

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A  
CRIOTECA®  
PLAQUIS®  
M-IDENT®  
NEOGRAM

COSMETIKIT®  
CHROMOSALM  
KITPRO-PLUS  
SEILAGUA®  
ENVIROCOUNT

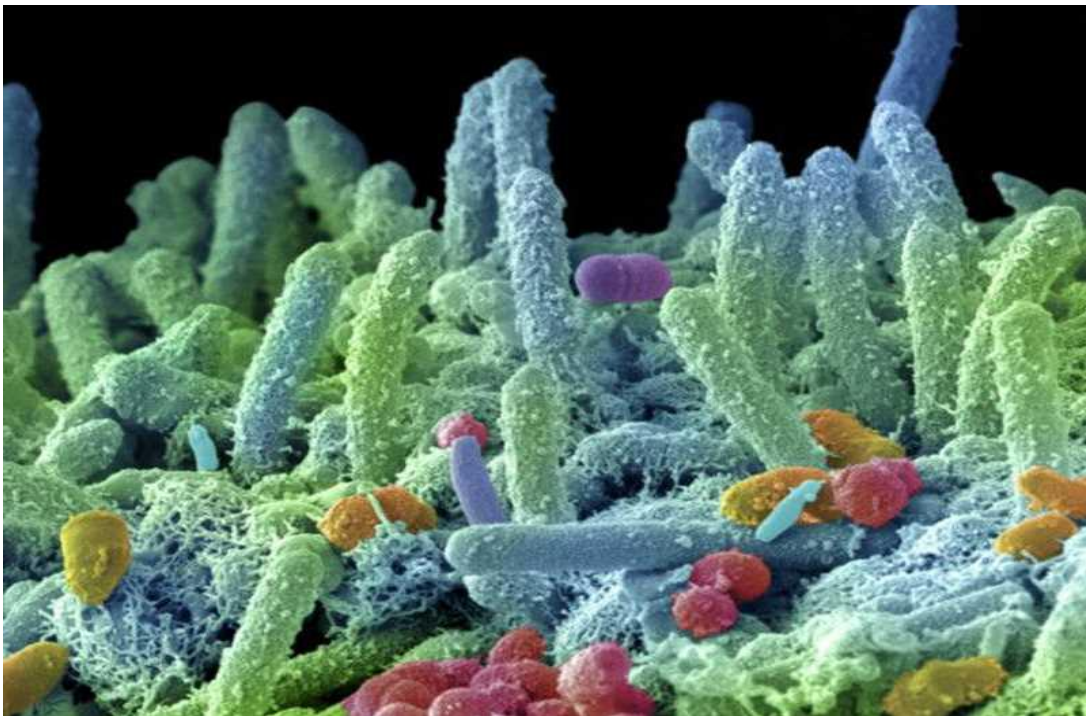
DRY PLATES®  
DESINFECTEST®  
CROMOKIT®  
SALMOQUICK

MUGPLUS  
CCCNT  
MBS  
AIRESANO

## MONOGRAFÍA *Control microbiológico de superficies*

### 1-Introducción

El control de superficies es uno de los puntos más críticos en todo tipo de lugares, máxime si se han de seguir GMPs. Algo muy importante a tener en cuenta es que no existe correlación entre los recuentos en superficies y los recuentos en el aire de una misma sala (pueden encontrarse altos recuentos en unas y bajos en el otro, o viceversa), lo que obliga a realizar ambos tipos de análisis (profundizaremos en el tema del aire en otro de nuestros monográficos).



Existen 3 métodos, independientemente de los lugares donde se apliquen y de si se busca recuento o presencia/ausencia:

- a) **Método de contacto** según los estudios publicados en nuestra web, recupera el 90% de la microbiota presente, siempre que se haga correctamente:



placa Rodac de 25 cm<sup>2</sup> (“Envirocount” en nuestro caso), aplicada 10 segundos, apretando sin mover. Es el método habitual en salas blancas. O bien laminocultivo *dipslide* (“Desinfectest” en nuestro caso) aplicado de la misma forma, con las ventajas de tener menos diámetro (10 cm<sup>2</sup> -2 x 5 cm- en el caso de Desinfectest, lo cual es ideal para superficies cóncavas o convexas. Muchas otras marcas no llegan a los 10 cm<sup>2</sup> por cara) y de tener dos caras por kit, aparte de un cierre semihermético que no tienen las placas Rodac y permite manipularlos con mayor facilidad por la fábrica.



