



**Preparación del material en el laboratorio: Esterilización**

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL



## INDICE

Objetivos	2
Esterilización	3
Modo de acción de los agentes antibacterianos	3
Métodos de esterilización	4
Desinfectantes usados en el laboratorio de microbiología	5
Acondicionamiento previo a la esterilización	6
Esterilización por métodos físicos	7
Calor seco	7
Vapor Saturado a presión	9
Autoclave de Chamberland	11
Funcionamiento	12
Radiación	13
Filtración	14
Esterilización por métodos químicos	15
Control de esterilización	16
Testigo físico	16
Testigo químico	17
Testigo biológico	18
Control de esterilidad	19
ACTIVIDADES PRÁCTICAS	21

### Objetivos

- Conocer los distintos métodos usados en esterilización en el laboratorio de microbiología ambiental, los fundamentos del control de esterilización y de esterilidad.
- Conocer las metodologías relacionadas con la esterilización: uso de desinfectantes y antisépticos.

## *Introducción*

Las bacterias están en todas partes, en el laboratorio nos interesa poder cultivar y estudiar bacterias que provengan o estén presentes en nuestras matrices ambientales, agua, suelo, sedimento, barros etc., no las que estén con nosotros o en nuestro laboratorio. Por esto, es importante tener el material con el que vamos a trabajar en las condiciones adecuadas. Para esto, es importante eliminar todas las bacterias que nos “contaminan”, a las que nos interesa estudiar, usando técnicas de esterilización.

### **Esterilización:**

Es el conjunto de operaciones destinadas a eliminar todas las formas viables de microorganismos, contenidos en un objeto o sustancia.

A los fines del laboratorio de microbiología, la esterilización se efectúa para poder estudiar, conservar y transportar cultivos de gérmenes puros, lo que no podría hacerse sin previa esterilización del material y los medios de cultivo, pues sabemos que todos los ambientes están poblados de gérmenes.

## *Modo de acción de los agentes antibacterianos*

Es importante tener idea de cómo se **destruye o se inhibe** el desarrollo de los microorganismos. El conocimiento del modo de acción de un agente determinado, permite predecir las condiciones en que será más eficaz, así como su espectro antimicrobiano.

Los posibles puntos de ataque son:

- ✓ **Lesiones de la pared celular:** ej. Bacterias Gram (+) atacadas por acción de la lisozima.
- ✓ **Alteración de la permeabilidad de la membrana celular:** compuestos fenólicos, detergentes sintéticos, jabones y compuestos de amonio cuaternario.
- ✓ **Alteración de la naturaleza coloidal del protoplasma:** Las temperaturas altas coagulan las proteínas celulares. Concentraciones excesivas de alcohol desnaturalizan las proteínas; también la luz, el ácido fénico y el formol.
- ✓ **Interacción con las proteínas, enzimas y/o ácidos nucleicos bacterianos:** Ej. óxido de etileno, radiaciones.

### Factores que influyen en la destrucción de microorganismos

Los factores que influyen en la destrucción de microorganismos son:

- **Características del microorganismo.**
- **Propiedades de los agentes esterilizantes, bactericidas, biocidas, utilizados.**
- **Tiempo de acción.**

Si el agente es físico debemos considerar su intensidad; o su concentración si es químico; el tiempo durante el cual puede actuar, la temperatura y humedad. También es importante considerar el material de empaque.

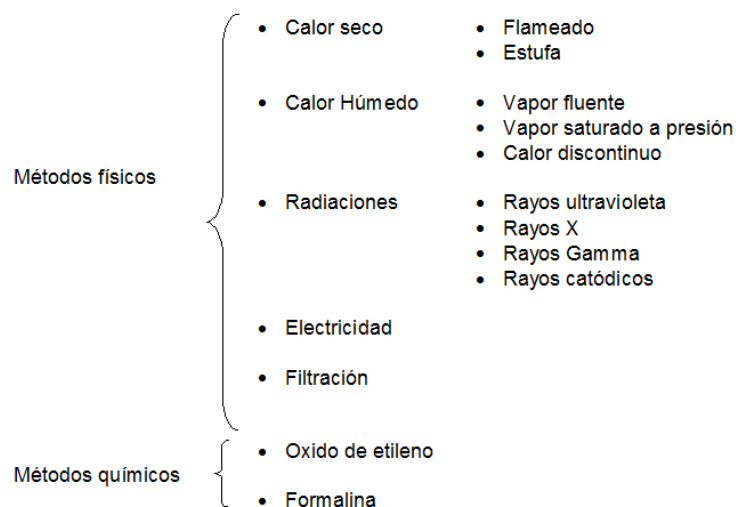
La **carga biológica** es el número de microorganismos existentes en el material a esterilizar. En general se determinan los microorganismos viables y el número de esporas.

