

APUNTES DE LABORATORIO

Britania

britanialab.com

VOLUMEN V

**CONTROL DE ESTERILIZACIÓN: INDICADORES BIOLÓGICOS,
LA OPCIÓN MAS CONVENIENTE**

info@britanialab.com

" Agradecemos al Lic. Adrián Rovetto y a su equipo de trabajo (TERRAGENE), por la colaboración en este Apunte de Laboratorio."



INTRO

Las limitaciones presupuestarias y de gestión de inventario dentro de industrias como salud, farmacéutica, cosmética, entre otras; junto con la demanda cada vez mayor para optimizar la eficiencia en la esterilización de instrumentales, se han traducido en una búsqueda continua para identificar las mejores y más útiles herramientas de monitoreo que permitan al usuario tomar decisiones conscientes y fundamentadas sobre la eficacia de un determinado proceso de esterilización.

Es bien entendido que cada uno de los indicadores de control actualmente disponibles, tiene un papel que desempeñar y uno no reemplaza a otro.

Sin embargo, los indicadores biológicos (IB) se consideran el producto de excelencia para control de procesos de esterilización, dado que son el único método que permite medir directamente la letalidad producida por un ciclo de esterilización mediante el desafío de microorganismos de alta resistencia conocidos como esporas.

Los procedimientos de esterilización en hospitales, laboratorios y en industrias como la alimenticia y farmacéutica han alcanzado estándares de calidad muy elevados. Se denomina **esterilización** al proceso mediante el cual se elimina toda forma de vida de un determinado objeto. Esto puede llevarse a cabo mediante diversos procesos físicos o químicos.

Los métodos **físicos** más comunes implican la utilización de elevada temperatura como agente esterilizante. El **vapor saturado** es el método de esterilización por excelencia y la opción de referencia para esterilizar el material que tolera las altas temperaturas; es un sistema rápido, de fácil control, de bajo coste e inocuo, por tanto no supone ningún riesgo de exposición tóxica del personal ni de los pacientes.

Para materiales termosensibles, se recurre a la esterilización a baja temperatura por agentes químicos capaces de eliminar a los microorganismos. El **óxido de etileno (OE)**, a pesar de su toxicidad, su potencial explosivo y su absorción por el material plástico, es también utilizado por su alta capacidad germicida y de penetración. Otra alternativa es la esterilización por vapor a baja temperatura con **formaldehído**; éste método admite el empleo de embalajes convencionales y permite esterilizar prácticamente todo tipo de material.

Otro proceso de esterilización a baja temperatura es el que emplea el plasma gas con **peróxido de hidrógeno**; es un método de

esterilización rápido, no tóxico pero sus costos son elevados; además, no permite la esterilización de celulosa o derivados por lo que requiere envoltorios específicos. Para materiales que pueden ser sumergidos, el sistema de esterilización a baja temperatura con **ácido peracético** líquido es otra opción factible.



Control de Procesos de Esterilización

Cualquiera sea el procedimiento de esterilización seleccionado, éste debe ser diseñado, validado y llevado a cabo de modo de asegurar que es capaz de eliminar por completo la carga microbiana garantizando que el producto es seguro para su posterior utilización.

Los métodos de control de esterilización universalmente aceptados pueden dividirse en dos, los indicadores químicos (IQ) y los indicadores biológicos (IB). Cada uno de ellos cumple un rol específico y tiene sus propias ventajas y limitaciones.

El conocimiento minucioso de las características propias de cada sistema, resulta fundamental a fin de efectuar un uso adecuado de los mismos.

Los indicadores químicos están diseñados para responder a las variables físicas y químicas que deben alcanzarse dentro del equipo durante el proceso de esterilización.

Los IQs poseen distintos formatos y composición química y se clasifican en seis clases de acuerdo con la norma EN ISO 11140-1.

Algunos indicadores únicamente proveen información logística, señalando si un dado objeto fue sometido o no a un proceso de esterilización. Otros, brindan información sobre la calidad del proceso de esterilización al que fue sometido el instrumento.

Ciertos IQs son capaces de monitorear una única variable, mientras que otros responden a dos, tres o más variables proporcionando un método de control más eficaz que aquellos que responden a una única variable.