- b) Método de barrido (sería mejor llamarlo “rascado” para evitar su mala práctica)** con escobillón (torunda, hisopo...), esponja abrasiva... según los estudios publicados en nuestra web, recupera menos que el método de contacto (buena parte de la microbiota se queda en la superficie), pero se ha de aplicar sin remedio en superficies donde es difícil realizar el primero (esquinas, superficies rugosas, interior de tuberías y grifos...) y en zonas tropicales (excepto salas blancas), donde la microbiota de superficies está demasiado concentrada y el método de contacto se hace muy difícil para contar. La Norma ISO 18593:2019 tiene en cuenta diversos aspectos interesantes del muestreo por barrido y la guía ANSES también. Pero lo más importante es que la superficie esté húmeda (o humedecerla pulverizando agua estéril, si no lo está) y que el barrido se convierta en un “rascado con fuerza” para poder arrancar el biofilm. Las esponjas abrasivas recogen más cantidad de microbiota que las bayetas y éstas más que los escobillones, por mera textura física. Para realizar posteriores recuentos, no se deben emplear caldos que permitan la multiplicación celular (sino solución salina) o no se debe esperar demasiado tiempo entre la toma de muestra y la siembra en placa.



- c) Métodos indirectos** que miden, en lugar de ufc/cm<sup>2</sup>, otras magnitudes, por ejemplo rlu de ATP, µg de proteína, etc. No son métodos que puedan sustituir los anteriores de contacto/rascado desde el punto de vista microbiológico, pero son muy útiles como complementos de los mismos para validar limpiezas y conocer de forma inmediata el estado higiénico de una superficie para saber si hace falta limpiarla de nuevo (ya que puede estar visualmente limpia pero llena de materia orgánica que va a generar multiplicación microbiológica en las próximas horas; o puede estar aparentemente sucia por polvo inorgánico sin trascendencia microbiológica). Estos



métodos indirectos marcan la diferencia entre limpieza física (que es lo que miden) y desinfección química (que es lo que miden los métodos microbiológicos de contacto y rascado). Ambos temas son de la máxima importancia y no se debe prescindir de uno por centrarse en el otro.



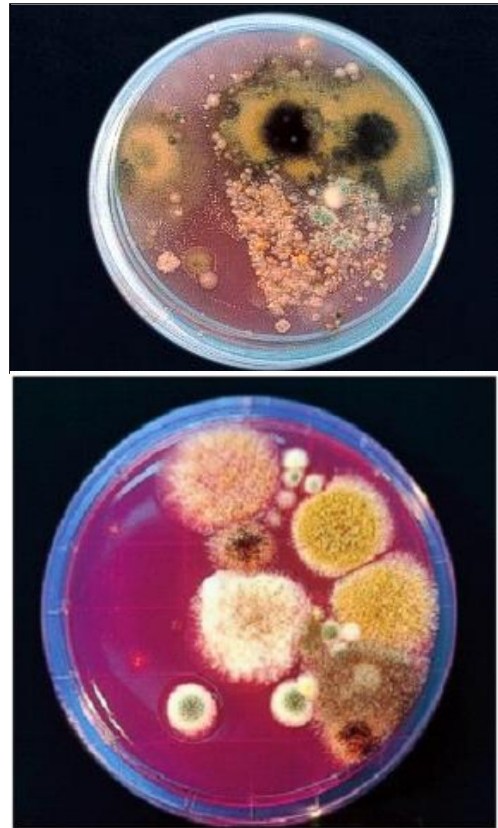
**2-Los lugares donde la legislación exige su búsqueda o recuento, así como otros lugares donde a nuestro criterio, sería recomendable analizarlos**