La determinación de la carga biológica influye directamente en el Índice de seguridad de la esterilización. Se admite un valor de  $10^{-6}$ , que es la probabilidad de que una unidad del lote no sea estéril.

$$\text{Seguridad de esterilidad} = \text{carga microbiana} \cdot \text{letalidad/resistencia}$$

### Métodos de esterilización

Existen diversos métodos, físicos y químicos. La elección del método dependerá de la naturaleza y las características del material a esterilizar.



Entre los métodos físicos esta, el calor seco como el flameado que se utiliza en la esterilización del anza o de la espátula de Drigalsky; el calor húmedo, a través del uso del autoclave, que se utiliza para esterilizar la mayoría de los materiales utilizados en los práctico.

También están las radiaciones, como los rayos UV que se utilizan para esterilizar superficies, por ejemplo para las campanas que se usan en Genética bacteriana y las filtraciones para esterilizar líquidos que no se pueden esterilizar por otros métodos.

Entre los métodos químicos están los que utilizan gases como el oxido de etileno y la formalina, generalmente se usan para material termosensible.

**Tabla 1.** Métodos, fuentes y tipos de agentes esterilizantes empleados en microbiología.

Método	Fuente	Tipos
Calor seco	Acción directa de la llama.	Esterilización al rojo. Flameado. Incineración.
	Acción directa por generadores de calor.	Estufa de calor seco.
Calor húmedo	Acción de agua caliente.	Baño de maría hirviendo. Calentamiento repetido. Ebullición directa.
	Acción de vapor de agua.	Autoclave.
Radiación	Ionizantes	Rayos X. Rayos Gamma.
	Ultravioleta	UV 260nm (ADN/ARN). UV 280nm -230 nm (proteínas).
Filtración	Filtros	Filtros de diferente composición, tamaño de poro y estructura.

### *Desinfectantes usados en el laboratorio de Microbiología*

Cuando nos interesa disminuir la carga bacteriana, utilizamos desinfectantes:

- ✓ Fenol y compuestos fenólicos
- ✓ Alcoholes: etanol
- ✓ Alcohol Iodado
- ✓ Cloro y compuestos clorados : hipoclorito de sodio
- ✓ Metales pesados y sus compuestos : Merthiolate, nitrato de plata
- ✓ Oxidantes : Ozono formalina
- ✓ Reductores: formalina
- ✓ Detergentes: compuestos de amonio cuaternario

## *Acondicionamiento previo a la esterilización*

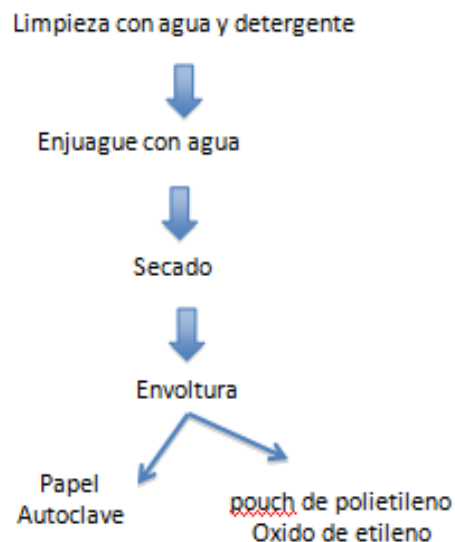
Cuando decimos material para esterilizar nos referimos a tubos, cajas de Petri, medios de cultivo, ansas, tips para micropipetas etc. Los pasos a seguir son:

1. Como primera medida, el material a esterilizar debe someterse a una minuciosa limpieza con agua y detergente, y enjuague con agua destilada para eliminar la mayor cantidad posible de gérmenes.

2. Una vez seco debe acondicionarse para preservar su condición estéril luego de procesado y hasta el momento de usarse. En la mayoría de los casos el elemento se envuelve en papel, si se trata de esterilización por vapor o en un doble pouch de polietileno para la esterilización por óxido de etileno. También se utilizan envases tipo blister que combinan polímeros plásticos y una cara de papel que ya trae incorporado el testigo químico adecuado. En hospitales es frecuente la utilización de cajas metálicas dotadas de válvulas que permiten la entrada y salida del agente esterilizante.

Cualquiera sea el material de empaque, este no debe interactuar con el contenido ni interferir con el proceso de esterilización. Por ejemplo, en la eliminación del aire de los paquetes, penetración y/o desorción del agente esterilizante o sus residuos.

En caso de utilizar testigos químicos, se colocarán en un lugar bien visible de la carga, de preferencia junto con la fecha de esterilización y otros datos pertinentes que identifiquen el ciclo de esterilización.



## *Esterilización por métodos físicos*

Los microorganismos como los demás seres vivos, son susceptibles a los cambios en las condiciones físicas del medio. Aunque pueden crecer en condiciones muy diversas, existen limitaciones a los cambios que una determinada especie puede tolerar. Las desviaciones extremas de las condiciones físicas favorables para los microorganismos, se traducen en la inhibición o la destrucción de los mismos.