Cada clase de IQ varía en su comportamiento y sus condiciones de uso, por lo cual resulta de suma importancia que el personal encargado de utilizarlos conozca qué tipo de información brinda el indicador en cuestión, su correcto modo de utilización y las limitaciones que el mismo posee.

La principal ventaja de los indicadores químicos es que los resultados se obtienen al finalizar el ciclo de esterilización, permitiendo detectar inmediatamente fallas en el proceso y tomar las precauciones apropiadas. El otro grupo de indicadores son los **indicadores biológicos**, los cuales, como ya se mencionó, son considerados el control de excelencia para monitoreo de procesos de esterilización.

Los IBs, consisten en preparados de esporas de microorganismos no patógenos, las cuales se exponen al agente esterilizante y a continuación se evalúa la supervivencia de los mismos. La eliminación de dichos microorganismos evidencia la eficacia del procedimiento de esterilización.

Los microorganismos utilizados en la elaboración de IBs son esporas bacterianas cuya resistencia a los agentes esterilizantes es elevada en comparación a la resistencia de los microorganismos potencialmente presentes en los objetos a esterilizar. Por este motivo, si un proceso de esterilización es suficientemente efectivo como para matar una población de esporas resistentes, también es capaz de eliminar microorganismos menos resistentes de los objetos de interés.

Como un control adicional, los IBs se fabrican con una cantidad de esporas notablemente superior a la cantidad de organismos que normalmente pueden hallarse en los objetos a esterilizar.



“Indicador químico para control de procesos de esterilización por vapor”

“Hojas de prueba Bowie-Dick para el control de la eliminación de aire en esterilizadores de vapor”

La norma **EN ISO 11138** establece requerimientos de fabricación, comportamiento y comercialización de los indicadores biológicos a fin de garantizar el adecuado desempeño de los mismos.

Para los métodos de esterilización más comunes, se han seleccionado como organismos de referencia esporas bacterianas provenientes de *Geobacillus stearothermophilus* para procesos de esterilización por vapor, formaldehído y peróxido de hidrógeno y *Bacillus atrophaeus* para calor seco y óxido de etileno.

La normativa estipula que el fabricante debe ensayar la resistencia de cada lote de indicadores biológicos y declarar los parámetros detallados a continuación:



● **Título de esporas:** cantidad de esporas viables contenidas en el indicador.

● **Valor D:** Tiempo o dosis de agente esterilizante que provoca la inactivación del 90% de las esporas presentes.

● **Tiempo de supervivencia de la población:** tiempo de exposición al agente esterilizante que da como resultado la supervivencia de todas las esporas.

● **Tiempo muerte de la población:** tiempo de exposición al agente esterilizante que da como resultado la eliminación de todas las esporas.

● **Valor Z:** es el cambio de temperatura que se requiere para modificar el valor D por un factor de 10. Este valor se requiere en IBs para esterilización por calor húmedo y seco.

Estos parámetros brindan una noción clara y concisa del comportamiento de la población de esporas contenidas en el IB.

A fin de demostrar la conformidad con los requisitos de funcionamiento especificados en la norma EN ISO 11138 y garantizar la calidad de los indicadores, los parámetros obtenidos para cada lote deben estar dentro de ciertos intervalos especificados en la misma.



EVOLUCIÓN

“Tira de esporas para el control de procesos de esterilización por vapor, óxido de etileno y calor seco”

Evolución de los indicadores biológicos

Actualmente, en establecimientos como hospitales y sanatorios es necesario que los instrumentos no descartables, que requieren ser esterilizados para su uso, estén disponibles para su reutilización en tiempos cada vez más cortos.

Por este motivo, hay una constante demanda de métodos de control de esterilización que brinden resultados concluyentes y veloces.

Originalmente, los IBs consistieron en tiras de esporas, las cuales contienen una cantidad conocida de esporas inoculadas en un material portador, generalmente de naturaleza celulósica y que luego de ser sometidas al proceso de esterilización se transfieren a un medio de cultivo adecuado mediante la técnica aséptica.

El medio de cultivo inoculado, se incuba a la temperatura de crecimiento del microorganismo

presente en la tira de esporas durante un período de tiempo determinado.

El medio de cultivo puede contener un indicador de pH, el cual cambia de colorante la presencia de bacterias metabólicamente activas.