**-Lugares públicos (APHA) tras la desinfección:**

<u>LUGAR</u>	<u>BUENO</u>	<u>NUMERO DE COLONIAS POR 25 cm<sup>2</sup></u>	<u>REGULAR</u>	<u>MALO</u>
Suelo habitación hospital	0-25	26-50		más
Mesa habitación hospital	0-5	6-15		más
Guardería	0-5	6-15		más
Suelo baño	0-25	26-50		más
Retrete baño	0-15	16-25		más
Tocador baño	0-5	6-15		más

**-Ambientes interiores**, la ISO 100012 exige el control microbiológico de superficies mediante placa Rodac en cualquier espacio interior, desde el punto de vista de los riesgos laborales, lo cual es extrapolable a cualquier otro tipo de superficie para la que no haya legislación ni normativa específica. También exige el uso de los medios de cultivo que se han demostrado más adecuados en superficies (LPT Neutralizing Agar para aerobios y Rosa Bengala Caf Agar para hongos). Según dicha Norma debe haber  $< 100$  ufc/25 cm<sup>2</sup> de bacterias y  $< 100$  ufc/25 cm<sup>2</sup> de hongos antes de la desinfección/limpieza; y  $< 10$  ufc/25 cm<sup>2</sup> de bacterias y  $< 10$  ufc/25 cm<sup>2</sup> de hongos tras la limpieza o desinfección. Dado que un laminocultivo DESINFECTEST® tiene una superficie de 10 cm<sup>2</sup>, quien prefiera este método a las placas Rodac de 25 cm<sup>2</sup>, debe buscar menos de 40 colonias de bacterias o de hongos por cara antes de la desinfección/limpieza y menos de 4 colonias de bacterias o de hongos por cara tras la desinfección/limpieza.



**-Fábricas de Alimentos:** existen diversas recomendaciones estandarizadas (adicionales a las dadas arriba para aerobios y hongos sobre lugares públicos y ambientes interiores), por ejemplo en catering, Solberg and Co. (Food Technology 12-1990), recomiendan recuentos inferiores a 1 colonia por 25 cm<sup>2</sup> en productos recién lavados y a 4 colonias por 25 cm<sup>2</sup> en productos lavados hace dos semanas; en Superficies de fábricas de productos cárnicos, Niskanen and Pohja (1977), recomiendan un máximo de 480 cfu de aerobios, de 25 *Escherichia coli* y de 25 *Staphylococcus aureus* por cada muestra de 25 cm<sup>2</sup> en industrias varias. Orihuel et al., Alimentación, Equipos y Tecnología, 9/1996, recomiendan  $< 9$  colonias Aerobios / 25 cm<sup>2</sup> en mataderos de aves tras la desinfección,  $< 36$  colonias Aerobios / 25 cm<sup>2</sup> en industrias cárnicas,  $< 10$  colonias Aerobios / 25 cm<sup>2</sup> en plantas de embotellado de agua mineral,  $< 7$  colonias Aerobios / 25 cm<sup>2</sup> en carnicerías y pescaderías de un supermercado y  $< 4$  colonias Enterobacterias/25 cm<sup>2</sup> para industrias cárnicas.