### **1. CALOR**

#### **Calor seco:**

Este método se recomienda cuando no se quiere que el vapor o presión tenga contacto completo y directo con el material a esterilizar. Podemos esterilizar aquellos materiales de laboratorio que no se deterioran por acción de las altas temperaturas a que son sometidos, temperaturas a las cuales es necesario llegar para asegurar una perfecta esterilización debido al escaso poder penetrante del calor seco, que mata a las bacterias por oxidación, previa deshidratación, pudiendo llegar a una ligera carbonización. La temperatura de trabajo debe ser de 160°C y el tiempo depende del volumen del material (por lo menos 2 horas).

El material debe acondicionarse convenientemente. La temperatura a que se somete no debe pasar los 180°C, pues a esa temperatura comienzan a carbonizarse las cubiertas de papel y tapones de algodón. De todas maneras, un ligero oscurecimiento de esos complementos nos indica que se ha llegado a la temperatura efectiva de esterilización.

#### ***Ejemplo: Flameado - Utilización del mechero.***

Consiste en exponer el material a esterilizar directamente sobre la llama del mechero. Se aplica a aquellos materiales que no sufren deterioro por el tratamiento, que llega a calentar hasta el rojo (ansas, agujas, ganchos). Aquí la esterilización se logra por carbonización del protoplasma bacteriano.



#### **Calor húmedo:**

Es el más usado de los métodos de esterilización debido a la acción mucho más penetrante del calor húmedo lo que facilita la coagulación de las proteínas bacterianas, coagulación que está en relación directa con el grado de hidratación.

Cabe recordar que las proteínas del huevo coagulan a 56°C si se elimina el 50% del agua; la coagulación se produce a 76°C con 25% de agua y a 145°C si sólo tienen una humedad del 6%. Por lo tanto, se considera que cuanto menor es la cantidad de agua

libre en una célula bacteriana, mayor es la resistencia al calor. Este es el caso de las esporas, que prácticamente no tienen agua libre.

Otras ventajas incluyen el bajo costo y la ausencia de residuos tóxicos. Entre las desventajas podemos mencionar el largo tiempo de proceso y que no es aplicable a materiales termosensibles.

### *Leyes generales de la destrucción de los microorganismos por el calor:*

#### **Primera ley:**

Para una temperatura dada el número de gérmenes o esporas supervivientes al tratamiento térmico decrece en forma exponencial en función del tiempo de aplicación del tratamiento.

Manteniendo la temperatura constante, a medida que avanza el tiempo de tratamiento, la destrucción es logarítmica:

$$N = N_0 \cdot 10^{-t/D}$$

**t** = tiempo de esterilización en minutos

**D** = Tiempo necesario para que la concentración de microorganismos se reduzca en un logaritmo. Para soluciones acuosas diluidas el valor D a 121°C es de fracciones de segundo para los microorganismos y de 0,05 a 0,5 minutos para sus formas esporuladas.

**N** = Concentración de microorganismos.

#### **Segunda ley:**

Para una misma reducción de una población microbiana dada, la duración del tratamiento térmico decrece en forma exponencial en función de la elevación de la temperatura.

$$t = D \cdot \log N_0 / N_f$$

### **Calor discontinuo o tindalización:**

Se utiliza para conservar ciertos alimentos o esterilizar medios de cultivo que no pueden sufrir la acción de altas temperaturas (medios con azúcar, suero sanguíneo, etc.).

Consiste en someter el material a esterilizar a calentamientos durante un tiempo determinado varios días, seguidos de períodos de reposo o incubación, al cabo de los cuales se considera que el material está estéril.



Esto se basa en que en presencia de formas vegetativas y esporuladas, las primeras mueren en el primer calentamiento, mientras que en el proceso de reposo las formas esporuladas pasan a vegetativas y son eliminadas en el segundo calentamiento, los posteriores calentamientos sirven para completar el proceso.

El tiempo de calentamiento y el número de los mismos varía según la temperatura a la que se trabaje, en forma general se puede esquematizar de la siguiente forma:

Temperatura	Tiempo	N° de Calentamientos
90 - 100°C	30 min.	3
70 - 80°C	60 min.	3
60 - 70°C	60 min.	5
50 - 60°C	60 min.	8

Es cómodo para efectuar esta técnica en un baño María de nivel constante provisto de termorregulador. A 100°C se puede utilizar el autoclave de Chamberland.

Es un método largo, engorroso, inclusive no es seguro por lo que se debe usar en casos extremos cuando no se puede aplicar otro, y se deben hacer pruebas de esterilidad.

### **Vapor sobrecalentado:**

Cuando la temperatura del vapor es superior a la que corresponde por la presión que soporta, se comporta como un gas.

Se obtiene haciendo pasar el vapor producido por una caldera a través de tuberías donde sufre un nuevo calentamiento. A pesar de ser más elevada la temperatura su presión disminuye al aumentar el volumen por lo que es escaso su poder penetrante.

### **Vapor saturado a presión:**

El agente esterilizante es el vapor a presión exento de aire y otros gases, que hidrata las bacterias y favorece su coagulación.

Este procedimiento se consigue por medio de aparatos denominados autoclaves.