Un cambio de color del medio señala una falla en el proceso de esterilización; sin embargo, si el proceso de esterilización fue efectivo, el medio indicador permanecerá del color original.

Este tipo de indicador, tiene algunos inconvenientes asociados; por un lado, los resultados del ensayo están disponibles entre 24 o 168 horas según el caso, además requiere que el personal encargado de esta tarea posea conocimientos básicos de técnicas microbiológicas.

Por otro lado existe una elevada

probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación cruzada del medio de cultivo durante el traspaso de la tira de esporas.

La contaminación cruzada consiste en la transferencia accidental de microorganismos, distintos a las esporas presentes en la tira, al medio de cultivo.

Luego de la incubación durante un tiempo determinado en contacto con el medio, los microorganismos contaminantes producirán un viraje de color del medio de cultivo.

Este suceso conducirá al usuario a considerar como fallido un ciclo de esterilización que fue exitoso con la consecuente pérdida de tiempo y dinero que ello implica.

Algunas de las limitaciones asociadas a las tiras de esporas se resolvieron con la aparición en el mercado de los **indicadores biológicos autocontenidos**.

Los mismos contienen un papel de filtro embebido con esporas bacterianas y un medio de cultivo específicamente diseñado en una ampolla de vidrio.

Estos componentes están alojados dentro de un tubo plástico contenedor, permeable al agente esterilizante. Luego de la exposición al agente, se rompe la ampolla de vidrio, quedando el medio de cultivo en contacto con las esporas.

A continuación, el sistema se incuba a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo durante 24 a 168 horas según el microorganismo en cuestión.

Del mismo modo que al utilizar tiras de esporas, como resultado de un ciclo de esterilización fallido se observa un viraje de color del medio. Para el usuario, esta tecnología resulta metodológicamente más sencilla de utilizar que la incubación de tiras de esporas, y se elimina la obtención de falsos positivos por fallas en la manipulación del indicador que conducen a contaminaciones cruzadas.

Con el objetivo de acortar los tiempos de lectura se diseñaron una serie de indicadores, denominados **indicadores biológicos autocontenidos rápidos colorimétricos**. El principio de funcionamiento de los mismos es similar al de los IB autocontenidos, pero difieren en su presentación. El sistema contiene un tubo con base cónica en donde se inoculan directamente la esporas bacterianas, además poseen un filtro especial que permite mantener el vidrio en la parte superior del tubo luego de la rotura de la ampolla de vidrio. Luego de la incubación a la temperatura de crecimiento del microorganismo en cuestión se lleva a cabo la lectura del resultado usando una tabla de referencia de colores.

Nuevamente, un ciclo de esterilización fallido conduce a un viraje de color del medio de cultivo. La tabla de referencia de colores facilita la detección de IBs positivos en un período de entre 6 y 8 horas agilizando notablemente la obtención de resultados.



“Indicadores biológicos autocontenidos para control de procesos de esterilización por vapor, óxido de etileno, formaldehído, vapor de peróxido de hidrógeno y calor seco”

“Indicadores biológicos autocontenidos rápidos colorimétricos para control de procesos de esterilización por vapor, formaldehído o vapor de peróxido de hidrógeno”

Recientemente surgió un tercer tipo de IB autocontenido, los **indicadores biológicos autocontenidos de lectura rápida de fluorescencia**.

Poseen una presentación similar a los indicadores biológicos autocontenidos pero estos indicadores revelan la presencia de esporas vivas mediante la detección de la actividad de enzimas asociadas a las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y *Bacillus atrophaeus*.

Tales enzimas son del tipo glucosidasas y son capaces de degradar un sustrato específico generando un compuesto fluorescente, el cual es detectado por una incubadora de lectura rápida de fluorescencia.

La detección de fluorescencia indica una falla en el ciclo de esterilización mientras que la ausencia de fluorescencia indica la inactivación de las enzimas y por lo tanto de las esporas, evidenciando que el proceso de esterilización fue eficaz.

Este sistema arroja resultados en tiempos muy cortos que oscilan entre 1 y 4 horas según el caso.

Los resultados de fluorescencia detectados luego de la incubación por 1 a 4 horas, pueden compararse con las lecturas visuales luego de 1, 2 y 7 días de incubación.

