperatura y Humedad Relativa) y del muestreo (muestreador, caudal, volumen, tipo de placa y medios, y tiempos de incubación).

Estudio cualitativo (identificación de la microbiota):

- Bacterias Gram positivas (*Staphylococcus coagulans* negativos como *Staphylococcus epidermidis* y *saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria spp.*): suelen aparecer por deficiente cumplimiento de las normas por parte del personal, niveles altos de ocupación y/o renovación de aire insuficiente.
- Bacterias Gram negativas (enterobacterias, *Pseudomonas*; *Legionella*, *Rhizobium radiobacter*): contaminación por aerosoles generados durante la limpieza, presencia de humedades, limpieza y desinfección inadecuada de los sistemas de ventilación (torres de refrigeración, humidificadores).
- Hongos filamentosos y levaduras: se realizará para evaluar anomalías en los sistemas de CVAA (climatización y estructura) con toma de muestra con la sala vacía (reservorio de

los humidificadores, torres de refrigeración) y para valorar la circulación del personal en la sala, la limpieza de los equipos o contaminaciones provenientes del entorno por la apertura de puertas cuando se realiza la toma de muestra con actividad. Identificarlos hasta el nivel mínimo de género.

- Virus: son microorganismos que no viven independientemente fuera de células y tejidos vivos. Aunque algunos se desplazan en el aire recirculante de los sistemas de CVAA, el principal medio de transmisión es el contacto entre personas. Por ello, no se realiza estudio de estos y sí se recomienda al personal que padezca alguna infección vírica, que utilice medidas de protección individual para evitar tanto su difusión al ambiente como a las muestras que manipule.

Envío de informes: En el informe se destacarán los puntos NO CONFORMES, indicando el recuento de colonias, género de los hongos aislados (cuando se concluya la identificación también se informará la especie) y actuaciones a desarrollar (9).

- Si se obtiene un resultado positivo de hongos es importante realizar un informe provisional rápido indicando el recuento de colonias y género del hongo mientras no se tenga la identificación definitiva del hongo a nivel de especie. Esta información precoz permitirá tomar decisiones rápidas sobre la sala.
- En cuanto al recuento de aerobios se realizará un único informe a las 72 horas indicando el número de UFC. En los informes debe constar el espacio y si el muestreo se realizó en reposo o actividad.

El **circuito de información recomendado** es el siguiente:

1. El Servicio o Laboratorio de Microbiología comunica el resultado a Medicina Preventiva o a la empresa externa.
2. Estos valoran el resultado y proponen las medidas y acciones a tomar, cuando sean necesarias, al director de la Unidad de Reproducción y al director/Coordinador del laboratorio de la Unidad.
3. Cuando la Unidad se encuentra en un Hospital, Medicina Preventiva informará periódicamente a la Comisión de Infecciones.

Debe existir un **registro de los controles efectuados** que incluya la medición efectuada, las medidas de los parámetros evaluados y el periodo de validez de la medición.

PERIODICIDAD, PUNTOS DE MUESTREO Y PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO

Tanto las áreas, como la periodicidad y puntos de muestreo, estarán contemplados en un protocolo normalizado de trabajo (**PNT**) que aborde al menos los siguientes apartados:

1. Objetivos
2. Áreas y lugares
3. Tipo
4. Número y volumen de las muestras
5. Frecuencia
6. Condiciones
7. Identificación de las áreas y muestras
8. Transporte y conservación de las muestras
9. Medios de cultivo utilizados
10. Temperaturas y tiempos de cultivo
11. Expresión e interpretación de resultados
12. Factores de corrección

Por otro lado, según la UNE 171340:2020, se deben realizar los controles en las áreas de ambiente controlado al menos en las siguientes situaciones:

- **Cualificación previa** a puesta en marcha.
- **Cualificación post-mantenimiento**, incluido cambio de filtros, en caso de reforma mayor, anomalía, altas temperaturas, limpieza del sistema de ventilación, humedades en paredes.
- **Cualificación anual** de condiciones de uso.