Los primeros autoclaves requerían de ciclos muy largos y tediosos, pero actualmente se han introducido muchas innovaciones que hacen de este método de esterilización sea el más apropiado para gran diversidad de materiales y contenedores. Por ej. el enfriamiento por ducha para cargas embotelladas, el esterilizador de alta presión para cargas porosas (textiles) y los esterilizadores flash de alta temperatura en la industria alimenticia, autoclaves de presión compensada para contenedores semirrígidos.

Hoy en día, todos los autoclaves están automatizados y registran gráficamente las variables de Temperatura vs. Tiempo de cada ciclo.

De acuerdo al tipo de material y su contenedor o envoltura, el ciclo a aplicar será diferente pero constará siempre de las siguientes fases:

**1. Fase de calentamiento:** el tiempo de subida de la temperatura depende de la masa y el volumen de la carga, su disposición y del suministro de vapor. Previamente se debe eliminar totalmente el aire y otros gases no condensables. Si existe aire dentro de la cámara aunque transcurra el tiempo necesario nunca se llegará a la temperatura prefijada.

**2. Fase de exposición:** es la fase de muerte de los microorganismos, por lo tanto es función de la carga bacteriana inicial, la resistencia de los microorganismos y el grado de reducción de la población inicial que se pretende alcanzar. Este tiempo se puede calcular con las leyes de termo destrucción, y comienza en el momento en que se alcanza la temperatura de esterilización dentro de la cámara. Además se agrega un tiempo de seguridad o de sobre exposición que es igual a la mitad del tiempo empleado para el calentamiento más 2 minutos (Normas DIN).

**3. Fase de enfriamiento y secado:** en esta etapa se utiliza vacío para extraer el vapor de los paquetes. La temperatura deja de ser un parámetro crítico pero si el material no fue convenientemente envuelto surgen problemas con los envoltorios. Es importante recordar que solo pueden usarse papeles con una porosidad adecuada. Las fibras de poliamida están contraindicadas por esta razón.

El ciclo de esterilización más empleado en la industria farmacéutica, laboratorios y hospitales es el **vapor saturado a una temperatura de 121°C durante no menos de 15 minutos de exposición**. Esta temperatura se logra por vapor de agua a **una atmósfera** de sobre presión con respecto a la presión atmosférica.

En el uso del autoclave es muy importante permitir que el vapor de agua desplace totalmente el aire de la cámara de esterilización antes que la temperatura y la presión aumenten (**Purgado**). De no ser así, la presión resultante será la suma de las presiones parciales del aire y del vapor de agua. Teniendo en cuenta que para una misma presión la temperatura del aire es mucho menor que la del vapor de agua, la temperatura resultante será tanto menor cuanto mayor proporción de aire contenga la cámara.

**Correspondencia entre temperatura y presión**

Veremos ahora la correspondencia entre la presión y la temperatura del vapor en un aparato perfectamente purgado, teniendo en cuenta que el manómetro nos indica "0" cuando la temperatura del vapor de agua es de 100°C, o sea cuando se equilibra con la presión atmosférica, es así que el manómetro nos indica atmósferas de sobre presión con respecto a la atmosférica.

Temperatura	Tiempo
0 atmósfera	100 °C
3/4 atm	115 °C
1 atm	121 °C
1 1/2 atm	127 °C
1 3/4 atm	130 °C
2 atm	135 °C

**Diferencias que se producen por mal purgado**

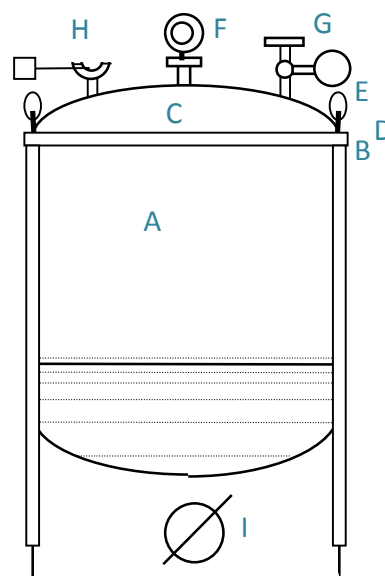
A continuación señalaremos en un gráfico los errores que se cometen al no purgar bien el aparato, veremos como para determinada presión difieren las temperaturas con los distintos grados de evacuación del aire.

Aparato Purgado	T°	Aparato a medio purgar	Aparato sin purgar
0,5 atmósfera	110 °C	93 °C	70 °C
1 atm	120 °C	105 °C	90 °C
1,5 atm	127° C	120° C	108° C

T° en grados Celsius.

**Autoclave de Chamberland**

Este método de esterilización lo podemos efectuar en un autoclave como el de Chamberland que consta de: una caldera cilíndrica (A), terminada en su parte superior en un reborde aplanado (B), una tapa del mismo material (C), que ajusta perfectamente en el reborde de la caldera dando un cierre hermético mediante una junta de caucho o amianto (D). La tapa se fija mediante tornillos (E) para permitir presiones elevadas en su interior. Sobre la tapa hay un manómetro (F) que indica la presión interior, una espita (G) para el purgado del autoclave y una válvula de seguridad (H). La



calefacción de la caldera (I) puede ser a gas o eléctrica.