Al igual que para los IB autocontenidos colorimétricos, un fallo en el proceso de esterilización genera un cambio de color del medio de cultivo. Esta comparación permite estimar la sensibilidad del sistema de lectura rápida.

La sensibilidad del sistema se determina como la diferencia entre los indicadores positivos a los 7 días y los indicadores falsos negativos (FN) respecto de aquellos positivos a los 7 días multiplicada por 100.

A fin de ilustrar el comportamiento de este tipo de indicador, a continuación se muestra el comportamiento de tres lotes de un mismo tipo de IB autocontenido de lectura rápida de fluorescencia.

Tabla 1:

Parámetros de calidad para tres lotes de IB autocontenidos de lectura rápida de fluorescencia.

Lote	Población	D ₁₂₁	Valor Z	Tiempo de supervivencia	Tiempo de muerte
1	1.3x10 ⁶	1.7	16.5	6.9	16.8
2	1.810 ⁶	1.6	16.6	7.0	16.9
3	2.010 ⁶	1.6	16.9	6.8	16.4

Tabla 2:

IBs expuestos a ciclo de esterilización por vapor a 121º C durante distintos tiempos. Se determinó el número de ensayos positivos mediante fluorescencia de cada grupo de muestras expuesta al ciclo especificado luego de una incubación de 3 horas a la temperatura adecuada. Se determinó el número de ensayos positivos por inspección visual del cambio de color del medio luego de 7 días de incubación a la temperatura adecuada. En cada caso se informa el número de positivos sobre el número total de muestras. Se estimó el número de falsos negativos, esto es: el número de muestras que dio negativo mediante detección de fluorescencia pero mostró un resultado positivo luego de la incubación de 7 días.

Tiempo de exposición	Lote	Fluorescencia 3 hs	Cambio de color	Falsos negativos
8 minutos	1	200/200	200/200	0
	2	200/200	200/200	0
	3	200/200	200/200	0
10 minutos	1	149/200	151/200	2
	2	152/200	154/200	2
	3	187/200	185/200	1
12 minutos	1	139/200	140/200	1
	2	145/200	147/200	2
	3	158/200	156/200	0
14 minutos	1	38/200	39/200	1
	2	42/200	43/200	1
	3	49/200	49/200	0
16 minutos	1	0/200	0/200	0
	2	0/200	0/200	0
	3	0/200	0/200	0

Tabla 3:

Cálculo de sensibilidad del sistema de lectura rápida de fluorescencia luego de un ciclo de esterilización a 121º C. Sensibilidad= [(Número de positivos 7 días) - (Número de falsos negativos) x 100] / Número de positivos 7 días

Temperatura del proceso	Cantidad de muestras	Positivas a los 7 días	Fluorescencia	
			FN a las 3 hs	Sensibilidad a las 3 hs
121 °C	300	169	4	97,6%

Los datos mostrados en la tabla 3 demuestran que una cantidad ≥ 97% de las muestras que fueron positivas luego de la incubación por 7 días fueron detectadas como positivas mediante la determinación de los niveles de fluorescencia luego de 3 horas de incubación. Entonces, acorde a la sensibilidad detectada en lecturas de fluorescencia, la incubación convencional para observar cambio de color del indicador no representa una ventaja adicional.

En el año 2014 surgieron los denominados **indicadores biológicos autocontenidos de lectura super rápida de fluorescencia**. El principio de funcionamiento de los mismos es equivalente al de los IB autocontenidos de lectura rápida, pero los componentes del sistema han sido optimizados de modo tal que permiten la detección de fluorescencia en tiempos extremadamente cortos que van de los 30 minutos a 1 hora. Entonces, considerando que los IBs son capaces de medir directamente la letalidad inducida por un dado ciclo de esterilización, sumado a la posibilidad de evaluar los resultados en tiempos tan cortos, convierten a este sistema en la alternativa más poderosa del mercado al momento de decidir la liberación de los materiales para su utilización.