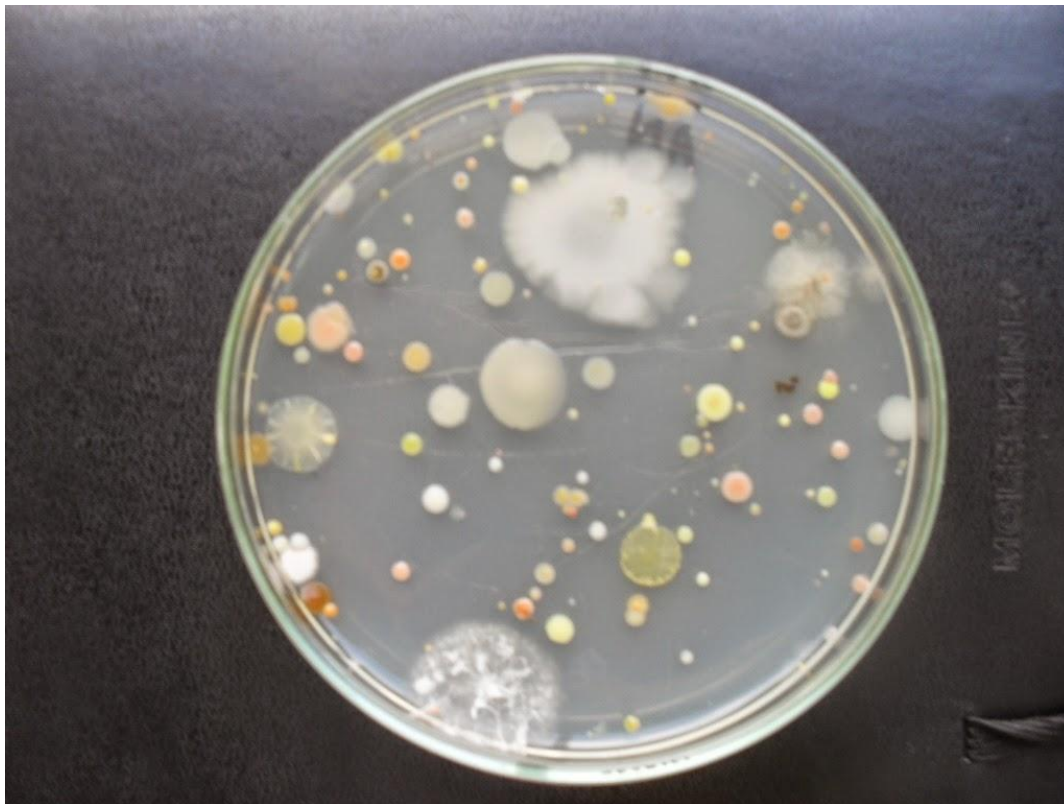


**-Industria farmacéutica**, con especial hincapié en las Salas Blancas, mediante placas Rodac, donde existen niveles máximos según el grado de clasificación de la sala, en general  $< 5$  colonias aerobios/25 cm<sup>2</sup> en zonas limpias y 0 colonias aerobios/25 cm<sup>2</sup> en zonas estériles



-**Fábricas de Cosméticos**, no hay una mención específica, pero la inocuidad del cosmético derivada del Reglamento UE 1223:2009 implica la ausencia de patógenos en el entorno de trabajo y las GMPs (ISO 22716) exigen el control no sólo del producto final, sino además, de las materias primas, las instalaciones, los operarios... por lo que deberían aplicarse los mismos criterios vistos más arriba de ambientes interiores para aerobios y hongos; y buscar además los patógenos más típicos de cosmética que se pueden acumular en las superficies (sobre todo *St.aureus*)

-**Laboratorios de microbiología**, no existe normativa específica a pesar de ser el foco emisor biocontaminante más importante (seguido de los **aires acondicionados**), por lo que en ambos lugares sería fundamental aplicar la Norma ISO 100012 y controles específicos de los patógenos con los que trabaje el laboratorio, aunque trabaje bajo filtros HEPA y presión diferencial.

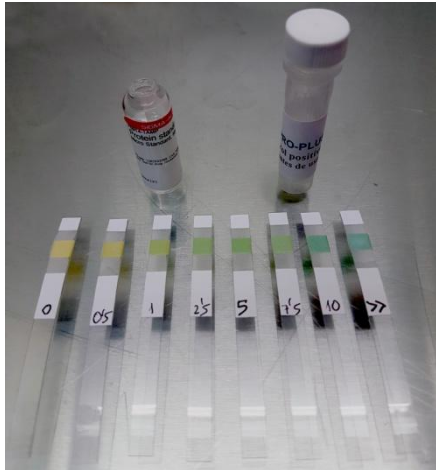


### 3-Los métodos oficiales para su detección/recuento

**En lugares públicos y ambientes interiores**, (sobre todo en los que tienen sistemas de climatización) el criterio es la placa Rodac de 25 cm<sup>2</sup> según ISO 100012, extrapolable a laminocultivos cuya superficie de agar convexo sea de 2x5 cm<sup>2</sup> (10 cm<sup>2</sup>) y haciendo los cálculos pertinentes (dividir el recuento máximo admitido por el factor 2,5)