## **Funcionamiento**

- 1.** Colocar en el interior de la caldera agua hasta una altura aproximada de 5 cm. o hasta la rejilla.
- 2.** Poner el material a esterilizar, previamente acondicionado de manera que no toque el agua.
- 3.** Cerrar la tapa y ajustar los tornillos en cruz.
- 4.** Abrir la espita.
- 5.** Encender el mechero.
- 6.** Cuando por la espita aparezca un chorro continuo de vapor, la cámara estará purgada y se cierra la espita.
- 7.** Controlar el manómetro. Cuando la presión llega al valor elegido (generalmente 1 atmósfera), se comienza a controlar el tiempo (generalmente 15'), cuidando que la presión no se modifique, regulando la cantidad de gas.
- 8.** Transcurrido el tiempo fijado, se apaga el gas, se deja enfriar, SE ABRE LA ESPITA, y recién luego se puede abrir el autoclave.

## **Controles del ciclo**

Los parámetros críticos que deben controlarse son la **temperatura, presión y el tiempo de exposición.**

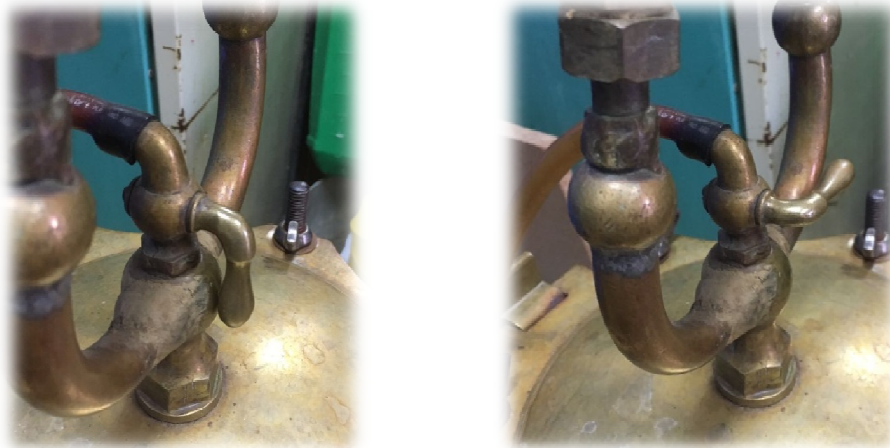
La temperatura se mide con una sonda situada en el punto más frío de la cámara. El valor elegido habitualmente es 121°C y se admite una variación de +/-1°C.

El tiempo de exposición también debe registrarse y documentarse para cada ciclo. Siempre que la temperatura o el tiempo de exposición sean menores a lo establecido, la carga debe reesterilizarse.

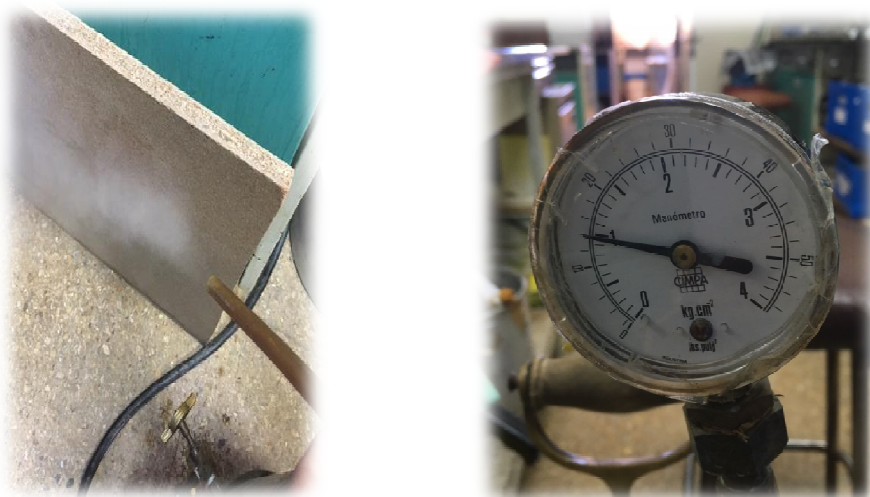
Las variaciones de presión afectan la integridad del cierre o del contenedor.

Todos los instrumentos de registro deben calibrarse periódicamente

**Imagen 1 y 2.** Espita abierta (izq.), espita cerrada (der.)



**Imagen 3 y 4.** Vapor saliendo en etapa de purgado (izq.), Manómetro indicando la presión alcanzada, 1 atm. (der.)



## **1. RADIACIONES**

Es el fenómeno de emisión y propagación de la energía en el espacio o a través de un medio material. Las radiaciones de acción nociva sobre los microorganismos son los rayos ultravioletas, los rayos x, los rayos gamma y los rayos catódicos.