Se harán en modo operacional, tanto en funcionamiento como en reposo de forma obligatoria salvo la cualificación anual en reposo que será opcional.

El organismo validador será externo a excepción de la cualificación post-mantenimiento que podrá validarla un organismo interno o externo.

Se tendrán en cuenta los siguientes parámetros ambientales (temperatura, humedad relativa y biocontaminación).

La frecuencia de estos controles se debe adecuar a las circunstancias particulares o tipología del área de ambiente controlado en general y se recomienda realizar el muestreo detallado en la Tabla 3.

Por último, aunque la norma UNE 171340:2020 no lo contempla, recomendamos realizar controles microbiológicos en el interior de las incubadoras (superficie o agua de las bandejas), por lo menos durante la validación anual de biocontaminación.

ESTÁNDARES MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD AMBIENTAL. CRITERIOS DE VALORACIÓN DE RESULTADOS.

La norma UNE EN ISO 14698-1:2004 (5) define tres niveles a utilizar para la contaminación microbiológica ambiental:

TABLA 3		
Frecuencia recomendada de las tomas microbiológicas en áreas de ambiente controlado tipo B ISO Clase 7 (UNE 171340:2020)		
Frecuencia*	Lugar	Puntos de muestreo
Validación mínima anual de condiciones de uso	Salas y laboratorios de Reproducción asistida	1 punto en la zona de trabajo
	Cabinas de flujo laminar o de bioseguridad.	1 punto bajo la cabina
Control Trimestral (Riesgo 3)	Salas y laboratorios de Reproducción asistida	1 punto en la zona de trabajo
	Cabinas de flujo laminar o de bioseguridad	1 punto bajo la cabina
Control Anual (Riesgo 1/2)	Salas y laboratorios de Reproducción asistida	1 punto en la zona de trabajo
	Cabinas de flujo laminar o de bioseguridad	1 punto bajo la cabina
Otras	Obras, infecciones nosocomiales, por orden del servicio de Medicina Preventiva, tras desinfección de cabina por alguna de las siguientes situaciones ⁽¹¹⁾ : * En caso de que se produzca un vertido importante. * Antes de cualquier reparación. * Antes de iniciarse los chequeos periódicos. * Siempre que se cambie el programa de trabajo. * Cuando se sustituyan los filtros HEPA. * Al cambiarla de lugar, incluso dentro del mismo laboratorio.	Zona del vertido, limpieza, sustitución de filtros, cambio de ubicación, reparación.

1. Nivel blanco: objetivo de calidad que coincide con los niveles óptimos.

2. Nivel de alerta: primera alerta en caso de desviación respecto a las condiciones normales y cuando se excede, dará lugar a un seguimiento reforzado del proceso.

3. Nivel de acción: cuando se supera, precisa una intervención inmediata, búsqueda de la causa, y una acción correctiva.

NIVELES DE CONTAMINACIÓN BACTERIANA: AEROBIOS MESÓFILOS TOTALES

Para muestreos realizados en modo reposo y en funcionamiento, se muestra en la Tabla 4 los niveles permitidos de contaminación bacteriana.

La norma UNE 171340:2020 establece los niveles óptimos que coincidirían con la definición del nivel blanco de la norma UNE EN ISO 14698-1:2004, pero no establece como esta última, niveles operativos de alerta ni de acción, quedando en manos de cada centro la definición de estos. A modo de ejemplo, en la Tabla 5 se detalla la propuesta para quirófanos de la Sociedad Andaluza de Medicina Preventiva y Salud Pública (8), no para salas limpias en general.

El reciente consenso del Cairo de calidad del aire, acepta como único valor normal para los LRHA, menos de 10 UFC/m³ "en reposo" (10).