“Indicadores biológicos autocontenidos de lectura súper rápida de fluorescencia para control de procesos de esterilización por vapor”

Esterilización de líquidos

Al momento de esterilizar líquidos por vapor y monitorear tales procesos de esterilización, deben considerarse algunas variables asociadas a este tipo de sistemas. Dado que el líquido debe disponerse en un recipiente contenedor, el agente esterilizante no estará en contacto directo con el mismo; además dependiendo del volumen de líquido y formato del envase contenedor seleccionados, la penetración efectiva del vapor debe tenerse en consideración al momento de establecer la duración del ciclo a fin de que el mismo sea efectivo.

En vista de dichas particularidades, se han diseñado métodos de control especiales para el monitoreo de procesos industriales de esterilización de líquidos por vapor. Éste consiste en la utilización de ampollas autocontenidas con esporas, las cuales consisten en ampollas de borosilicato herméticamente sellado que contienen una población de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis* y un medio de cultivo sintético especialmente formulado. Preferentemente, las ampollas se colocan dentro del recipiente que contiene el líquido a esterilizar alternativamente, en un envase con algún líquido de características fisicoquímicas similares al del líquido a esterilizar. Luego de la exposición al agente esterilizante, las ampollas se incuban entre 24 y 48 horas a la temperatura de crecimiento del microorganismo en cuestión. Un proceso de esterilización fallido provoca un viraje del color del medio cuando las esporas germinan y crecen, mientras que ante un ciclo de esterilización exitoso no se detectan cambios de color.



“Ampollas autocontenidas con esporas y ampollas químicas para el control de esterilización de líquidos por vapor y calor seco”



“Incubadora dual para incubación de indicadores biológicos a la temperatura adecuada para el monitoreo de procesos de esterilización por vapor, óxido de etileno, formaldehído, vapor de peróxido de hidrógeno y calor seco”

INCUBADORAS

Incubadoras para indicadores biológicos y sistemas automáticos de lectura de fluorescencia

A fin de obtener resultados precisos, es fundamental que los IBs, luego de ser sometidos al proceso de esterilización, sean incubados a la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos inoculados en los mismos. En el mercado hay disponibles equipos que permiten incubar los IBs autocontenidos y ampollas autocontenidas a 37 ± 2 °C o 60 ± 2 °C según el tipo de indicador. Luego de transcurrido el tiempo indicado en cada caso, el usuario debe inspeccionar visualmente si hubo un cambio de color del medio indicador de crecimiento indicando una falla en el proceso de esterilización o si el color del medio permanece inalterado señalando que la esterilización fue exitosa. Este tipo de incubadoras ocupan un volumen pequeño por lo que

pueden ubicarse fácilmente en el sitio de procesamiento del material, además su manejo es sumamente sencillo. Las incubadoras de última generación, además de la incubación a la temperatura correspondiente, poseen un sistema de lectura rápida automática de fluorescencia. Una vez finalizado el proceso de esterilización, el usuario debe romper la ampolla de vidrio que es parte de los indicadores biológicos autocontenidos de lectura rápida y colocar los tubos en la incubadora. Inmediatamente, el equipo comienza a detectar los niveles de fluorescencia emitidos por un dado IB. Cuando la incubadora detecta niveles elevados de fluorescencia dispara una señal que indica una falla en el proceso

de esterilización. Esto permite al usuario advertir inmediatamente una condición de fallo mediante una alarma sonora y la impresión de un ticket, sin tener que inspeccionar visualmente el dispositivo. Tal como se mencionó anteriormente, los resultados se obtienen en períodos de tiempo de entre 30 minutos y 4 horas permitiendo tomar las acciones correspondientes de manera sumamente veloz.

Estas incubadoras de lectura automática poseen conexión a PC, permitiendo almacenar resultados y procesar datos y registros históricos de manera simple y flexible. Este sistema recopila información durante todo el proceso de incubación y la registra mediante un software de trazabilidad, con lo cual es posible relacionar información de los IBs con la del esterilizador y su fabricante, el operador, las características del ciclo y todos los datos relevantes del proceso de esterilización.



“Incubadora de lectura automática para la incubación de indicadores biológicos autocontenidos rápidos y súper rápidos para control de procesos de esterilización por vapor y óxido de etileno. Recopila información sobre dichos procesos y la registra mediante el software de trazabilidad.”