### **Rayos ultravioletas:**

La porción ultravioleta del espectro incluye todas las radiaciones desde 150 a 3900 Å. Se usan lámparas germicidas que emiten concentraciones elevadas de luz ultravioleta en su región más efectiva, 2600 a 2700 Å. Se usan para reducir la

población microbiana en quirófanos, cuartos de llenado aséptico en la industria farmacéutica, y en la industria de alimentos para tratar superficies contaminadas. Una consideración práctica es que la luz ultravioleta tiene muy poca capacidad para penetrar la materia. Aún una pequeña capa de filtro de vidrio quita gran cantidad de luz. Así, solo los microorganismos que se encuentran en la superficie de los objetos que se exponen directamente a la acción de la luz UV., son susceptibles de ser destruidos. Es un método utilizado en las campanas de microbiología.

**Modo de acción** → La luz U.V. es absorbida por muchos materiales celulares, pero más por los ácidos nucleicos, a los cuales causa gran daño. Producen dímeros de pirimidina y a menos que sean reparados, se inhibe la replicación del DNA y puede haber mutaciones.

## 2. FILTRACIÓN

En algunas ocasiones es necesario esterilizar soluciones líquidas que no pueden ser calentadas, como medios de cultivo líquidos, soluciones de sustancias sensibles al calor como azúcares, aminoácidos, antibióticos, sales y similares, sin someterlos a temperaturas de esterilización. Para esto se utiliza la técnica de filtración, que consiste en pasar las soluciones por filtros con poros de diámetros a escala de micras que retienen por tamaño a los microorganismos. Este método permite obtener productos solubles como toxinas, antígenos, antibióticos, etc. La Tabla resume algunos tipos de filtros utilizados comúnmente.

Tipo de filtro	Composición
<b>Filtros de vidrio</b>	Constituidos por filtros de vidrio en un recipiente metálico conectado a un Erlenmeyer
<b>Filtros de membrana</b>	Constituidos de nitrato de celulosa y polietrafluoretileno. Los poros son 8 a 0,01 micras. Generalmente se usan los de 22 $\mu$ .

### Condiciones que deben reunir los filtros:

- No alterar la composición del líquido.
- Tener porosidad uniforme sin determinar pérdida en el flujo líquido.
- Retener gérmenes con seguridad.
- Soportar las diferencias de presión necesarias para obtener un caudal eficaz y no sufrir alteraciones estructurales por acción de las soluciones.
- Fácil de limpiar o de preferencia descartable.

- Soportar esterilización por vapor a 121°C.
- No ceder partículas extrañas al filtrado.

## *Control del proceso*

Cuando se utiliza un sistema de filtración, se pueden usar microorganismos como indicadores. Así, para filtros de 0,2  $\mu$  se utilizan suspensiones de ***Pseudomona diminuta***, no debiéndose encontrar el filtrado contaminado con este microorganismo. Es fundamental también, controlar la integridad del sistema antes y después de su uso. Esto se puede realizar controlando el flujo de aire en función de la presión de aire a que se lo somete, una vez humedecido con un solvente acuoso o alcohólico. A bajas presiones el flujo de aire se mantiene prácticamente constante aunque se aumente la presión, y a mayores presiones el flujo aumenta rápidamente. Este test es utilizado en forma simplificada (y mucho menos precisa) por el método de la burbuja, en el que al hacer presión no debe aparecer una fuente de burbujas, sino que estas deben formarse homogéneamente en toda la superficie de la membrana o bujía. Este pequeño pasaje de aire se produce por la difusión del aire a través del sistema líquido.

## Esterilización por Métodos Químicos

Generalmente, se utilizan **agentes alquilantes** como óxido de etileno, óxido de propileno, formaldehído, glutaraldehído. Estos reemplazan los átomos de hidrógeno lábiles de grupos amino o hidróxido, por ejemplo, formando uniones de alta energía que llevan a la pérdida de las actividades biológicas de las moléculas con las que se combina y a la pérdida irreversible de la viabilidad.

## *Condiciones que debe reunir un gas esterilizante:*

- Efectividad sobre la mayor cantidad de microorganismos.
- No alterar el material que se quiere tratar.
- Facilidad de difusión, por lo tanto elevado poder de penetración en el material y rápida eliminación.
- No ser tóxico ni irritante.
- No inflamable ni explosivo.
- Fácil de manipular y almacenar.
- Económico.



El material que se compra como las placas de Petri, jeringas y todo el material **termosensible** se esteriliza en la industria farmacéutica con **óxido de etileno**. Es un gas que necesita de equipamiento especial.

En el laboratorio de microbiología ambiental para la reutilización del material termosensible con las Placas de Petri se utiliza **formalina** en granallas. La formalina (H C HO) vaporiza a temperatura ambiente (temperatura recomendada: 26°C), liberando formaldehído y agua.

El formaldehído gas sólo actúa en presencia de por lo menos 80% de humedad.