NIVELES DE CONTAMINACIÓN FÚNGICA

Para muestreos realizados en modo reposo y en funciona-

miento, como se muestra en la Tabla 4, no puede existir ningún hongo para el nivel 3, y hasta 10 ufc de hongos para el nivel 2 y en un local de clase I (con tres etapas de filtración), con ambiente controlado, mientras que, en las cabinas, el límite de UFC/m³ de aire admisible no debe ser superior a 0 UFC. La presencia de estos hongos filamentosos en el muestreo del aire en estas salas "de ambiente controlado" es por tanto una "no conformidad".

El reciente consenso del Cairo de calidad del aire acepta como valor normal menos de dos esporas/m³ "en reposo" (10).

La contaminación del aire por otros hongos (*Penicillium spp.*, *Candida*, otras levaduras), debe ser motivo de la revisión de los parámetros ambientales de climatización, para verificar el buen funcionamiento del sistema.

PROPUESTA DE ACTUACIONES ANTE UNA "NO CONFORMIDAD" DE BIOSEGURIDAD AMBIENTAL EN ÁREA CONTROLADA Y CABINA DE FLUJO LAMINAR

Tanto la presencia de hongos en el aire como de bacterias mesófilas en cualquier área controlada o cabina, por encima de los niveles aceptables ocasionando una **no conformidad**, obliga a valorar la pertinencia de suspender la actividad. Esta decisión será valorada por el servicio de Medicina Preventiva o la empresa externa a cargo de acuerdo con la Dirección del Laboratorio y la Dirección Médica de cada centro.

En cualquier **no conformidad en las áreas de ambiente controlado** las tareas de mantenimiento a realizar serán (Tabla 6):

TABLA 4

Interpretación de resultados

NIVEL DE RIESGO (UNE 171340:2020)	Clase de sala (UNE EN ISO 14644)		Biocontaminación Aerobios mesófilos (ufc/m ³)		Hongos filamentosos y levaduras (ufc/m ³) (en reposo y en funcionamiento)
	Modo operacional En reposo	Modo operacional En funcionamiento	Modo operacional En reposo	Modo operacional En funcionamiento	
5 (MUY ALTO)	ISO5	No aplica	<10	No aplica	Ausencia
4 (ALTO)	ISO 6	No aplica	<10	No aplica	Ausencia
3 (MEDIO)	ISO 7	ISO 8	<100	<150	Ausencia
2 (MODERADO)	ISO 7	ISO 8	<100	<200	<10 Ausencia de patógenos*
1 (LIGERO)	ISO 8	ISO 9	<200	<200	<25 Ausencia de patógenos*

*Se consideran hongos patógenos a las especies *Aspergillus*, *Rizhopus*, *Mucor* y *Scedosporium*.

TABLA 5

Propuesta de niveles de calidad operativos			
Niveles de calidad	Nivel blanco	Nivel de alerta	Nivel de acción
Quirófanos de Muy Alto Riesgo y Zonas de Muy alto riesgo (ISO 5 e ISO 6, Clase A)	≤ de 10 UFC/m ³	-	>10 UFC/m ³
Quirófanos de Alto Riesgo y Zonas de Alto Riesgo (ISO 7, Clase B)	≤ de 10 UFC/m ³	11-100 UFC/m ³	>100 UFC/m ³
Quirófanos y Zonas de Riesgo Intermedio (ISO 8, Clase C)	≤ de 100 UFC/m ³	101-200 UFC/m ³	>200 UFC/m ³

1) Revisión del sistema de CVAA para detectar posibles causas:

- Comprobar la fecha del último cambio de filtros.
- Revisar la integridad y la colmatación de cada filtro de los tres niveles de filtración (prefiltro, filtros intermedios y filtro HEPA terminal).
- Comprobar los parámetros ambientales: temperatura y humedad relativa del área, presiones diferenciales, flujos de impulsión y extracción, número de renovaciones de aire/hora. Ver Tabla 6.

2) Limpiar el área, rejillas y conductos accesibles, tras corrección de las anomalías si se detectaron (superficies horizontales y verticales, incluyendo equipamiento y almacenamiento de fungibles), con desinfectante de superficies apropiado para laboratorios de Fecundación in Vitro (FIV) y con marcado CE.