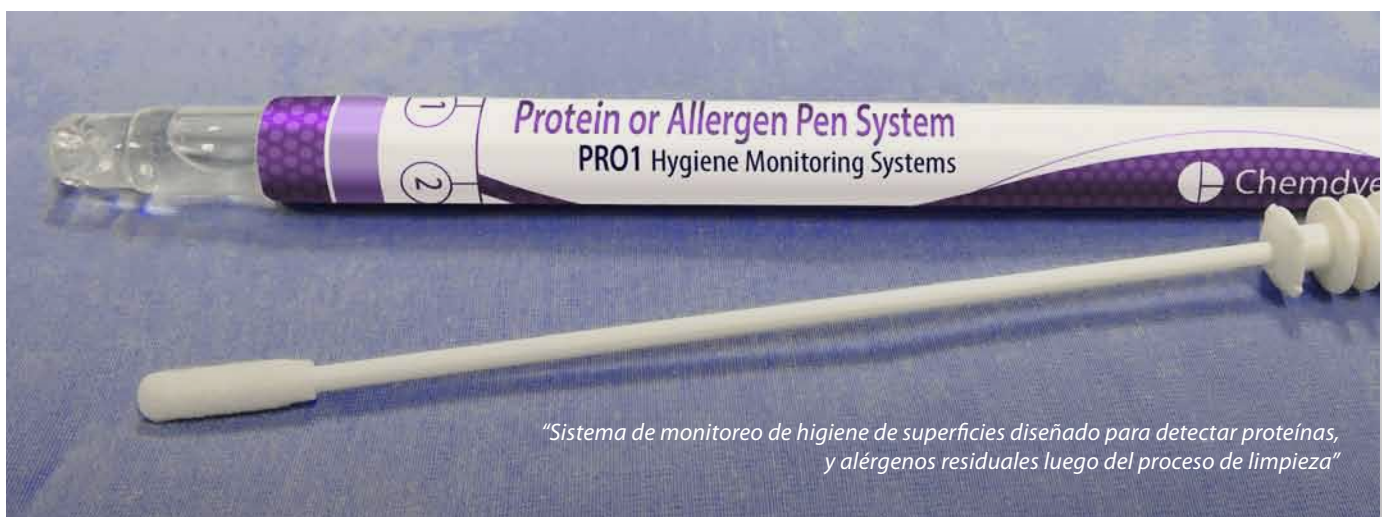


“Ticket que muestra el resultado final de cada posición de lectura activa en una incubadora de lectura automática de fluorescencia, permitiendo documentar cada resultado en un libro de registro de resultados de esterilización.”

Recientemente, han surgido en el mercado incubadoras de lectura automática de fluorescencia que, sumado al análisis de IBs, permiten realizar un estudio cuantitativo de la calidad de higiene de superficies. Superficies que no han sido correctamente higienizadas, contienen restos de proteínas y alérgenos que pueden detectarse mediante un sistema de lápiz. Dicho sistema consiste en un hisopo humedecido con el cual se muestrea la superficie a ensayar, la presencia de tales residuos genera una reacción de

color y la intensidad del color es cuantificado en la incubadora de lectura automática de fluorescencia. Esto posibilita el registro de resultados para cada superficie ensayada. Los sistemas de trazabilidad están en auge en diversos ámbitos dado que resultan muy atractivos a fin de coleccionar toda la información disponible sobre un dado suceso. El concepto de trazabilidad se define según la norma ISO 9001:2000 como «la habilidad para trazar la historia, aplicación o localización de lo que se esté

considerando». Las funciones ofrecidas por las incubadoras de lectura automática de fluorescencia de última generación, las convierte en el núcleo de un sistema de trazabilidad de procesos de esterilización e higiene dado que permiten integrar toda la información relativa a un dado proceso y disponer de ella de manera simple. Esto posee implicancias muy importantes en términos de calidad, seguridad y prevención en áreas tan masivas como la salud e industria alimenticia y farmacéutica entre otras.



“Sistema de monitoreo de higiene de superficies diseñado para detectar proteínas, y alérgenos residuales luego del proceso de limpieza”

La información aquí presentada es responsabilidad de la autora y sólo pretende ser una guía para el desarrollo de la actividad diaria.



APUNTES DE LABORATORIO

CONTROL DE ESTERILIZACIÓN: INDICADORES BIOLÓGICOS, LA OPCIÓN MAS CONVENIENTE



britanialab.com