**En fábricas de alimentos**, se suele seguir la ISO 18593:2019 y la guía Anses. Según reglamento UE 2073-2005, se exige además en toda superficie de manipulación o transporte de alimentos, la búsqueda rutinaria de *Listeria spp.* en puntos críticos. Dada la complicación que supone el método Anses para *Listeria* en superficies, la mayoría de fábricas prefiere el uso

de kits preparados de alta eficacia, como el Listeriswabs-Green (foto derecha), y extrapolan la búsqueda de Salmonella, Coliformes, Estafilococos, *B.cereus* y Hongos, con los homólogos kits de rascado. Sin olvidar el control y validación de limpieza mediante bioluminiscencia ATP o mediante kits de búsqueda de residuos de proteína, como el KitProPlus (foto debajo).



**En fábricas de medicamentos,** Pharmacopea exige el control exhaustivo en salas blancas mediante placas Rodac de TSA, de TSA con inactivadores (en nuestro caso llamadas Envirocount-Neutralizing) y de SDA o SDA+Caf. Y en salas estériles, dichas placas deben llegar triple-envueltas e irradiadas para garantizar que no contaminan las salas a controlar. Muchos laboratorios emplean ya los laminocultivos Desinfectest-MIX (una cara de aerobios y la otra de hongos por su mayor comodidad en todo tipo de superficies (planas, convexas y cóncavas).

**En fábricas de cosméticos,** no hay método oficial obligado, pero muchos laboratorios están ya empleando placas Rodac (Envirocount-Neutralizing y Envirocount-Rosa Bengala según ISO 100012) o bien Desinfectest-MIX (una cara de aerobios y la otra de hongos con ambos medios normativos). Algunas fábricas también controlan los estafilococos acumulados en sus superficies mediante Rodac de BP o de XStaph.

**En laboratorios de microbiología,** sobre todo los acreditados ISO 17025, buscan sobre todo en sus cabinas de flujo laminar, los recuentos de aerobios y de hongos mediante Rodac o laminocultivos MIX, y algunos además buscan los patógenos con los que trabajan mediante Rodac específicas. Deberían buscarlos también en las estufas de cultivos y sus alrededores, a fin de ser conscientes de la



*Laminocultivos Desinfectest-MIX con ambos medios normativos ISO 100012. Colonias muy evidentes.*

importancia de desinfectarlas rutinariamente, al ser, junto con los bidones de residuos acumulados, los focos emisores biocontaminantes más importantes que existen.

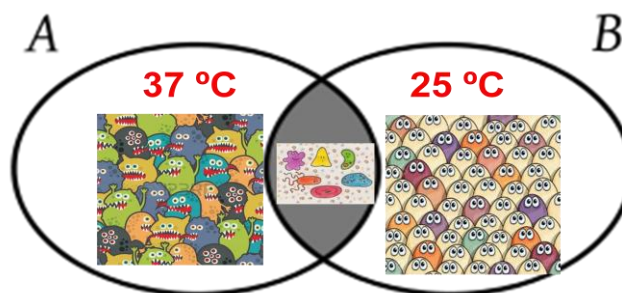
#### 4-Los métodos alternativos que mejoran la rapidez de los resultados y la robustez del análisis

Dada la escasa legislación / Normativa que hay sobre el tema, y los muy diferentes protocolos heredados en cada tipo de industria, los hemos ido indicando en el capítulo anterior. Sólo añadir los Rapidswabs-Aerobios que por viraje a rojo overnight alertan de contaminaciones bacterianas y los Rapidswabs-Hongos que por viraje a amarillo en máximo 48h, alertan de contaminaciones por hongos (levaduras y/o mohos).