Ante una **no conformidad en una cabina** las tareas de mantenimiento a realizar serán (Tabla 6):

- Revisar la cabina para detectar posibles causas:
 - Comprobar la fecha del último cambio de filtros.
 - Revisar la integridad y la colmatación de cada filtro (prefiltro y HEPA).
 - Revisar los ventiladores de impulsión de aire.
 - Revisar el sistema de gaseado y humidificación: control de la estanqueidad en las válvulas de los fluxómetros desde la botella hasta los caudalímetros.

2) Comprobar los parámetros físicos: velocidad de flujo de impulsión, retención de partículas (según fabricante).

3) Limpiar la cabina, las rejillas de impulsión y los conductos accesibles, tras corrección de las anomalías si se detectaron, con desinfectante de superficies apropiado para laboratorios de FIV y con marcado CE.

Tanto para áreas de ambiente controlado como para cabinas, se revisarán los aspectos higiénicos (vestimenta, higiene de manos) y de la circulación del personal (apertura de puertas y exclusas, respeto de los circuitos de trabajo, entrada de personal externo). En el caso de las cabinas se evitará introducir materiales que emitan partículas (11) y se vigilará la limpieza de la misma tras cada uso. Además, se realizará una nueva toma de muestras de control tras la aplicación de las acciones correctivas.

CONCLUSIÓN

El control de calidad del aire en los LRHA es de suma importancia para el mantenimiento de las condiciones de cultivo. Cualquier pequeña desviación en las condiciones podría repercutir en los resultados incluso de las técnicas de reproducción asistida. En este artículo se describen los ensayos que se deben realizar para el control microbiológico ambiental en los LRHA y cuáles son los distintos parámetros a evaluar, los resultados de los ensayos a registrar, la presentación de los resultados obtenidos mediante informes, los criterios de interpretación y valoración de los mismos, así como actuar ante una no conformidad.

TABLA 6

Áreas de ambiente controlado y tres niveles de filtración (con filtro HEPA terminal) y cabina de flujo laminar			
NO CONFORMIDAD EN:	POSIBLES CAUSAS	ACCIÓN CORRECTIVA	RESPONSABLE DE LA ACCIÓN CORRECTIVA
ÁREA AMBIENTE CONTROLADO	Problemas o fallos en el SISTEMA DE CLIMATIZACIÓN	Cambio o ajuste de filtros intermedios y/o HEPA, o ajuste de los parámetros físicos	Servicio de Mantenimiento
	Entrada del EXTERIOR	Cierre correcto de puertas y exclusas	Servicio de Mantenimiento
	REMOCIÓN desde superficies horizontales y verticales	Revisión de estanqueidad y desajustes de presiones y flujos Limpieza a fondo (incluyendo rejillas y conductos accesibles)	Servicio de Limpieza
	Deficiencias en la observación de las normas de HIGIENE y CIRCULACIÓN del personal	Cumplimiento de los protocolos existentes de higiene del personal y circulación de este	Personal del área Personal de Medicina Preventiva
CABINA DE FLUJO LAMINAR O DE BIOSEGURIDAD	Problemas o fallos en el SISTEMA DE FILTROS o IMPULSIÓN DE AIRE	Cambio o ajuste de filtros o ajuste de los motores de impulsión	Servicio de Mantenimiento
	No conformidad en las áreas de ambiente controlado	Realizar las tareas de mantenimiento necesarias en el área donde se sitúa la cabina	Servicio de Mantenimiento
	REMOCIÓN desde superficies horizontales y verticales, o desde el sistema de gaseado y humidificación	Limpieza a fondo de superficies horizontales y verticales Cambio de tubos de CO ₂	Personal del laboratorio Servicio de Mantenimiento
	Deficiencias en la observación de las normas de TRABAJO en la cabina	Cumplimiento de los protocolos existentes de trabajo por parte del personal	Director/ Responsable del laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