Se coloca el material en un recipiente hermético, que contiene en un estuche formalina y en otro algodón embebido en agua, permitiendo que se produzca la reacción explicada.

Se deja el material 24-48 hs. y luego se airea antes de utilizar.

## CONTROLES DE ESTERILIZACION

### Control de esterilización:

A fin de asegurar que una esterilización se ha efectuado correctamente se pueden emplear distintos procedimientos que agruparemos con el nombre de testigos de esterilización y que se pueden dividir en tres grandes grupos:

#### *1.1. Testigos físicos:*

**Termocupla:** Después de la prueba biológica directa, la termocupla es el indicador más confiable para esterilización por calor. Este es un método directo y simple que consiste en colocar sondas en puntos significativos en la carga a ser procesada, registrando la temperatura. Se trata de dos metales que están en contacto, que por una diferencia de temperatura generan una fuerza electromotriz (FEM), pudiéndose determinar la temperatura en función de la intensidad de corriente generada.

Si se conecta una aguja inscriptora sobre una cinta que gire 360° en 24 hs., se consigue tener un termógrafo, que indica la temperatura alcanzada y por cuanto tiempo fue mantenida, quedando un testigo de todas las operaciones realizadas en el día.

Actualmente el registro gráfico la temperatura en función del tiempo es el método más utilizado para monitorear la esterilización por vapor.



Los controles de presión en la cámara se realizan como parámetros complementarios o de seguridad. Por ejemplo, la esterilización por vapor existe una correspondencia entre la temperatura alcanzada y la presión en la cámara, siempre que se haya purgado correctamente el autoclave.

En la esterilización por óxido de etileno se trabaja a presión negativa porque debemos asegurarnos la ausencia de aire, antes de introducir el OE.

El valor de estos controles se limita a decirnos si se cumplieron las variables preestablecidas por el operador, o sea que indica sólo fallas del aparato.

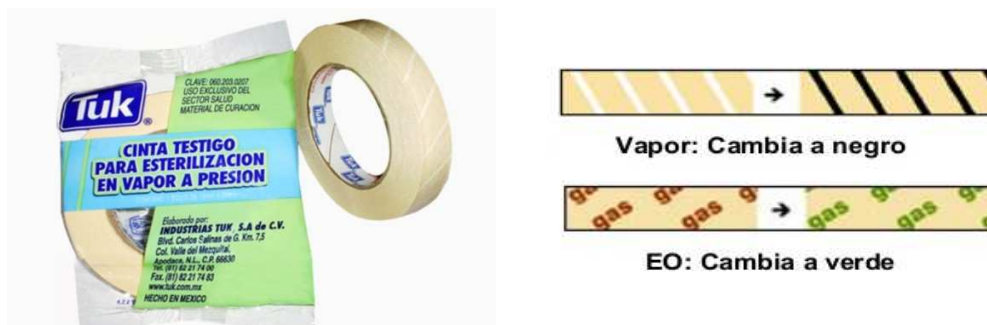
## ***1.2- Testigos químicos:***

Para esterilizaciones por la acción del vapor pueden ser utilizadas sustancias químicas de punto de fusión conocido y bien definido. La sustancia seleccionada debe fundir a la temperatura requerida o justo por debajo de ella. Para tratamientos a 121°C se pueden usar anhídrido succínico (PF = 120°C) o ácido benzóico (PF = 121°C) y para procesos a 115°C son apropiados el azufre (PF = 115°C) o la acetanilida (PF = 116°C). Para facilitar la interpretación, estas sustancias están mezcladas con un colorante y al fundir éste difunde libremente.

Para controlar esterilizaciones por óxido de etileno (OE), existe un dispositivo con una solución de  $Cl_2Mg$  en ClH con un indicador sellado en sachet de polietileno fino. Cuando el OE difunde a través del polietileno se produce hidrólisis, y si difunde gas suficiente, todo el ácido es neutralizado. La difusión y velocidad de reacción son paralelas con las variaciones correspondientes en la velocidad de esterilización.

También hay cintas adhesivas o papeles impregnados con tintas sensibles a los 4 parámetros críticos (humedad, concentración de OE, temperatura y tiempo), que están incorporadas en los papeles o films especiales para la esterilización. La presencia de estos factores sobre la tinta produce un viraje de color que evidencia si un paquete fue sometido al ciclo de esterilización, pero no nos informa acerca de la condición de esterilidad del producto.

Imagen 5. Cinta testigo para esterilización



La principal ventaja de estos indicadores es el bajo costo y la rapidez con que se obtiene el resultado.

### 1.3- Testigos biológicos:

Son más eficaces y más reales que los testigos físicos y químicos porque responden al efecto combinado todos los factores conocidos o desconocidos que influyen en la muerte bacteriana. Tienen la ventaja de no estar conectados al autoclave.

Consisten en someter a la acción del esterilizador, cultivos de bacilos esporulados. (*B. subtilis*; *B. mesentericus*; *B. stearothermophilus*), a los que luego del proceso se controla su viabilidad ya sea por cultivo, o por coloraciones que nos proporcionan un rápido resultado.