#### 5-Cómo vemos el futuro en la detección de superficies

Resaltaremos hoy aquí cuatro temas que han olvidado muchas Normativas y muchas recomendaciones:

- a) **Temperaturas de incubación.** Tradicionalmente se incuban las bacterias alrededor de 35°C y los hongos alrededor de 25°C, pero en el ambiente existen dos grandes poblaciones que nos afectan: las bacterias y hongos asociados al hombre (en correlación con los patógenos), que crecen mejor alrededor de 35°C; y las bacterias y hongos saprófitos, que no afectan al ser humano pero sí al producto fabricado, como alterativos, a las temperaturas ambiente a las cuales se van a almacenar en las estanterías de los supermercados (en general alrededor de 25°C). Buscar solo una de las dos poblaciones es el error más difundido en microbiología ambiental. Hay bacterias y hongos que crecen a ambas temperaturas, pero la mayoría solo tienen su óptimo a 25 o a 35°C, por lo que insistimos que es un grave error olvidarse de los hongos a 35°C y de las bacterias a 25°C, es decir, no duplicar las muestras e incubar cada una a una de las dos temperaturas, para obtener el recuento de bacterias y hongos asociados al hombre, por un lado y el recuento de bacterias y hongos alterativos del producto, por otro lado.
- b) **Frecuencia de los muestreos.** Aunque se deja a criterio profesional, contrasta gravemente el criterio de la industria farmacéutica, donde se emplean miles de placas Rodac o laminocultivos cada mes, con el de algunas otras industrias y hospitales, que ni siquiera hacen un muestreo al día (o en casos extremos, hacen 1-4 muestreos al año. Una muestra al día en una sola sala y con una sola Rodac o laminocultivo no son representativos de nada, dada la distribución “contagiosa” de los microorganismos en cualquier matriz, incluidas las superficies: Podemos



obtener recuentos “0” y creer que todo está bien cuando a pocos centímetros hay incontables. ¿Y que pasa mañana, si sólo muestreamos 1 vez por semana? Lo primero que les va a pedir un juez en caso de problemas, es la justificación del número de muestreos que realizan al año. Por ello muchos laboratorios siguen el criterio de hacer a diario el número de muestras = a la raíz cuadrada de la superficie de la sala (ej: una sala de 10 x 10 m = 100 m<sup>2</sup>, su  $\sqrt{100}$ =10 muestras) y otros prefieren seguir el criterio de aplicar, independientemente de la superficie de la sala, 5 muestras en X (una muestra en cada esquina de la sala –o de la cabina de flujo laminar- y otra en el centro), añadiendo tomas en los puntos críticos (puertas de entrada y salida, salidas de aire acondicionado...)

c) **Tamaño de las muestras.** El tamaño de 100 cm<sup>2</sup> tan empleado antaño (y que se sigue empleando en el método de rascado), ha dado paso, a causa de los formatos de los medios de cultivo ideados para contacto de superficies a 25 cm<sup>2</sup> (Rodac) y a 10 cm<sup>2</sup> (laminocultivos). Como vimos en el punto anterior, tomar 10 laminocultivos por la cara de aerobios equivale a los 100 cm<sup>2</sup> del método de rascado, lo cual ya es representativo, más incluso, dado que se toman en 10 puntos diferentes.

d) **Medidas correctivas.** Cuando se encuentran valores superiores a los indicados (o incluso mayores a los habituales) se requiere de una medida correctiva que elimine el acúmulo de microorganismos y además compruebe después la eficacia. Limpiar físicamente, desinfectar químicamente, pero sobre todo rotar desinfectantes, es la mejor medida correctiva que se puede tomar, para evitar que las poblaciones microbianas de nuestras salas muten y se acaben haciendo resistentes a los desinfectantes habituales. El caso extremo son las Pseudomonas y Burkholderia, cuyo inmenso genoma (nada de “genes basura”) les permite no solo crecer en presencia de algunos desinfectantes, sino literalmente comérselos: si no rotamos de rutina, les estamos dando alimento en vez de eliminarlos. La desinfección de superficies por vía aérea ya no necesita aparato alguno: El Airesano es un spray de descarga total autorizado por el Ministerio de Sanidad para uso doméstico (no se necesita carnet profesional para emplearlo), por lo que puede emplearlo con seguridad y fiabilidad cualquier industria o laboratorio (sobre todo en los focos emisores nº 1 y 2: laboratorio de microbiología y aires acondicionados).