1. **UNE 171340:2020** Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales [Internet]. [citado 3 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?Tipo=N&c=N0064465>
2. **Pastor, P.** DTIE 1.06: INSTALACIONES DE CLIMATIZACIÓN EN HOSPITALES [Internet]. Atecyr. 2012 [citado 22 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.atecyr.org/publicaciones/es/dtie/31-dtie-106-instalaciones-de-climatizacion-en-hospitales.html>
3. **Protocolo-Bioseguridad-ambiental-Corregido.pdf** [Internet]. [citado 24 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.sociedadandaluzapreventiva.com/wp-content/uploads/Protocolo-Bioseguridad-ambiental-Corregido.pdf>
4. **Real Decreto 1027/2007 de 20 de Jul** (Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios) Iberley [Internet]. [citado 24 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.iberley.es/legislacion/real-decreto-1027-2007-20-jul-reglamento-instalaciones-termicas-edificios-4817359>
5. **UNE-EN ISO 14698-1:2004** Salas limpias y ambientes controlados asociados. Control de la biocontaminación. Parte 1: Principios y métodos generales (ISO 14698-1:2003) [Internet]. [citado 19 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0031347>
6. **UNE-EN ISO 14698-2:2004** Salas limpias y ambientes controlados asociados. Control de la biocontaminación. Parte 2: Evaluación e interpretación de los datos de biocontaminación. (ISO 14698-2:2003) [Internet]. [citado 19 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0031301>
7. **UNE-EN 13098:2019** (Ratificada) Atmósferas en el lugar de trabajo. Medición de microorganismos y compuestos microbianos en suspensión en el aire. Requisitos generales (Ratificada por la Asociación Española de Normalización en noviembre de 2019.) [Internet]. [citado 19 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0062676>
8. **Cuadra AR, Molina CD, Pérez CE, Casares ER, Salas J de D, Méndez MÁL, et al.** Sociedad Andaluza de Medicina Preventiva y Salud Pública. 2014;35.
9. **Andrés JLB, García-Campero AD-I, Baquedano CE.** Carmen Ezpeleta Baquedano. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2012;31.

-
10. **Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST, Fawzy M, McCulloh DH, Morbeck DE, et al.** Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. junio de 2018;36(6):658-674.
 11. **Jiménez García MI, de Monserrat Vallvé J, Moreno Cebeira JM, Rodríguez Pérez T, Sánchez Pozo MC.** Recomendaciones para el mantenimiento de equipos en el Laboratorio de Andrología y Embriología. Segunda parte. Equipos auxiliares. *Laboratorio Clínico* [Internet]. 1 de octubre de 2019 [citado 3 de noviembre de 2019];12(4):e11-20. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-recomendaciones-el-mantenimiento-equipos-el-S1888400818300588>
 12. **UNE 100012:2005** Higienización de sistemas de climatización [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/UNE?c=N0032742>
 13. **UNE 171330-1:2008** Calidad ambiental en interiores. Parte 1: Diagnóstico de calidad ambiental interior [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/UNE?c=N0041499>
 14. **UNE 171330-2:2009** Calidad ambiental en interiores. Parte 2: Procedimientos de inspección de calidad ambiental interior [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/une/?Tipo=N&c=N0042873>
 15. **UNE 171330-3:2010** Calidad ambiental en interiores. Parte 3: Sistema de gestión de los ambientes interiores [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/UNE?c=N0045311>
 16. **UNE 171340:2012** Validación y cualificación de salas de ambiente controlado en hospitales [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/UNE?c=N0048723>
 17. **Ministerio de la Presidencia.** Real Decreto 238/2013, de 5 de abril, por el que se modifican determinados artículos e instrucciones técnicas del Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios, aprobado por Real Decreto 1027/2007, de 20 de julio [Internet]. 2013 [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2013-3905>
 18. **UNE 179007:2013** Servicios sanitarios. Sistemas de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción asistida. [Internet]. 2013 [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/UNE?c=N0052212>
 19. **UNE 171330-2:2014** Calidad ambiental en interiores. Parte 2: Procedimientos de inspección de calidad ambiental interior [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/UNE?c=N0054187>