#### Control de viabilidad por coloración:

1. Se efectúa un extendido a la suspensión de microorganismos esporulados.
2. Se colorea durante 1 minuto con la siguiente mezcla.

Azul de metileno de Loeffler	100 cc.
Fucsina fenicada de Ziehl.	8 cc.
Agua destilada	100 cc

<u>Interpretación</u>
Bacilos vivos: <b>AZUL</b>
Bacilos Muertos: <b>ROJO</b>
Esporas vivas: <b>INCOLORAS</b>
Esporas muertas: <b>AZUL</b>

#### Control de viabilidad por cultivo:

Lógicamente se utilizan bacilos esporulados por ser más resistentes a la temperatura y debemos colocarlos en aquellos lugares donde sea más difícil la penetración del calor.

Una variante de este método consiste en preparar hilos embebidos en cultivos de bacterias esporuladas en medio líquido, los que luego son desecados en ambientes estériles y colocados en tubos de ensayo o recipientes adecuados con o sin medio de cultivo.

**Imagen 6.** Testigos biológicos comerciales



Existen varios modos de interpretación de los indicadores biológicos:

1. **Método por reducción de recuento de microorganismos viables:** se cuenta el número de microorganismos supervivientes después del proceso de esterilización. Es poco práctico para el control de rutina pero de gran valor cuando se quieren establecer los parámetros para un ciclo en particular.

2. **Método de la muerte total:** las unidades que se han contaminado con las esporas del microorganismo indicador deben tener cultivos negativos bajo las condiciones prescritas del ciclo. La falta de crecimiento indica que se han satisfecho todas las variables críticas del ciclo.

## **CONTROL DE ESTERILIDAD**

En un ciclo de esterilización con una seguridad de  $10^{-6}$ , se admite que como máximo una unidad entre un millón pueda ser no estéril. Es obvio que si dichas unidades existieran es muy difícil detectarlas por un muestreo del lote. Por este motivo, sin negar el valor de esta determinación, se ve que no es apta para el control rutinario de la esterilización.

Un control de esterilidad, consiste en tomar muestras representativas de los objetos esterilizados y realizar cultivos con el fin de asegurar la no presencia de microorganismos.

Este ensayo está normalizado en la Farmacopea Nacional Argentina y muchas otras Farmacopeas. Los medios de cultivo utilizados son caldo tioglicolato y caldo de caseína-soja. También están definidos los medios de dilución y enjuague A y K, cuando se debe ensayar la esterilidad de un equipo íntegro.

Se puede realizar por diferentes técnicas de acuerdo a las características del objeto:

1. **Transferencia directa:** Cuando el objeto, cuyo tamaño y forma permite la inmersión completa en no más de 1000 ml de medio, se coloca asépticamente el objeto en cuestión en el medio de cultivo. Se incuban de acuerdo a lo establecido para cada medio y se buscan los indicadores de desarrollo bacteriano en el medio.

Si se trata de una tabuladora se hace pasar el medio de cultivo por el interior, se recoge y se incuban, por lo menos 100 ml de cada medio, obtenidos de un lote de muestreo representativo del total.

2. **Filtración por membrana:** Debe elegirse esta opción siempre que el material lo admita. Este ensayo utiliza los líquidos de dilución A y/o K, descriptos en la FNA que se usan para enjuagar el objeto en cuestión y luego se hacen pasar por el equipo de filtración. Se retira la membrana filtrante y manteniendo la asepsia se corta la membrana y se incuba en los medios de tioglicolato y caseína soja.

Todos los medios de cultivo utilizados deben ensayarse con cepas de la ATCC como control positivo, y a la vez se debe ensayar que no están contaminados al inicio del ensayo. Si se trata de un medio de cultivo rico fraccionado en tubos, se toman los de la zona central del recipiente que los contiene, donde se alcanza más difícilmente la temperatura, y luego se incuban directamente.

La interpretación de los resultados es en dos etapas. Si en la primera etapa no se observa desarrollo microbiano, el objeto ensayado cumple con el test de esterilidad. Pero si hay desarrollo microbiano y en la revisión del procedimiento se detectan técnicas erróneas de asepsia se invalida la prueba y se repite sobre un segundo lote.

En la segunda etapa el número de muestras seleccionadas debe ser el doble de las utilizadas en la primera etapa. Si no se encuentra desarrollo microbiano el objeto cumple con el test de esterilidad y la prueba concluye allí. Si hay desarrollo y se verifica el procedimiento correcto, el objeto no cumple con el test de esterilidad.

### *ACTIVIDADES PRÁCTICAS*

- Esterilización y decontaminación con hipoclorito de sodio.
  - Acondicionamiento del material y posterior esterilización por Vapor saturado a presión en autoclave de Chamberland.
  - Llevar a cabo un proceso completo de Esterilización por autoclave.
  - Control de esterilización con testigos químicos (ácido benzoico y rojo fenol) y testigos biológicos (suspensión de *Bacillus steatermophilus*).
-